

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

Ústav Vinohradnictví a vinařství



**ANALYTICKÉ METODY
PRO STANOVENÍ KYSELINY
JABLEČNÉ A VINNÉ VE VÍNĚ**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce

doc. Ing. Jiří Sochor, Ph.D.

Vypracovala

Ing. Lucie Töröková

Lednice 2015



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Ing. Lucie Töröková**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Vinohradnictví a vinařství
Název tématu: **Analytické metody pro stanovení kyseliny jablečné a vinné ve víně**
Rozsah práce: minimální rozsah 35 stran

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte odbornou literaturu zabývající se problematikou pojednávající o stanovení kyseliny jablečné a vinné ve víně.
2. Zpracujte literární rešerši na kyselinu vinnou a jablečnou.
3. Rešeršním způsobem zpracujte analytické techniky zabývající se stanovením kyseliny vinné a jablečné.
4. Uveďte doporučení, která z vědeckých studií a praxe vyplývají.




Seznam odborné literatury:

1. STREDANSKY, M. – MONOSIK, R. – GREIF, G. Comparison of biosensors based on gold and nanocomposite electrodes for monitoring of malic acid in wine. [online]. 2012. URL: <http://://WOS:000297362800017>.
2. SAENZ, C. – GALLARTA, F. – SAINZ, F. Fluorescent sensing layer for the determination of L-malic acid in wine. [online]. 2007. URL: <http://://WOS:000244684100038>.
3. PERES, R. – MICKE, G. – MORAES, E. Rapid method for the determination. of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. [online]. 2009. URL: <http://://WOS:000264470200004>.
4. MIYAGUCHI, Y. – KOTANI, A. – TOMITA, E. Determination of organic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection during wine brewing. [online]. 2004. URL: <http://://WOS:000220285600006>.

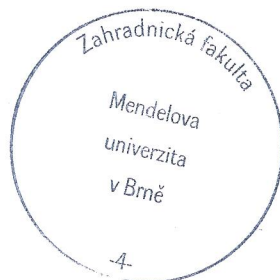
Datum zadání bakalářské práce: prosinec 2013

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2015

L. S.


Ing. Lucie Töröková
Autorka práce


Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
Vedoucí ústavu




Ing. Jiří Sochor, Ph.D.
Vedoucí práce


doc. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: Analytické metody pro stanovení kyseliny jablečné a vinné ve víně vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona. Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala především vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Jiřímu Sochorovi, Ph.D. za cenné rady a čas věnovaný odborným konzultacím při zpracování této bakalářské práce. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině za pochopení a podporu v průběhu mého studia

V Lednici dne:

.....

Obsah

1.	Úvod	6
2.	Cíl práce.....	7
3.	Charakteristika kyseliny jablečné a kyseliny vinné.....	8
3.1.	Kyselina jablečná.....	8
3.2.	Kyselina vinná	9
3.3.	Obsah kyselin ve víně.....	10
4.	Techniky stanovení kyseliny jablečné a vinné	12
4.1.	Chromatografické techniky	12
4.1.1.	Tenkovrstvá chromatografie.....	13
4.1.2.	Plynová chromatografie.....	14
4.1.3.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	15
4.1.4.	Iontová chromatografie.....	17
4.2.	Elektrochemické techniky	18
4.2.1.	Elektroforézní metody	19
4.2.2.	Izotachoforéza	22
4.2.3.	Bio-elektrochemická metoda.....	22
4.2.4.	Potenciometrická titrace a spojení s průtočnou analýzou.....	23
4.3.	Spektroskopické techniky.....	23
4.4.	Enzymatické techniky.....	26
4.5.	Titrační techniky.....	28
5.	Závěr	30
6.	Souhrn.....	31
7.	Reference	33
8.	Seznam použitých zkratk	42

1. Úvod

V hroznové šťávě a víně je zastoupena celá řada organických kyselin, k nejdůležitějším patří kyselina jablečná a kyselina vinná. Cílem každého vinaře je získat podíl kyselin ve víně odpovídající dané odrůdě. Základem je vyhnout se nízkým hodnotám pod 5 g/l a zároveň vysokým hodnotám nad 12 g/l kyselin. Hlavně u raných odrůd je obsah kyselin nízký, proto je nutné provádět pravidelnou kontrolu obsahu titrovatelných kyselin, pH, popř. jednotlivých kyselin jablečné a vinné. Sledování obsahu kyselin v hroznech tedy začíná již během jejich dozrávání. Rozhodující je ovšem jejich poměrové zastoupení, které je převážně ovlivněno vyzrálostí hroznů a jejich zpracováním.

Pro stanovení jednotlivých organických kyselin v hroznové šťávě a ve víně je možné využívat celé řady různých analytických metod zahrnujících metody chromatografické, elektrochemické, spektroskopické, enzymatické nebo klasické titrační.

Klasické titrační metody jsou spíše na ústupu a nahrazují je přístroje využívající speciální a profesionální analytické vybavení. S titracemi se můžeme setkat u malovinařů, ti tyto metody ještě používají pro orientační zjištění obsahu kyselin. Pro přesnější analýzu se obracejí na akreditované laboratoře, které využívají speciální analytické přístroje.

Z chromatografických metod zaujímá největší zastoupení v oblasti zjišťování obsahu kyselin kapalinová chromatografie, nebo spíše rychle se rozvíjející vysoko účinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography = HPLC). Její spojení i s jinými technikami vede k velmi rychlé analýze, nízké spotřebě vzorku a malým nákladům.

Elektrochemické metody dosahují z hlediska analýzy značné citlivosti a senzitivity. Jsou založeny na principu oxidačně-redukčních reakcí, spojených s přenosem elektronů. Nejrozšířenější metodou je kapilární elektroforéza, je přibližně stejně rozšířená jako HPLC.

Spektroskopické a enzymatické metody nepaří k příliš rozšířeným, spíše se využívají v kombinaci s jinou technikou. Sériové propojení chromatografické a enzymatické nebo spektroskopické metody vede k lepším výsledkům.

Zjištění zastoupení jednotlivých kyselin v hroznové šťávě a víně může vypovídat o kvalitě i zralosti suroviny, případně může být ukazatelem falšování a úpravy surovin.

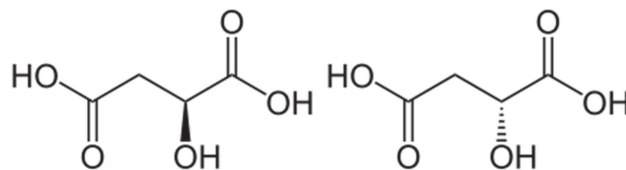
2. Cíl práce

Cílem práce je shrnout různé analytické techniky používané pro kvalitativní i kvantitativní analýzu organických kyselin v hroznové šťávě a víně. Speciálně je tato práce zaměřena na kyselinu jablečnou a vinnou. Jednotlivé analytické metody rozdělit do pěti základních skupin: chromatografické, elektrochemické, spektroskopické, enzymatické a titrační. Úkolem bylo rozepsat a shrnout jednotlivé metody.

3. Charakteristika kyseliny jablečné a kyseliny vinné

3.1. Kyselina jablečná

Kyselina jablečná patří mezi karboxylové kyseliny. Dle systematické nomenklatury je označena jako kyselina hydroxybutandiová se sumárním vzorcem $C_4H_6O_5$. Chemická struktura je znázorněna na obrázku (Obr.1.), kde tvoří dvě opticky aktivní formy L-kyselina jablečná, D-kyselina jablečná (SHANGHAI, 2013; VODRÁŽKA, 1996). L-forma kyseliny jablečné se vyskytuje v přírodě, rebarbora, jablka, hrozny, zatím co D-forma kyseliny se vyrábí synteticky (DAVÍDEK, 1983). Z hlediska sensorické analýzy je zařazena mezi trpce chutnající dikarboxylové kyseliny. Přirozeně se vyskytuje ve všech druzích ovoce a zeleniny, ale byla dokázána i v mase a sýrech. V řadě pokrmů způsobuje kyselý vjem, vzniká tzv. ovocným metabolismem (BARTEK, 2012). Kyselina jablečná je přítomna v jablkách a vnímáme ji jako kyselou chuť zelených jablek. Může také způsobovat trpkou chuť vína, i když její množství v ovoci klesá s jeho zralostí. Při trávení dodává tělu energii ve výši 10 kJ/g (FINGLAS, 1993). Pokud je přidávána do potravin, označuje se jako E 296, její disociační konstanty jsou $pK_1 = 3,46$, $pK_2 = 5,21$ (AGENCY, 2011, 2014; WOOD, 1987). Vápenaté a hořečnaté soli kyseliny jsou dobře rozpustné, díky tomu nevzniká problém při použití tvrdší vody (průmyslová výroba nápojů) (KENNEDY *et al.*, 2005). Její anion se nazývá *malát* a je článkem v citrátovém cyklu (JENSEN, 2007). Vzniká z *fumarátu* pomocí *fumarázy*, na oxalacetát je oxidován pomocí enzymu *malátdehydrogenázou*. Může se ale také oxidovat na *pyruvát* za současné redukce $NADP^+$ (Nikotinamidadenindinukleotidfosfát) na $NADPH$; *pyruvát* je spíše vhodný pro syntézu sacharidů nebo aminokyselin.



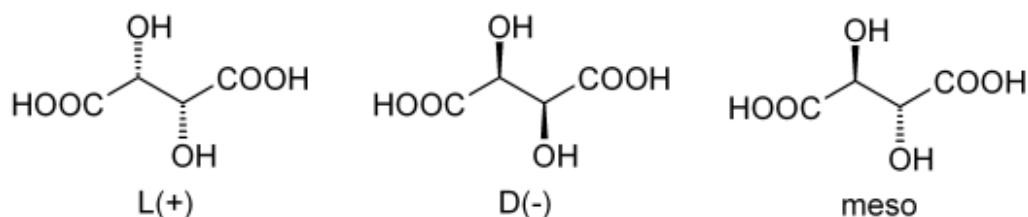
Obr.1. Strukturní vzorec kyseliny jablečné s dvěma izomerními formami.

Pro potravinářské účely se kyselina jablečná vyrábí z jablek, kde se přirozeně vyskytuje. Poprvé se jí podařilo izolovat v jablečném moštu již v roce 1785. Průmyslově je připravována enzymaticky z kyseliny fumarové pomocí enzymu *fumarázy*. Pro tento účel jsou využívány mikrobiální buňky, které produkují tento enzym (PRESECKI *et al.*, 2007). Ve studii Velíška (VELÍŠEK, 2002b) je prezentována průmyslová výroba

pomocí bakterií *Lactobacillus brevis* nebo kvasinek rodu *Candida*. Pro produkci kyseliny jablečné byly také zkoumány další druhy mikroorganismů např. *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium ammoniagenses* (dříve *Brevibacterium ammoniagenses*) (TAKATA *et al.*, 1979), *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI, 2014; PELEG *et al.*, 1990). Kyselina jablečná vzniká adicí vody z kyseliny fumarové a oxidací dává kyselinu oxaloctovou (keto - kyselinu).

3.2. Kyselina vinná

Kyselina vinná (kyselina 2,3-dihydroxybutandiová, někdy kyselina dihydroxyjantarová), funkční vzorec $\text{HOOCCH(OH)CH(OH)COOH}$, je bezbarvá krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě s charakteristickou kyselou a ovocnou chutí. Disociační konstanty jsou $\text{pK}_1 = 2,96$ a $\text{pK}_2 = 4,16$. Vyskytuje se ve třech prostorových izomerech, má dva asymetrické uhlíkové atomy, takže existuje pravotočivá D-forma, levotočivá L-forma, opticky inaktivní meso-vinná kyselina (DAVÍDEK, 1983; WOOD, 1987), znázorněny jsou na obrázku (Obr.2.). V přírodě je nejvíce rozšířena L-kyselina vinná a racemická kyselina vinná (směs D a L formy), neboli kyselina hroznová, která byla stanovena v hroznech (VELÍŠEK, 2002a, 2002b). V mezinárodním seznamu přídatných nebo přídavných látek je označena kódem E 334 (zalomit) jako L-kyselina vinná. Používá se zejména v potravinářství a vinařství. Z kyseliny vinné je odvozena Seignettova sůl, neboli vinan sodno-draselný $\text{KOOCC(OH)CH(OH)COONa}$, která je součástí Fehlingova činidla sloužícího k důkazu redukujících sacharidů. Používá se v potravinářství na výrobu šumivých nápojů a prášků do pečiva a v barvírenském průmyslu.



Obr.2. Strukturní vzorce kyseliny vinné s třemi prostorovými izomery.

Vinná kyselina je jednou z nejdůležitějších kyselin ve víně. Spolu s kyselinou jablečnou tvoří největší podíl kyselin v moštu. Výhodou je, že kyselinu vinnou nespotřebovávají kvasinky ani mikrobi. Při kvašení se pouze část kyseliny vinné vysráží ve formě

vinného kamene (0,5 – 1,5 g/l). Rozpustnost vinného kamene závisí na teplotě, obsahu alkoholu, iontů K^+ i obsahu kyseliny vinné.

Kyselina vinná je v přirozené formě součástí mnoha druhů ovoce, obzvláště v hroznovém víně, některých drobných bobulích (červený rybíz, angrešt, brusinky), nebo v málo známém tamaryšku, někdy označovaném jako kyselé nebo indické datle. Naopak kyselinu vinnou nenajdeme v jablkách, borůvkách nebo černém rybízu (KYZLINK, 1988; WOOD, 1987). Průmyslově se kyselina vinná získává extrakcí z vinného kamene (hydrogen-vínan draselný). Racemická směs DL-vinné kyseliny může být získávána chemickou syntézou

z anhydridu kyseliny maleinové (HEPNER, 2011). Pomocí různých biotechnologií je možné získávat kyselinu L-vinnou, kde se využívá konverze *cis*-epoxysukcinátu vápenatého pomocí bakterií (např. *Acinetobacter tartarogenes*, *Agrobacterium aureum* (ECKERLE, 2001), *Nocardica tartaricans* (ROSENBERG *et al.*, 1999) a mnoho dalších). Další z možností jak získávat kyselinu D-vinnou je pomocí mikroorganismů, které jsou schopné asimilovat pouze kyselinu v konfiguraci L ze substrátu obsahujícího D, L-vinnou kyselinu (LI *et al.*, 2007).

3.3. Obsah kyselin ve víně

Stejně jako cukry vznikají i kyseliny asimilací listů z vody a oxidu uhličitého. Celkové množství kyselin závisí na odrůdě, viniční trati, vyzrállosti hroznů a ročníku. Během vyzrávání vzniká nejdříve kyselina jablečná a později kyselina vinná, tyto kyseliny jsou nejčastější (STEIDL, 2010). Obsah kyselin jablečné a vinné, celkový obsah titrovatelných kyselin a pH lze vidět v tabulce (Tab.1.) pro rozdílnou kvalitu hroznů (PAVLOUŠEK, 2011).

Kyselina jablečná spolu s kyselinou vinnou je jedna z hlavních kyselin v hroznech (CONDE *et al.*, 2007; JACKSON, 2014). Jejich chemická struktura umožňuje podílet se na řadě enzymatických reakcí, transportu energie v celé rostlině, které jsou nezbytné pro zdraví a udržitelnost révy vinné. Obsah kyseliny jablečné ve šťávě z hroznů je maximální těsně před zráním, kdy může dosahovat koncentrace až 20 g/l. Během zrání obsah kyseliny jablečné klesá a při sklizni bývá obsah kolem 1 - 9g/l. Tyto ztráty zapříčiněné respirací jsou výraznější v teplém klimatu (JEFFERY, 1994; PAVLOUSEK *et al.*, 2011). Ve většině vín dosahuje koncentrace okolo 5 g/l (BETTERRIDGE, 1981;

HUNTER *et al.*, 1991). Její chuť ve víně je nakyslá, množství kyseliny v ovoci se snižuje se zvyšující se zralostí.

Koncentrace se liší i v závislosti na odrůdě, přičemž některé druhy např. Sylvánského, Barbera a Carignan byly vysazovány díky vyššímu obsahu kyseliny jablečné. Na rozdíl od kyseliny vinné je kyselina jablečná lehce zpracovávána mikroorganismy, čehož se často využívá ve vinařství při tzv. jablečno-mléčné fermentaci pro snížení obsahu kyseliny jablečné ve víně. Fermentace je způsobena bakteriemi mléčného kvašení např. *Oenococcus oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) (NCBI, 2014). Chemicky se jedná o dekarboxylaci kyseliny jablečné za vzniku kyseliny mléčné a oxidu uhličitého (HUDELSON, 2011). Vytvořená kyselina mléčná má jemnější chuť a dodává vínu kulatější a plnější chuť. Jablečno-mléčné kvašení se využívá zejména při výrobě červených vín, v malé míře u vín bílých. Sensoricky je kyselina jablečná ve víně vnímaná jako ostrá, pichlavá kyselina a snahou sklep mistrů je vyrábět víno s nízkým obsahem kyseliny jablečné.

Tab.1. Rozdělení hroznů podle kvality na základě hodnoty pH a organických kyselin (PAVLOUŠEK, 2011).

Kvalitativní parametr	Typ odrůdy	Kvalita hroznů		
		nízká	průměrná	vysoká
pH	Bílé	2,8-3,0 3,4 a více	3,0-3,1 3,3-3,4	3,1-3,3
	Modré	2,8-3,0 3,5 a více	3,0-3,1	3,1-3,4
Titrovatelné kyseliny	Bílé	3,0-5,5 11,0 a více	9,0-11,0 5,5-6,5	6,5-9,0
	Modré	3,0-5,0 10,0 a více	5,0-5,5 7,5-10,0	5,5-7,5
Kyselina vinná	Bílé	Více než 9,0 Méně než 4,0	7,0-9,0	4,0-7,0
	Modré	Méně než 5,0 Více než 9,0	8,0-9,0	5,0-8,0
Kyselina jablečná	Bílé	Méně než 1,5 Více než 5,0	1,5-2,0 3,0-5,0	2,0-3,0
	Modré	Méně než 1,0	1,0-1,5 3,0-5,0	1,5-3,0

4. Techniky stanovení kyseliny jablečné a vinné

4.1. Chromatografické techniky

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda, kde se molekuly analytu během separace rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi. Dělení je založeno na rozdílné afinitě složek směsi k mobilní a stacionární fázi. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být ve stacionární fázi zachycovány či unášeny mobilní fází. Tím se postupně jednotlivé složky od sebe separují. Chromatografie je současně jak separační, tak i analytická metoda, která poskytuje kvalitativní i kvantitativní analýzu (KLOUDA, 2003).

Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je celá řada a je účelné rozdělit je do skupin. Vzhledem ke značné různorodosti je můžeme rozdělit podle různých hledisek: podle skupenství mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze, podle povahy děje, který převládá při separaci, podle podmínek analýzy, podle účelu nebo pracovního provedení.

• podle skupenství mobilní fáze

- kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography – LC),
- plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC).

• podle uspořádání stacionární fáze

- kolonová chromatografie - stacionární fáze je umístěna v trubici,
- plošné techniky:
 - papírová chromatografie (Paper Chromatography – PC) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru,
 - tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography –TLC) stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (skleněná deska, hliníková fólie).

•podle povahy děje převládajícího při separaci

- rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi,
- adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná schopnost složek poutat se (adsorbovat) na povrch stacionární fáze,

- iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty ve vzorku,
- gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu), menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulový síťový efekt),
- afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu) (KLOUDA, 2003).

• **podle podmínek analýzy**

- izokratická chromatografie – prováděna za konstantních podmínek (např. složení mobilní fáze, teplota),
- gradientová chromatografie – během separace se podmínky mění. Pro měření pomocí elektrochemických metod se využívají potenciometry, konduktometry a polarografy a odpovídající sondy. Každý typ sondy má svoji konstrukci, materiály a oblasti využití.

Dle rozdělení byly vybrány metody, které se pro analýzu kyselin ve víně a hroznové šťávě používají nejvíce. Z chromatografických metod je v tomto případě nejpoužívanější kapalinová chromatografie, vzhledem k tomu, že pracujeme s kapalnými vzorky. V menší míře se používá plynová chromatografie, iontová a také tenkovrstvá chromatografie. Těmito technikami se budeme následně zabývat.

Pro separaci a kvantifikaci organických kyselin se často používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo iontová chromatografie (IC).

4.1.1. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografický proces je založen na vzlínání mobilní fáze tenkou vrstvou jemnozrnného sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze. Sorbent je buď volně nanesen, nebo častěji spíše fixován na vhodné podložce, kterou je buď skleněná deska nebo hliníková, či plastová fólie. Vzorek se nanese na start a po odpaření rozpouštědla vzorku se deska vloží do uzavřené vyvíjecí komory, která je nasycena parami mobilní fáze. Mobilní fáze unáší dělené látky ze vzorku, které se více či méně zpožďují interakcí (rozpuštěním nebo adsorpcí) se stacionární fází, a tím se vzájemně dělí. Jakmile dosáhne čelo vzlínající mobilní fáze potřebné vzdálenosti, chromatogram se vyjme a provede se detekce (OTYEPKOVÁ, 2004; STAHL, 1969; WALL *et al.*, 2005).

Každá látka je charakterizována polohou na chromatogramu, která se vyjadřuje retardačním faktorem R_f . Retardační faktor je charakterizován poměrem vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti čela od startu, závisí na konkrétní vyvíjecí soustavě, na povaze látky, ale i na dalších faktorech (např. na teplotě, množství nanesené látky). Velkou předností TLC je jednoduchost provedení, rychlost analýzy, dostupnost příslušného laboratorního vybavení a relativní ekonomická nenáročnost. Další výhody představuje široká možnost volby způsobu detekce a možnost orientačního, nebo i velmi přesného kvantitativního vyhodnocení (BAUER *et al.*, 1991). Tenkovrstvá chromatografie má široké využití z hlediska analytických metod při identifikaci jednotlivých kyselin obsažených ve víně, převážně kyseliny vinné, jablečné, mléčné, jantarové a citrónové (CHAMPAGNOL *et al.*, 1971). Pro přesnou kvantifikaci kyselin se stanoví obsah každé kyseliny samostatně s použitím optické denzitometrie. Tato metoda je založena na měření optické hustoty a postup při měření je podobný jako u fotometrických měření, jen se liší v uspořádání. Měří se intenzita odraženého světla od neprůhledné podložky a hodnotí se poměr intenzity dopadajícího a odraženého světla.

Denzitometrie je nejběžnější a nejpřesnější technika, kdy skenovací foto-denzitometry převádějí intenzitu skvrn na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství analytu. Další metoda využívaná pro identifikaci a kvantifikaci kyselin ve víně a hroznové šťávě je plynová chromatografie, která byla použita ve studii RYAN *et al.* (RYAN *et al.*, 1973). Spolu s kyselinami byly stanoveny i jiné látky jako kyselina mléčná, fosforečná, jantarová a cukr.

4.1.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie patří k velice citlivým a selektivním analytickým technikám. Pro stanovení organických kyselin s krátkými řetězci tedy ne-těkavé kyseliny, se používá v kombinaci se vznikem derivátů. Kyseliny mohou tvořit deriváty s těmito třemi sloučeninami: trimethylsilyl (BRUN *et al.*, 1986; BUSER *et al.*, 1982; DESMEDT *et al.*, 1981; FANTOZZI *et al.*, 1979; FANTOZZI, 1981; RYAN *et al.*, 1973), nebo methylic ester (BARDEN *et al.*, 1997), dále deriváty s terc-butyl-dimethylsilylem (KIM *et al.*, 1989), a deriváty etyl-esteru (DENG, 1997). Izolace jednotlivých kyselin před vznikem derivátů je nutností, vzhledem jejich komplexnímu zastoupení v hroznové šťávě a víně. Samotná izolace se provádí za využití solí olova

a vzniku jeho sraženin (RYAN *et al.*, 1973), nebo pomocí iontoměniče (NYKÄNEN *et al.*, 1983), a také lze využít extrakci na pevné fázi (KIM *et al.*, 1989).

Všechny tyto kroky jsou časově náročné, a proto je využití klasické plynové chromatografie pomalu na ústupu.

Deng ve své studii sjednotil všechny kroky separace a vznik derivátů za účelem snížení doby analýzy vzorku (DENG, 1997). Propojení esterifikace s iontoměničem vedlo k izolování jednotlivých organických kyselin v průběhu 60 min při teplotě 90 °C. Některé organické kyseliny, jako jsou kyselina octová, mléčná a kyselina jablečná, mohou být stanoveny přímo plynovou chromatografií bez vzniku derivátu (YANG *et al.*, 2001). V práci Yang *et al.* (YANG *et al.*, 2001) bylo stanoveno několik organických kyselin s krátkým řetězcem (do 13 uhlíků) v 37 kapalných vzorcích potravin, za využití detektoru s nízkou mezí detekce. Pro vyšší mez detekce lze použít detektory jako, plamenový ionizační detektor (FID) (BARDEN *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2001) a hmotnostní spektrometr (MS). Výběr této techniky pro stanovení organických sloučenin je velmi limitován náklady a složitostí. Jiné alternativy, jako je kapalinová chromatografie, nebo kapilární elektroforézy jsou vhodnější pro stanovení organických kyselin v hroznových šťávách a víně.

4.1.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je technika vhodnější pro stanovení organických kyselin v hroznové šťávě a víně (ALONSO *et al.*, 1998).

Existuje mnoho HPLC technik pro stanovení organických kyselin v hroznové šťávě a víně. Ve většině studií pro stanovení organických kyselin se provádí předpříprava, kde se zabrání rušivým vlivům cukrů nebo barviv, které by mohly ovlivnit vývoj měření. Podle úpravy vzorku je můžeme rozdělit: úprava vzorku ředěním, filtrací nebo provádíme složitější postupy. Běžně se používá předpříprava extrakcí s iontoměničem nebo s pevnou fází, nebo vznikem derivátů. Castellari *et al.* ve své studii srovnává přímé vstřikování s extrakcí na pevné fázi za využití SAX kazety k separaci organických kyselin (CASTELLARI *et al.*, 2000; MATO *et al.*, 2005). Vyhodnotil, že přímé vstřikování s předpřípravou ředěním nebo filtrací, je přesnější, než extrakce s pevnou fází. Ve studiích Linget *et al.* a Vérette *et al.* (LINGET *et al.*, 1998; VÉRETTE *et al.*, 1995) byl vyvinut zcela automatický systém přípravy vzorku s on-line řízenou dialýzou před samotnou HPLC analýzou. Provádělo se odstranění

makromolekulárních látek a mikročástic obsažených ve vzorku. Bylo provedeno několik testů na hroznových šťávách a víně, výsledky potvrdily dobrou opakovatelnost a citlivost. Metody, které používají předpřípravu vzorku vznik derivátu se sledovanou kyselinou, využívají reakce s estery p-nitrobenzylu (CUNHA *et al.*, 2002). Metodu stanovení pěti organických kyselin za využití fenacylu pro vznik derivátu prezentuje práce (CACCAMO *et al.*, 1986; SYMONDS, 1978). Vzorek se mísí s roztokem fenacylbromidu a etheru v acetonu, směs se zahřívá po dobu 40 minut. Výsledné chromatogramy jsou přesné a dobře rozlišitelné, výtěžnost je až 95 %.

Na druhé straně, byly vyvinuty metody s různými mechanismy separace, například HPLC s reverzní fází, iontoměničová HPLC nebo iontově vylučovací HPLC. Mezi nejpoužívanější patří technika separace s reverzní fází. Stanovení organických kyselin pomocí HPLC s reverzní fází za využití UV detekce a předpřípravy vzorku ředěním a filtrací prezentuje studie (LLORENTE *et al.*, 1991). Je to jednoduchá metoda, kde doba analýzy trvá jen 40 minut.

Pro stanovení organických kyselin v hroznové šťávě a bílých vínech byl vyvinut speciální způsob iontoměniče HPLC se dvěma spektrofotometrickými detektory zapojenými v sérii (UV a IČ) (CASTELLARI *et al.*, 2000; LOPEZ *et al.*, 1996) pro přímé stanovení. Tato metoda přímé analýzy poskytuje přijatelné rozlišení chromatogramů za nižších nákladů a kratší doby analýzy. Iontově vylučovací HPLC s detektorem elektrochemickým a indexu lomu, umožňuje hlavně stanovení organických kyselin v hroznových šťávách a víně (CASELLA *et al.*, 2002; LOPEZTAMAMES *et al.*, 1996; MATO *et al.*, 2005). Příprava vzorků na analýzu HPLC s iontoměničem a iontově vylučovací HPLC je velmi jednoduchá, ale chromatogramy mají horší rozlišení než jiné metody.

Tusseau *et al.* (TUSSEAU *et al.*, 1987) použil ve své studii reverzní výměnné kolony a iontoměniče, z které vyplývá, že reverzní výměnná kolona je vhodná pro stanovení kyseliny vinné a jablečné. Lepší výsledky s iontoměničem však byly získány pro kyselinu citronovou a octovou. Při použití iontové výměny, kdy se organické kyseliny vyskytují ve své iontové formě, je nutná kontrola pH. Srovnání tří chromatografických systémů: iontové výměny, iontového vyloučení a reverzní fáze ve studii prezentuje (DING *et al.*, 1995). Ding *et al.* dospěli k závěru, že úzké píky byly získány metodou iontového vyloučení, oproti tomu metoda s reverzní fází má nejrychlejší analýzu. Výhodou metody iontové výměny je její přesnost a jednodušší zpracování vzorků. Použití metody obrácení fází v HPLC se dvěma kolonami zapojenými v sérii

s detektorem UV záření (PAZO, 1999). Analýza vzorků vín probíhala metodou přímého vstříkávání bez předchozí úpravy. Romero *et al.* a Tusseau *et al.* (ROMERO *et al.*, 1993; TUSSEAU *et al.*, 1987) popsali ve svých studiích experiment s použitím dvou kolon zapojených v sérii, kde proběhla extrakce s tuhou fází k odstranění organických kyselin. Toto zapojení dvou kolon do série zlepšilo rozlišení, ale doba analýzy se protáhla.

Jun ve své studii popsal metodu HPLC s UV detekcí s reverzní fází. V experimentu využil kolonu s povlakem s n-cetylpyridinium-chloridu (JUN *et al.*, 1996). Vzorky vína byly předpřipraveny ředěním a filtrací. V této práci bylo použito několik typů UV detektorů. Nejpoužívanějším detektorem je UV spektrofotometr, dále detektor indexu lomu (RI), vodivostní detektor, elektrochemický detektor, nebo fotochemický indukovaný chemiluminiscenční detektor. Metoda propojení HPLC s Infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR = Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (VONACH *et al.*, 1998) poskytuje možnost identifikace látek, které nelze stanovit pomocí UV-VIS techniky, ovšem nízký detekční limit (0,2 g/l) není příliš praktický pro použití.

Metoda horizontálního zeslabení odrazu (Attenuated Total Reflectance = ATR) slouží pro analýzu pevných i kapalných vzorků a analýzu přes průtočnou celu přímo s on-line detekcí ve střední-IR oblasti (ENDELMANN *et al.*, 2003). Přestože se jedná celkem o nové spojení technik, ukázalo se, že není o moc lepší než ostatní metody, vzhledem k delší době analýzy nebo detekci kyselin s nižší molekulovou hmotností. Také citlivost není příliš vysoká, detekční limit je okolo 0,2 g/l. Stanovení organických kyselin v ovocných vínech spojením techniky HPLC s elektrochemickou detekcí se ukazuje jako dostatečně rychlé a jednoduché, bez nutné přípravy derivátu (KOTANI *et al.*, 2004).

4.1.4. Iontová chromatografie

Iontová chromatografie s vodivostní detekcí umožňuje separaci a kvantifikaci organických kyselin, jak v hroznových šťávách, tak i ve víně. Technika má své výhody, vzhledem k její specifičnosti a citlivosti při stanovování minimalizuje rušivý vliv cukrů díky detektoru vodivosti. V metodě není nutná předchozí úprava vzorku extrakcí nebo vytvořením derivátu. V chromatografii byla použita kolona Dionex Omni Pac PAX-500 pro separaci a kvantifikaci významných organických kyselin, následně oddělené anionty

byly stanoveny vodivostním detektorem za využití vymývání hydroxidem sodným (NaOH) (KUPINA *et al.*, 1991; SACCANI *et al.*, 1995). Bylo analyzováno více než 500 vzorků ovocných šťáv. Masson použil ve své studii kolonu Dionex As11, k promývání byl využit NaOH, vodivostní detektor stanovil organické kyseliny a anorganické anionty v hroznovém moštu (MASSON, 2000). Studoval vliv tří různých rozpouštědel metanolu, etanolu a acetonitril na účinnost kolony. Nejlepší separace byla ve směsi obsahujícího 13% metanolu a 13 % etanolu ve vodě, která proběhla během pouhých 20 minut. Vzorky byly připraveny 20-násobným zředěním a následnou filtrací. Tato specifická chromatografická metoda je spolehlivá pro rutinní kontrolu kvality, je ideální pro výzkum organických a anorganických aniontů, pro analýzu vzorků s velmi malým množstvím organických kyselin.

4.2. Elektrochemické techniky

Elektrochemické metody jsou velice rozšířené, představují širokou oblast experimentálních technik, jejichž společným rysem je přenos elektrického náboje přes rozhraní mezi fázemi, z nichž alespoň jedna musí být iontovým vodičem elektrického proudu. Tento děj je ovlivněn existencí elektrického potenciálového rozdílu mezi stýkajícími se fázemi, vyvolaného buď vnějšími vlivy (vnější zdroj elektrického napětí), nebo přímo chemickým složením celé soustavy. Obvykle bývá přenos elektrického náboje spojen s chemickou změnou ve studované soustavě – takový děj pak nazýváme *elektrodovou reakcí*, mluvíme-li o změnách přímo na sledovaném fázovém rozhraní nebo elektrolýza, mluvíme-li o celkových změnách ve studované soustavě, způsobených prošlým elektrickým proudem (KLOUDA, 2003). Tyto metody jsou založeny na měření napětí, nebo proudu v elektrochemickém článku. Pro měření pomocí elektrochemických metod se využívají potenciometry, konduktometry a polarografy a odpovídající sondy. Každý typ sondy má svoji konstrukci, materiály a oblasti využití. Velké využití těchto technik nalezneme v oblasti analýzy léčiv, surovin, kontroly jakosti surovin a potravin, vody, odpadních vod, a podobně.

Rozdělení elektrochemických metod

- Metody založené na elektrochemické reakci
 - využívají vztah mezi kvalitou x množstvím analyzované látky a příslušnou elektrochemickou veličinou. Elektrochemické metody využívají jevy spojené

s přenosem elektrického náboje přes fázové rozhraní roztok – tuhá látka, případně jevy spojené s transportem nabitých částic v roztoku. Podle procesu, který při této analýze probíhá, dělíme metody do dvou podskupin:

- metody založené na elektrochemické reakci, která probíhá jen v těsném okolí indikační eldy v analyzovaném roztoku (potenciometrie, polarografie, voltametrie),
- metody založené na elektrochemické reakci probíhající v celém objemu analyzovaného vzorku (coulometrie, elektrogravimetrie).

- Metody, při kterých neprobíhá elektrochemická reakce

- měří se určitá elektrická vlastnost roztoku jako celku, např. vodivost vzorku způsobená migrací iontů (konduktometrie)

Speciální část elektrochemických metod tvoří elektromigrační separační metody. Tyto metody využívají dvou elektrokinetických jevů – elektroforézy a elektroosmózy. Principem těchto metod je rozdílná rychlost migrace ve vzorku, neboť nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

Podle rozdělení byly vybrány metody, které se pro analýzu kyselin ve víně a hroznové šťávě používají nejvíce. Z elektrochemických metod je v tomto případě nejpoužívanější elektroforéza, vzhledem k dobrým parametrům analýzy. V menší míře se používá izotachoforéza, bio-elektrochemická metoda a v poslední řadě potenciometrická titrace s průtočnou analýzou. Těmito technikami se budeme následně zabývat.

4.2.1. Elektroforézní metody

V posledních letech se dostává kapilární elektroforéza do popředí mezi analytickými metodami. Využívaná pro stanovení organických kyselin v různých typech vzorků potravin např. mléko, sýry, celkové mléčné výrobky, pivo, káva a vinné produkty (BUIARELLI *et al.*, 2003; CORTACERO-RAMIREZ *et al.*, 2005; FU *et al.*, 1997; GALLI *et al.*, 2004; IZCO *et al.*, 2002a, 2002b; KLAMPFL, 1999; KLAMPFL *et al.*, 2000; ROSELLO *et al.*, 2002; SAAVEDRA *et al.*, 2000; SAAVEDRA *et al.*, 2001). Tento velký rozvoj elektroforézy nastal díky jejím dobrým parametrům, disponuje vysokým rozlišením, jednoduchostí a automatikou. Dalšími dobrými vlastnostmi jsou krátká doba analýzy, nízká spotřeba činidla a vzorku, v poslední řadě minimální

předpříprava vzorku. Využití kapilární elektroforézy k analýze obsahu organických kyselin v hroznové šťávě a víně propuklo až během několika let.

Metoda je schopna oddělit malé molekuly v analyzovaném vzorku, ještě před zahájením měření. Není zapotřebí složité předpřípravy pouze ředění nebo filtrace. Levi *et al.* ve své studii (LEVI *et al.*, 1993) popsal rozdílné zpracování vzorků, které spočívá ve vyčištění odstředěním a extrakcí pevných látek, sloučenin větších jak C₁₈ molekul a antokyanů (LEVI *et al.*, 1993). Přesto nejsou velké rozdíly mezi technikami předpřípravy. Pro vstřikování vzorků byly použity dva typy injektorů: hydrodynamický a elektrokinetický. Hydrodynamické vstřikování vzorků je nejrozšířenější metoda, provádí se za sníženého tlaku (injekce na konec kapiláry), nebo ve vakuu (detekce na konci kapiláry) (FUNG *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 1989; MATO *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001; VORARAT *et al.*, 2002). U tohoto typu injekce téměř nezávisí na parametrech vzorku, závisí pouze na jeho viskozitě. Druhá používaná metoda injekce je elektrokinetická (DE VILLIERS *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 1993; LEVI *et al.*, 1993). Provádí se nahrazením konce injekční nádoby lahvičkou vzorku a přivedením napětí. Z tohoto důvodu závisí na vodivosti, viskozitě elektrolytu, na vlastnostech vzorku a mobilitě analytu. Použití elektrokinetické injekce zvyšuje citlivost kapilární elektroforézy, avšak zhoršuje se přesnost, a proto není vhodná pro kvantifikaci.

Elektroforézní metody využívají často elektrolyty, které jsou důležité k dobré separaci. Při analýze šťávy z hroznů a vína se používá několik typů elektrolytů, nejpoužívanější jsou: bis (2-hydroxyethyl) imino-tris (hydroxymethyl) aminomethan, kyselina boritá, kyselina 1,3,5-benzotrikarboxylová, 2- (N-morfolino) ethansulfonová kyselina, chroman, kyselina 4-aminobenzoová, fosfát, ftalát, kyselina pyridindikarboxylová, kyselina pyromellitová nebo tetraboritan. Kromě toho, byly základní elektrolyty ještě míseny s několika modifikátory (povrchově aktivními látkami) pro snížení elektroosmotického toku např. cetyltrimethylamoniumbromidu, kyselina ethylenediaminetetrakarboxylová, myristyltrimethylammonium bromid, tetradecyltrimethylammonium bromid nebo hydroxid tetradecyltrimethylammonium.

U některých metod mohou organické modifikátory přidané do elektrolytu ovlivnit migraci látek nebo i selektivitu, patří mezi ně metanol (HUANG *et al.*, 1989; VORARAT *et al.*, 2002) nebo komplexní činidla, jako jsou soli Ca²⁺ a / nebo Mg²⁺ (GARCIA *et al.*, 2003; MATO *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001).

Většina metod používá pro propojení celého systému kapiláry, které spojují dohromady příjem vzorku injektor a jeho průchod kapilárou až do detektoru. Dříve byly používány

nepotažené křemenné kapiláry s přidanou povrchově aktivní látkou, ovšem adsorpce látek na stěnách kapilár způsobovala problémy s reprodukovatelností. Proto se začaly používat potažené kapiláry, aby se zabránilo elektroosmotickému toku, a přidání povrchově aktivní látky není nutné. Byl vyvinut způsob kontroly s neutrálně potaženou kapilárou (polyakrylamidovém), kde dosahujeme vyšší reprodukovatelnosti a přesnosti, než metody s nepokrytou kapilárou (SAAVEDRA *et al.*, 2003).

Používají se pouze dva typy detektorů a to vodivostní a UV spektrofotometr. Detektor UV patří k rozšířenějšímu způsobu detekce, díky svému univerzálnímu využití (HEIGER, 2000). Měření můžeme provést dvěma způsoby: přímo a nepřímo. Měření přímo znamená, že absorpce elektrolytu probíhá v nižší UV oblasti, než je absorpce organických kyselin. Absorbance roste, když analyt prochází detektorem. Oproti tomu měření nepřímé probíhá tak, že elektrolyt absorbuje ve vyšší UV oblasti než je absorpce organických kyselin, takže když analyt prochází detektorem, absorbance se snižuje. Nižší UV vlnová délka se pohybuje v rozmezí 185 až 254 nm a umožňuje dosáhnout vysoké citlivosti při stanovení organických kyselin. Klampfl *et al.* ve svých studiích (KLAMPFL *et al.*, 1998; KLAMPFL *et al.*, 2000) prezentuje studii spojení dvou UV detektorů dohromady a dokazuje, že jejich kombinace umožňuje kvantifikaci většiny organických kyselin během jedné analýzy. Krátká doba analýzy je další výhodou stanovení organických kyselin v hroznové šťávě a víně touto metodou. Doba analýzy se pohybuje v rozmezí 3,5 až 20 minut, i když většina analýz probíhá méně než 15 minut. Stanovení kyseliny jablečné a mléčné během jablečno-mléčného kvašení pomocí spojení kapilární elektroforézy a HPLC je prezentováno v práci (LEVI *et al.*, 1993). V této studii dospěli k závěru, že obě techniky, za předpokladu rychlé analýzy, mohou být zautomatizovány pro zpracování více vzorků. Ovšem oproti HPLC má kapilární elektroforéza další výhodu a to nízkou spotřebu rozpouštědla. Srovnávají kvantitativní údaje z analýzy různých organických kyselin pro propojení různých metod s elektroforézou: metoda infračervené spektrometrie pro stanovení kyseliny vinné, jablečné a citronové, stanovení destilací kyselinu octovou, kolorimetrický způsob stanovení kyseliny vinné, a enzymatický způsob pro stanovení kyseliny jablečné, mléčné a citrónové (KANDL *et al.*, 1999). Kapilární elektroforéza je schopna nahradit pět současných metod pro analýzu organických kyselin a to, HPLC, IC, enzymatickou metodu, destilaci a kolorimetrii. Všechny výsledky z metod byly téměř v souladu s výsledky získanými z IC, kolorimetrie a destilace. U enzymatické metody se projevilo mírné zkreslení, k vůli nízké schopnosti srovnání s elektroforézou. Rozdíly lze vysvětlit

tím, že je enzymatická metoda specifická pro D a L-izomery, přičemž elektroforéza spojí oba izomery do jednoho vrcholu (KANDL *et al.*, 1999).

Většina elektroforézních metod umožňuje stanovení hlavních organických kyselin v hroznových šťávách (kyseliny vinné, jablečné a citrónové) a ve víně (kyselina vinná, jablečná, citrónová, jantarová, octová a mléčná).

Hlavními nevýhodami kapilární elektroforézy jsou její nižší reprodukovatelnost, ve srovnání s enzymatickými a chromatografickými metodami, proto někteří autoři používají standardy nebo referenční sloučeniny pro zrychlení času migrace. Využívané standardy jsou kyselina máselná (KENNEY, 1991), kyselina mravenčí (DE VILLIERS *et al.*, 2003), nebo kyselina glyoxylové (ESTEVEZ *et al.*, 2004; KANDL *et al.*, 1999). Kyselina šťavelová byla použita jako referenční sloučenina pro výpočet relativních dob migrace organických kyselin (MATO *et al.*, 2007).

4.2.2. Izotachoforéza

Metoda je založena na dávkování vzorku na rozhraní dvou elektrolytů s rozdílnou pohyblivostí iontů. Směs se dělí při konstantním proudu v gradientu vysokého napětí. Po rozdělení směsi do jednotlivých zón jsou tyto zóny sevřeny mezi vedoucím a zakončujícím elektrolytem, nevzdalují se od sebe a až k místu detekce se pohybují stále stejnou rychlostí. Masár *et al.* ve své práci (MASÁR *et al.*, 2001) uvádí stanovení organických a anorganických kyselin ve víně, pomocí izotachoforetické separace s využitím kanálu z poly (methylmethakrylátu) s CC (column-coupling) čipem a detekcí na vodivostní koloně. Oddělení jednotlivých složek vzorku pomocí kanálu s čipem 94 mm dlouhý, kdy oddělení trvá 10-15 minut při nízké hodnotě pH (2,9) poskytuje lepší výsledky. Tato metoda se jeví vhodná pro stanovení kyseliny vinné, mléčné, jablečné a kyselina citrónové ve víně.

4.2.3. Bio-elektrochemická metoda

Tato metoda je založená na technologii biosenzorů a měření rozdílného pH pro stanovení kyseliny mléčné a jablečné ve víně (PALLESCHI *et al.*, 1994). Využívá při stanovení dva postupy, které spočívají v použití dvou laktátových biosenzorů. Při měření byly použity dvě elektrody a to kyslíková a peroxidová (VOLPE *et al.*, 1995). Obě elektrody byly sestaveny s použitím polymerní membrány. Experimentální

parametry jako je pH, teplota, koncentrace a kofaktor byly optimalizovány, stanovení trvalo méně než 1 minutu.

Detekční limity jsou relativně vysoké, proto je nutné ředění v rozmezí 1: 100 až 1: 200, čímž se odstraní všechny potenciální elektrochemické nebo enzymatické vlivy ve vzorku. Bylo sledováno celkem 14 vzorků. Stanovení kyselin touto metodou s využitím biosenzorů je rychlé a přesné, a vhodné jako alternativa klasickým metodám (PALLESCHI *et al.*, 1994).

4.2.4. Potenciometrická titrace a spojení s průtočnou analýzou

Pro stanovení celkového obsahu kyselin, pH, množství hořčíku a vápníku lze využít systému Flow Injection Analysis = FIA (průtočného režimu) s potenciometrickou detekcí. pH bylo měřeno elektrodou grafit/quinhydrone/silikonovou, kterou byla rovněž stanovena titrační kyselost (VAHL *et al.*, 2013). Výsledky stanovení množství kyselosti jsou ve shodě s výsledky získanými klasickými potenciometrickými titracemi a měřeními pH s použitím skleněné elektrody. Metoda umožňuje stanovení titrační kyselost asi 40 × za hodinu a změření pH asi 30 × za hodinu. Je vhodná pro jednoduché, rychlé a automatické stanovení celkového obsahu kyselin, pH, vápníku a obsahu hořčíku ve víně v malém objemu vzorku (VAHL *et al.*, 2008; VAHL *et al.*, 2010).

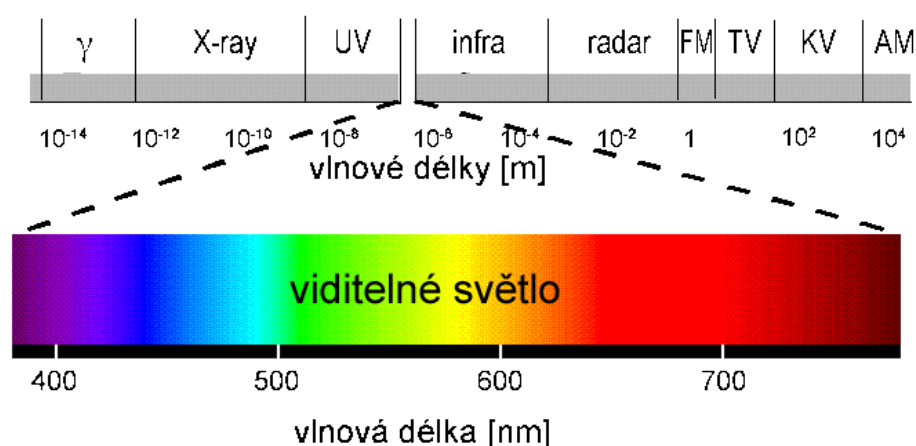
4.3. Spektroskopické techniky

Spektrofotometrické metody jsou založeny na interakci sledované látky obsažené ve vzorku s elektromagnetickým zářením, nebo vyzařování elektromagnetického záření vzorkem (KLOUDA, 2003).

Rozdělení spektroskopických metod

Optických metod je celá řada, můžeme je rozdělit do dvou základních skupin. Podle způsobu interakce elektromagnetického záření se studovaným vzorkem mohou nastat dvě situace. Za první dochází při průchodu záření vzorkem pouze ke změně jeho určitých vlastností (nespektrální metody), za druhé nastává výměna energie mezi látkou a elektromagnetickým zářením. Intenzita absorbovaného či emitovaného záření (atomy či molekulami) závisí na vlnové délce a vzniká tak spektrum. Oblast elektromagnetického spektra a vlnové délky jsou znázorněny na obrázku (Obr. 3.).

- **metody bez měření intenzity světla (nespektrální):** při průchodu záření vzorkem dochází k jeho změně - rychlosti, roviny polarizace, příklady: refraktometrie, polarimetrie, nefelometrie, turbidimetrie.
- **metody s měřením intenzity světla (spektrální):** výměně energie mezi látkou a elektromagnetickým zářením, závislost intenzity absorbovaného či emitovaného záření (atomy nebo molekulami) na vlnové délce, vznik spektra, příklady: absorpční, emisní, zákalové, fluorescentní.



Obr.3. Oblast elektromagnetického spektra (KLOUDA, 2003).

Spektrofotometrické metody jsou založené na reakci organické kyseliny s látkou citlivou na světlo nebo barvivem, které vede ke vzniku sloučeniny nebo barevného komplexu, u kterého pak určujeme vlnovou délku. Aby se zabránilo rušivým vlivům, izoluje se organická kyselina srážením pomocí pryskyřicového iontoměniče.

Rebelein ve své studii prezentuje jedno z prvních spektrofotometrických stanovení kyseliny jablečné, vinné a mléčné (REBELEIN, 1961). Kyseliny byly odděleny pomocí pryskyřicového iontoměniče. Eluční činidlo prošlo několikrát vzorkem, za účelem vytvoření barevného rozdílu jednotlivých sloučenin. Tento barevný rozdíl byl měřen při několika vlnových délkách, 490 nm kyselina vinná, 420 nm kyselina jablečná a 530, nebo 570 nm kyselina mléčná (REBELEIN, 1961). Jiné metody pro stanovení kyseliny vinné jsou popsány v publikaci. V podstatě se jedná o metody lišící se způsobem přípravy vzorků, aby se zabránilo rušivým vlivům barvy vína při automatizaci procesu (ALONSO *et al.*, 1998).

Využití infračervené spektrometrie k analýze hroznového moštu a vína, lze rozdělit do dvou oblastí elektromagnetického spektra. První oblast blízká infračervená = Near Infra-Red NIR (COZZOLINO *et al.*, 2004; GARCIAJARES *et al.*, 1997) a střední oblast = Middle Infra-Red spektrometry MIR (PATZ *et al.*, 2004; SCHINDLER *et al.*, 1998; SORIANO *et al.*, 2007; TARANTILIS *et al.*, 2008). Metody IČ-spektrometrie představují rychlou analýzu velkého množství vzorků bez potřeby nákladné a časově náročné předpřípravy (KESSLER, 2007; LACHENMEIER, 2007).

Absorpce v blízké oblasti IČ zobrazuje spektrum, kde jsou zastoupeny převážně sloučeniny s C-H vazbami, zatím co střední oblast IČ zobrazuje spektra spíše pro C-O, O-H a N-H vazeb (BAUER *et al.*, 2008). Silné absorpční pásy v MIR oblasti zobrazují velké množství ostrých píků. Na druhou stranu, v této oblasti vysoce absorbují vzorky obsahující vysoké množství vody a organických sloučenin, jako jsou víno nebo džusy. Proto není vhodné používat dlouhovlnnou MIR oblast pro analýzu vína. Potřeba dlouhovlnné cesty až několik mikrometrů vede ke konstrukčním problémům, zvláště pokud se jedná o vysoce viskózní a abrazivní vzorky. Harrick a Fahrenfort ve svých studiích poprvé prezentují možnou alternativu v této oblasti a to techniku používající zeslabení celkového odrazu ATR FTIR spektrometrie (FAHRENFORT, 1961; HARRICK, 1963).

Principem je průchod infračerveného paprsku vzorkem, který má vyšší index lomu než okolní vzduch. Dochází k úplnému odrazu a paprsek postupuje, uvnitř hranolu podobně jako uvnitř optického vlákna. Část paprsku se ztratí při dotyku se vzorkem a dojde k zeslabení odraženého paprsku. Získáme tedy infračervené spektrum vzorku. Obvykle se tato metoda používá pro analýzu kapalných a pevných vzorků (GIESEN, 1998). V ATR spektrometrii míra absorpce IČ paprsku do vzorku je závislá na vlnové délce a na indexu lomu vzorku (až do 3 μm v závislosti na nastavení). Mnohem nižší je pro spektrometry měřící transmissi (10-50 μm). Vzhledem k těmto parametrům, lze ATR spektrometrii částečně využít i při analýze vodných vzorků, které absorbují ve větší míře absorpčního spektra.

Infračervená spektrometrie (IČ) byla úspěšně použita pro monitorování fermentace. V této práci byla použita IČ kalibraci pro analýzu jednotlivých fází kvasícího moštu (URTUBIA *et al.*, 2004). Během fermentace byly sledovány tyto látky: glukóza, fruktóza, glycerol, etanol a organické kyseliny; jablečná, vinná, jantarová, mléčná, octová a citronová (PATZ *et al.*, 2004; SCHINDLER *et al.*, 1998). Další výhody metody jsou vysoký stupeň automatizace, vysoká propustnost vzorku, jednoduchá

příprava vzorku, a nízké náklady na analýzu. Nevýhodou je vysoká cena přístroje a potřeby přesné kalibrace pro stanovované látky. Obecně platí, že tyto metody jsou dostatečně přesné, ale předchozí kalibrace s velkým počtem vzorků je důležitá. Dobré výsledky z FTIR analýzy byly získány při celkové charakterizaci vzorků, sledováním množství etanolu, celkový obsah kyselin, celkový obsah cukrů a síranů (COZZOLINO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2004). Etanol, organické kyseliny a jiné sloučeniny, přítomné ve vyšších koncentracích mohou produkovat rušivé látky pro absorpční pásy infračervené analýzy.

Viditelná (VIS) a blízká infračervená spektrometrie (NIRS) byly použity k měření koncentrace prvků v australských vínech, 32 bílých a 94 červených odrůd. Tato studie prokázala vztahy mezi spektry z NIR oblasti a některými prvky obsaženými ve víně. V případě kvantitativní analýzy studovaných látek je nutné provést jejich kalibraci (COZZOLINO *et al.*, 2007; COZZOLINO *et al.*, 2008). Doplnění studie o zkoumání vlivu teploty na VIS-NIRS spektra, který byl potvrzen u červených i bílých vín. Hlavní změny pozorované v NIR spektrech vzorků vín kolem 970 nm a 1400 nm změny OH vazeb. U vzorků měřených při teplotě od 30°C a 35°C nebyla prokázána změna, je tato teplota vhodná k dalším analýzám.

K celkové charakterizaci hroznové šťávy a vína lze využít infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací. Tato metoda umožňuje komplexní využití pro analýzu etanolu, cukru a kyselin. Vzhledem k možnosti variabilního nastavení délky dráhy je toto nastavení vhodné pro stanovení kyselin. Oproti tomu nastavení pevné délky dráhy, je vhodnější spíše pro etanol a cukry (FRIEDEL *et al.*, 2013). Užitečnost infračervené spektroskopie je dalo by se říci neomezená, vzhledem k její možnosti určit všechny složky hroznové šťávy a vína (MARCHAL *et al.*, 2015).

4.4. Enzymatické techniky

Enzymatické metody byly využívány převážně pro kvantitativní stanovení kyseliny jablečné, mléčné a citrónové v hroznové šťávě a víně. Lze je použít i pro stanovení dalších kyselin, jako jsou např. kyselina vinná, octová, askorbová, mravenčí, glukonová, citronová, šťavelová a jantarová (BOEHRINGER, 1997; BERGMAYER, 1974).

Principem enzymatických metod je měření nárůstu, nebo poklesu absorbance koenzymů NADH (nikotin amid-adenindinukleotid), nebo NADPH (nikotinamid-adenin dinukleotid-fosfát), které absorbují v oblasti vzdálených vlnových délek

(BOEHRINGER,1997; GAO *et al.*, 1995; LUPU *et al.*, 2004). Pro měření absorpce je obvykle využíván spektrofotometr s vlnovou délkou 340 nm. Hlavní výhodou této metody je vysoká specifita. Lze ji použít pro stanovení L a D izomerů některých kyselin. Při tomto měření lze stanovit pouze jednu z organických kyselin, z toho plyne jedna nevýhoda časové náročnosti.

Možnost jak snížit čas analýzy je využití Flow Injection Analysis = FIA (průtokové injekční analýzy). Puchades stanovil současně kyselinu jablečnou a mléčnou ve vzorku vína za použití FIA v otevřeném reaktoru s enzymatickou imobilizací (PUCHADES *et al.*, 1991).

Také studie Lima *et al.* prezentuje stanovení dvou kyselin ve víně s využitím FIA a spektrofotometrické detekce (LIMA *et al.*, 1998). Vstříkovací systém je propojený s vstříkovací jednotkou v jedné rovině, pro sledování přesného složení vzorku na analýzu. Následuje enzymatická reakce s NADH nebo NADPH a pozorujeme dva píky odpovídající sledovaným kyselinám.

Mataix *et al.* prezentují posun v této metodě, využil FIA s fotometrickou detekcí spolu s fluorimetrickou detekcí při vlnových délkách 340 a 460 nm (MATAIX *et al.*, 2001a; MATAIX *et al.*, 2001b). Srovnání těchto dvou technik detekce ukazuje, že fluorimetrie je levnější, umožňuje opakovatelnost, není zapotřebí takové množství enzymu, ale ukazuje nižší detekční limit oproti fotometrii. Silva přinesl v této technice optimalizaci měřícího procesu, která měla za cíl splnit tyto charakteristiky metody: rychlý, přesný, nevyžaduje žádnou předpřípravu vzorku a lineární odezvu (LUQUE DE CASTRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2002). Velký rozvoj v této technice nastal, upravením stávajícího měření a vytvořením nového multifunkčního přístroje. Stávající průtokový systém přístroje byl rozšířen o třicestný ventil k multi-analýze změnou průtoku vzorku (FERNANDES *et al.*, 2006). Multifunkční průtočný systém spojený s dialyzační jednotkou, pro zředění vzorku, umožňuje spektrofotometrické stanovení kyseliny vinné a draslíku v portském víně (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Navržená metoda byla použita pro analýzu 30 vzorků.

Využití biosenzorů pro analýzu kyselin jablečné a mléčné ve víně, pět bílých a pět červených vzorků vín (LUQUE DE CASTRO *et al.*, 2005; MAZZEI *et al.*, 2007). Tato metoda se vyznačuje vysokou opakovatelností, krátkou dobou odezvy a nízkými náklady na analýzu.

Enzymatické metody jsou často používány jako referenční metody za účelem ověření správnosti chromatografických metod: HPLC a iontové chromatografie (FRAYNE,

1986; KUPINA *et al.*, 1991) a také pro ověřování z kapilární elektroforézy (KANDL *et al.*, 1999). Jejich velkou výhodou je možnost sledovat průběh jablečno-mléčného kvašení a v případě potřeby jej regulovat.

4.5. Titrační techniky

Titrace patří mezi základní analytické techniky, běžně používané v laboratořích pro kvantitativní analýzu (BETTERRIDGE, 1981; OUGH *et al.*, 1988).

Zabývá se stanovením neznámé koncentrace známého objemu vzorku (titru) pomalým přidáváním určitého objemu titračního standardu (o známé koncentraci). Spotřebujeme takové množství titračního činidla, aby stanovovaná látka zreagovala beze zbytku do tzv. bodu ekvivalence. Abychom jednoznačně a přesně zjistili, kdy nastal bod ekvivalence, přidává se do titrovaného roztoku tzv. indikátor, který změní své zabarvení v bodě ekvivalence. Další analytické metody, které využívají při stanovení bodu ekvivalence, jsou tzv. instrumentální např. potenciometrická a konduktometrická titrace. Norton *et al.* a Ryan *et al.* ve svých studiích prezentují stanovení kyselin v hroznové šťávě a víně za využití titrační metody (NORTON *et al.*, 1988; RYAN *et al.*, 1973). Titrací zjišťujeme celkový obsah kyselin nebo spíš kyseliny vinné v hroznové šťávě nebo víně. Tuto metodu nelze použít pro stanovení jednotlivých kyselin.

Potenciometrická titrace patří do technik, které poskytují spolehlivé výsledky o obsahu kyselin ve vzorku. Rajkovic prezentuje ve svých pracích sledování vlivu jiných organických látek obsažených v hroznové šťávě nebo víně na obsah kyselin u bílých a modrých odrůd (RAJKOVIC, 2007; RAJKOVIC, 2009). Při stanovení celkového obsahu kyselin u několika druhů vín potenciometrickou titrací, se neobjevila vliv jiných látek na jeho složení. Potenciometrická titrace, tedy doplněná klasická voltametrická titrace o měření elektrochemického potenciálu, ukazuje velmi dobré výsledky pro analýzu bílých i červených vín v 37 vzorcích (BUDIĆ-LETO *et al.*, 2009). Obě metody lze použít pro detekci celkového obsahu kyselin v různých vzorcích. Hlavní výhodou je úspora času, objektivita a přesnost metody, jakož i minimalizace možné kontaminace vzorku, protože je vzorek během měření uzavřen (BUDIĆ-LETO *et al.*, 2009).

Klasická titrace se obvykle provádí čtyřikrát, z toho poprvé je jen orientační. Pracujeme s 1-10 ml vzorku, který zředíme na 150 ml destilovanou vodou a titrujeme 0,1 N hydroxidem sodným, za použití skleněné elektrody do pH 8,8 (PEREZ-CABALLERO

et al., 2003). Koncový bod nebo také, bod ekvivalence je považován za hodnotu, kdy pH dosáhlo maximální změny s přidáním alkalické báze (PAVLOUŠEK, 2011). Tato hodnota je pro každý typ ovoce různá, pohybuje se v rozmezí 7,2 až 8,4 (BOULTON *et al.*, 2012; PAVLOUSEK *et al.*, 2011).

Při titraci červené hroznové šťávy nebo vína lze náhlou změnu barvy těžce postřehnout. Pro přesnější stanovení kyselin může být použit pH-metr nebo indikační papír. Můžeme také využít stanovení kyselin pomocí titrace hydroxidem sodným za využití aktivního uhlí, které nám sledovaný vzorek v bodě ekvivalence odbarví (STEIDL, 2010).

Stanovení kyseliny jablečné a vinné se většinou provádí ve specializovaných laboratořích, které využívají jiné analytické techniky. Titraci mohou využívat malovinaři-orientačně pro zjištění obsahu kyselin v hroznové šťávě nebo víně. Pro přesné údaje je vhodné se obrátit na akreditovanou laboratoř.

5. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo shrnout všechny možné analytické metody využívané pro stanovení kyseliny jablečné a kyseliny vinné v hroznové šťávě a víně.

Metody byly rozděleny a dále zpracovány do 5 kategorií: chromatografické, elektrochemické, spektroskopické, enzymatické a titrační metody.

Z chromatografických metod zaujímá největší zastoupení v oblasti zjišťování obsahu organických kyselin ve víně kapalinová chromatografie, nebo spíše rychle se rozvíjející vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Její spojení i s jinými technikami vede k velmi rychlé analýze velkého množství vzorků s nízkou spotřebou vzorku. Propojení chromatografie se spektroskopickými nebo enzymatickými technikami vede výrazně k urychlení analýzy s možnou identifikací i dalších látek obsažených ve víně. Dle rozšířenosti elektrochemických metod patří k nejrozšířenějším kapilární elektroforéza (CE). V některých případech tato metoda vytlačuje oblíbenou HPLC, protože z hlediska analýzy dosahuje značné citlivosti a senzitivity.

Rozšíření dalších analytických technik z hlediska samostatnosti není příliš veliké. Jsou využívány hlavně v kombinaci s jinými technikami. Spektroskopické a enzymatické metody nepaří k příliš rozšířeným, spíše se využívají v propojení s jinou technikou, jako detektor. Jejich sériové zapojení vede k lepším a rychlejším výsledkům analýz.

Klasické titrační metody jsou spíše na ústupu a nahrazují je přístroje využívající nejrůznější analytické vybavení. Setkat se s nimi ještě můžeme u malovinařů, ti tyto metody používají pro orientační zjištění obsahu kyselin. Potenciometrická titrace patří do technik, které poskytují spolehlivé výsledky o obsahu kyselin ve vzorku. Pro přesnější analýzu se obracejí na akreditované laboratoře, které využívají speciální analytické přístroje.

Zjištění zastoupení organických kyselin, jablečné a vinné, v hroznové šťávě a víně hraje při výrobě vína významnou roli. Ovlivňuje výslednou chuť a vypovídá o kvalitě i zralosti hroznů.

V dobrém slunečném roce je v hroznech větší podíl kyseliny vinné. Ve špatném naopak kyseliny jablečné, která se však dá odbourat pomocí mikrobů tzv. jablečno-mléčnou fermentací.

6. Souhrn

Nejvýznamnější organické kyseliny obsažené v hroznové šťávě a víně jsou kyselina jablečná a vinná. Detekovat je v kapalných vzorcích můžeme několika různými analytickými metodami.

Cílem práce bylo porovnat různé analytické techniky používané pro jejich kvalitativní i kvantitativní analýzu. Jednotlivé metody byly rozděleny do 5 základních skupin: chromatografické, elektrochemické, spektroskopické, enzymatické a titrační. Následně byly postupně rozepsány a shrnuty. Některé z těchto metod jsou už na ústupu, nebo se používají jen v omezené míře, převážně u malovinařů. K nejrozšířenějším metodám a stále populárním patří chromatografie v kombinaci s několika typy detektorů, její spojení s ostatními přístroji a i jejich sériové zapojení. Nejrozšířenější v této oblasti je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která je díky svým vlastnostem výjimečná. V posledních letech jí začala konkurovat kapilární elektroforéza díky svým specifickým vlastnostem, např. jednoduchosti, vysokému rozlišení, krátké době analýzy a minimální úpravě vzorku. Neustálý rozvoj přístrojové techniky posouvá nároky čím dál výš. Zvyšují se požadavky kladené na přístroje, přesnějšívětší detekční limity, kratší doby analýzy a zkoušejí se různé kombinace zařízení, které by přinesly úspory v analýze.

Klíčová slova: kyselina jablečná, kyselina vinná, chromatografické metody, elektrochemické, spektroskopické, enzymatické a titrační metody

Resume

Malic acid and tartaric acids are the most important organic acids in grape juice and wine. They can be detected in liquid samples by several different analytical methods.

The aim of this work was to compare various analytical techniques used for the qualitative and quantitative analysis in grape juice and wine. Individual methods were divided into 5 groups: chromatographic, electrochemical, spectroscopic, enzymatic methods and titration. These methods were described in details and summarized. Some of these methods are already in decline or they are utilized by small winemakers, only. The most commonly used methods include chromatographic techniques in combination with various types of detectors, its connection with other devices, and even their series connection. The most widespread method in this area is the high performance liquid chromatography (HPLC), especially for its exceptional properties. Recently, capillary electrophoresis has begun to compete with chromatography due to its specific characteristics such as its simplicity, high resolution, short analysis time and minimal modification of the sample. The constant evolution of instrumentation shifts overall demands increasingly higher. These are namely the increasing requirements for the device, more exact detection limits, and shorter time of analysis. Additionally, various combinations of equipment are tested which would decrease expenses for analysis.

Keywords: malic acid, tartaric acid, chromatography technique, electrochemistry, spectroscopy, enzymatic and titration technique

7. Reference

- AGENCY, U. F. S. 2011. Current EU approved additives and their E Numbers <http://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist>, 2011.
- AGENCY, U. F. S. 2014. Current EU approved additives and their E Numbers <http://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist>, 2014.
- ALONSO, E. V.; DE TORRES, A. G.; MOLINA, A. R. et al. 1998. Determination of organic acids in wines. A review. *Quimica Analitica*, 1998, vol. 17, no. 4, p. 167-175. ISSN 0212-0569.
- BARDEN, T. J.; CROFT, M. Y.; MURBY, E. J. et al. 1997. Gas chromatographic determination of organic acids from fruit juices by combined resin mediated methylation and extraction in supercritical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 1997, vol. 785, no. 1-2, p. 251-261. ISSN 0021-9673.
- BARTEK, I. 2012. Malic Acid http://www.bartek.ca/malic_acid.html, 2012.
- BAUER, K.; GROS, L.; SAUER, W. 1991. *Thin Layer Chromatography: An Introduction*. EM SCIENCE, 1991.
- BAUER, R.; NIEUWOUDT, H.; BAUER, F. F. et al. 2008. FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical Chemistry*, 2008, vol. 80, no. 5, p. 1371-1379. ISSN 0003-2700.
- BERGMAYER, H. U. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*. ISBN 9783527253708.
- BETTERRIDGE, D. 1981. *Methods for the Analysis of Musts and Wines* : M. A. Amerine and C. S. Ough, Wiley, New York, 1980. £19.00. Pp. X + 341. *Talanta*, 1981, vol. 28, no. 5, p. iii-iv. ISSN 0039-9140.
- BOEHRINGER MANNHEIM GmbH. *Biochemicals, Enzymatic bioanalysis. Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis using test-combinations*, 68298 Mannheim, Germany, 1997, 159 p.
- BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F. et al. 2012. *Principles and Practices of Winemaking*. Springer US, 2012. The Chapman & Hall enology library. ISBN 9781461357186.
- BRUN, S.; CABANIS, J. C.; MESTRES, J. P. 1986. *Analytical chemistry*. *Experientia*, 1986, vol. 42, no. 8, p. 893-904. ISSN 0014-4754.
- BUDIĆ-LETO, I.; MEŠIN, N.; GAJDOŠ KLJUSURIĆ, J. et al. 2009. Comparative study of the total acidity determination in wine by potentiometric and volumetric titration. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2009, vol. 74, no. 1, p. 61-65.
- BUIARELLI, F.; CARTONI, G.; COCCIOLI, F. et al. 2003. Capillary zone electrophoresis of some organic acids in milk whey. *Journal of Separation Science*, 2003, vol. 26, no. 5, p. 425-428. ISSN 1615-9314.
- BUSER, H. R.; ZANIER, C.; TANNER, H. 1982. Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, vol. 30, no. 2, p. 359-362.
- CACCAMO, F.; CARFAGNINI, G.; DICORCIA, A. et al. 1986. Improved High-Performance Liquid-Chromatographic assay for determining organic-acids in wines. *Journal of Chromatography*, 1986, vol. 362, no. 1, p. 47-53. ISSN 0021-9673.
- CASELLA, I. G.; GATTA, M. 2002. Determination of aliphatic organic acids by high-performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no. 1, p. 23-28. ISSN 0021-8561.

- CASTELLARI, M.; VERSARI, A.; SPINABELLI, U. et al. 2000. An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2000, vol. 23, no. 13, p. 2047-2056. ISSN 1082-6076.
- CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N. et al. 2007. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. 2007.
- CORTACERO-RAMIREZ, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; DE CASTRO, M. H. B. et al. 2005. Determination of low-molecular-mass organic acids in any type of beer samples by coelectroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1064, no. 1, p. 115-119. ISSN 0021-9673.
- COZZOLINO, D.; KWIATKOWSKI, M. J.; PARKER, M. et al. 2004. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 513, no. 1, p. 73-80. ISSN 0003-2670.
- COZZOLINO, D.; LIU, L.; CYNKAR, W. U. et al. 2007. Effect of temperature variation on the visible and near infrared spectra of wine and the consequences on the partial least square calibrations developed to measure chemical composition. *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 588, no. 2, p. 224-230.
- COZZOLINO, D.; KWIATKOWSKI, M. J.; DAMBERGS, R. G. et al. 2008. Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Talanta*, 2008, vol. 74, no. 4, p. 711-716.
- CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O.; FARIA, M. A. et al. 2002. Quantification of organic acids in grape musts and Port wines. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 2002, vol. 3, no. 4, p. 212-216. ISSN 1135-8122.
- DAVÍDEK, J. J., GUSTAV. POKORNÝ, JAN. 1983. *Chemie potravin: učebnice pro vys. školy chemickotechnologické*. 1. vyd. Praha: SNTL, 629 s., 1983.
- DE VILLIERS, A.; LYNEN, F.; CROUCH, A. et al. 2003. A robust capillary electrophoresis method for the determination of organic acids in wines. *European Food Research and Technology*, 2003, vol. 217, no. 6, p. 535-540. ISSN 1438-2377.
- DENG, C. 1997. [Determination of total organic acids in wine by interfacial derivatization gas chromatographic method]. *Se pu = Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui*, 1997, vol. 15, no. 6, p. 505-507. ISSN 1000-8713.
- DESMEDT, P.; LIDDLE, P. A. P.; CRESTO, B. et al. 1981. The analysis of non-volatile constituents of wine by Glass-Capillary Gas-Chromatography. *Journal of the Institute of Brewing*, 1981, vol. 87, no. 6, p. 349-351. ISSN 0046-9750.
- DING, M. Y.; KOIZUMI, H.; SUZUKI, Y. 1995. Comparison of 3 Chromatographic systems for determination of organic-acids in wine. *Analytical Sciences*, 1995, vol. 11, no. 2, p. 239-243. ISSN 0910-6340.
- ECKERLE, A. 2001. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: From print to electronic*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2001, vol. 221, p. U282-U282. ISSN 0065-7727.
- ENDELMANN, A.; DIEWOK, J.; BAENA, J. R. et al. 2003. High-performance liquid chromatography with diamond ATR-FTIR detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in red wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, vol. 376, no. 1, p. 92-97. ISSN 1618-2642.
- ESTEVEES, V. I.; LIMA, S. S. F.; LIMA, D. L. D. et al. 2004. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 513, no. 1, p. 163-167. ISSN 0003-2670.

- FAHRENFORT, J. 1961. Attenuated total reflection - A new principle for the production of useful Infra-Red Reflectionspectra of organic compounds. *Spectrochimica Acta*, 1961, vol. 17, no. 7, p. 698-&.
- FANTOZZI, P.; BETSCHART, A. A. 1979. Development of grapeseed protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1979, vol. 56, no. 3, p. 457-459.
- FANTOZZI, P. 1981. Grape seed: A potential source of protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1981, vol. 58, no. 12, p. 1027-1031.
- FERNANDES, E. N.; REIS, B. F. 2006. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process. *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 557, no. 1-2, p. 380-386. ISSN 0003-2670.
- FINGLAS, P. M. 1993. Food composition data: Production, Management and use: by H. Greenfield and D.A.T. Southgate, Elsevier, 1992. £70.00 (ix + 243 pages) ISBN 1 85166 881 0. *Trends in Food Science & Technology*, 1993, vol. 4, no. 6, p. 198-199. ISSN 0924-2244.
- FRAYNE, R. F. 1986. Direct analysis of the major organic-components in grape must and wine using High-Performance Liquid-Chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1986, vol. 37, no. 4, p. 281-287. ISSN 0002-9254.
- FRIEDEL, M.; PATZ, C. D.; DIETRICH, H. 2013. Comparison of different measurement techniques and variable selection methods for FT-MIR in wine analysis. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 4, p. 4200-4207. ISSN 0308-8146.
- FU, X. Y.; LU, J. D.; CHEN, Y. Z. 1997. Separation and determination of organic acids in foods by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 1997, vol. 18, no. 9, p. 1453-1455. ISSN 0251-0790.
- FUNG, Y. S.; LAU, K. M. 2003. Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, no. 18, p. 3224-3232. ISSN 0173-0835.
- GALLI, V.; BARBAS, C. 2004. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1032, no. 1-2, p. 299-304. ISSN 0021-9673.
- GAO, C.; FLEET, G. H. 1995. Degradation of Malic and Tartaric-acids by High-Density Cell-Suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology*, 1995, vol. 12, no. 1, p. 65-71. ISSN 0740-0020.
- GARCIA, A.; BARBAS, C. 2003. Capillary electrophoresis for the determination of organic acidurias in body fluids: A review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003, vol. 41, no. 6, p. 755-761. ISSN 1434-6621.
- GARCIAJARES, C. M.; MEDINA, B. 1997. Application of multivariate calibration to the simultaneous routine determination of ethanol, glycerol, fructose, glucose and total residual sugars in botrytized-grape sweet wines by means of near-infrared reflectance spectroscopy. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1997, vol. 357, no. 1, p. 86-91. ISSN 0937-0633.
- GIESEN, H. G. 1998. IR-Spektroskopie für Anwender. Von W. Gottwald und G. Wachter. Hrsg. U. Gruber und W. Klein in der Serie: Die Praxis der instrumentellen Analytik. Wiley-VCH Weinheim 1977; 294 S. mit 166 Abbildungen und 20 Tabellen, kartoniert DM 68. *Pharmazie in unserer Zeit*, 1998, vol. 27, no. 4, p. 197-197. ISSN 1615-1003.
- HARRICK, N. J. 1963. Total internal reflection and its application to surface studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1963, vol. 101, no. 3, p. 928-&. ISSN 0077-8923.
- HEIGER, D. N. 2000. High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction. Agilent Technologies, 2000.

- HEPNER, L. A. A. 2011. Consultants to Management in Biotechnology <http://www.lhepner.com/food>, 2011.
- HUANG, X. H.; LUCKEY, J. A.; GORDON, M. J. et al. 1989. Quantitative-Analysis of low-molecular weight carboxylic-acids by Capillary Zone Electrophoresis Conductivity detection. *Analytical Chemistry*, 1989, vol. 61, no. 7, p. 766-770. ISSN 0003-2700.
- HUDELSON, J. 2011. Wine faults : causes, effects, cures. San Francisco, CA: Wine Appreciation Guild, 2011. ISBN 9781934259634 1934259632.
- HUNTER, J. J.; DEVILLIERS, O. T.; WATTS, J. E. 1991. The effect of partial defoliation on quality characteristics of Vitis-Vinifera L CV Cabernet-Sauvignon grapes .2. Skin color, skin sugar, and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1991, vol. 42, no. 1, p. 13-18. ISSN 0002-9254.
- CHAMPAGNOL, F.; BOURZEIX, M. 1971. Identification des sucres contenus dans un extrait végétal et évaluation de leurs teneurs individuelles par chromatographie et photodensitometrie. *Journal of Chromatography A*, 1971, vol. 59, no. 2, p. 472-475. ISSN 0021-9673.
- IZCO, J. M.; TORMO, M.; JIMENEZ-FLORES, R. 2002a. Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 2002a, vol. 85, no. 9, p. 2122-2129. ISSN 0022-0302.
- IZCO, J. M.; TORMO, M.; JIMENEZ-FLORES, R. 2002b. Development of a CE method to analyze organic acids in dairy products: Application to study the metabolism of heat-shocked spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002b, vol. 50, no. 7, p. 1765-1773. ISSN 0021-8561.
- JACKSON, R. S. 2014. 6 - Chemical Constituents of Grapes and Wine. In Jackson, R. S. *Wine Science (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, 2014. p. 347-426. ISBN 978-0-12-381468-5.
- JEFFERY, K. 1994. The Oxford companion to wine - Robinson, J., Editor. *The Times Literary Supplement*, 1994, no. 4784, p. 24-24. ISSN 0307-661X.
- JENSEN, W. B. 2007. The origin of the names malic, maleic, and malonic acid. *Journal of Chemical Education*, 2007, vol. 84, no. 6, p. 924-924. ISSN 0021-9584.
- JUN, X. A.; LIMA, J.; MONTENEGRO, M. 1996. Simultaneous determination of inorganic anions and carboxylic acids in wine using isocratic separation on a permanently coated reversed-phase column and UV indirect detection. *Analytica Chimica Acta*, 1996, vol. 321, no. 2-3, p. 263-271. ISSN 0003-2670.
- KANDL, T.; KUPINA, S. 1999. An improved capillary electrophoresis procedure for the determination of organic acids in grape juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1999, vol. 50, no. 2, p. 155-161. ISSN 0002-9254.
- KELLY, L.; NELSON, R. J. 1993. Capillary Zone Electrophoresis of organic-acids and anions. *Journal of Liquid Chromatography*, 1993, vol. 16, no. 9-10, p. 2103-2112. ISSN 0148-3919.
- KENNEDY, J. F.; PANESAR, P. S. 2005. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*, 2nd ed., P.R. Ashurst (Ed.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK (2005). *Carbohydrate Polymers*, 2005, vol. 61, no. 2, p. 249. ISSN 0144-8617.
- KENNEY, B. F. 1991. Determination of organic-acids in food samples by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1991, vol. 546, no. 1-2, p. 423-430. ISSN 0021-9673.
- KESSLER, W. 2007. *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma, Bio- und Prozessanalytik*. Wiley, 2007. ISBN 9783527609666.

- KIM, K. R.; HAHN, M. K.; ZLATKIS, A. et al. 1989. Simultaneous Gas-Chromatography of volatile and nonvolatile carboxylic-acids as Tert-Butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography*, 1989, vol. 468, p. 289-301. ISSN 0021-9673.
- KLAMPFL, C. W.; KATZMAYR, M. U.; BUCHBERGER, W. 1998. Separation of inorganic and organic anions by capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect UV and conductivity detection. *Electrophoresis*, 1998, vol. 19, no. 14, p. 2459-2464. ISSN 0173-0835.
- KLAMPFL, C. W. 1999. Analysis of organic acids and inorganic anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no. 3, p. 987-990. ISSN 0021-8561.
- KLAMPFL, C. W.; BUCHBERGER, W.; HADDAD, P. R. 2000. Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 881, no. 1-2, p. 357-364. ISSN 0021-9673.
- KLOUDA, P. 2003. *Moderní analytické metody*. 2003. ISBN 8086369072, 9788086369075.
- KOTANI, A.; MIYAGUCHI, Y.; TOMITA, E. et al. 2004. Determination of organic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection during wine brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no. 6, p. 1440-1444. ISSN 0021-8561.
- KUPINA, S. A.; POHL, C. A.; GANNOTTI, J. L. 1991. Determination of Tartaric, Malic, and Citric acids in grape juice and wine using Gradient Ion Chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1991, vol. 42, no. 1, p. 1-5. ISSN 0002-9254.
- KYZLINK, V. 1988. *Teoretické základy konzervace potravin*. Státní nakladatelství technické literatury 1988: 1988.
- LACHENMEIER, D. W. 2007. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 2007, vol. 101, no. 2, p. 825-832. ISSN 0308-8146.
- LEVI, V.; WEHR, T.; TALMADGE, K. et al. 1993. Analysis of organic-acids in wines by Capillary Electrophoresis and HPLC. *American Laboratory*, 1993, vol. 25, no. 1, p. 29-32. ISSN 0044-7749.
- LI, X.; MA, X.; ZHAO, Y. et al. 2007. Isolation and characterization of a new bacterium capable of biotransforming cis-epoxysuccinic acid to D(-)-tartaric acid. *Fems Microbiology Letters*, 2007, vol. 267, no. 2, p. 214-220. ISSN 0378-1097.
- LIMA, J. L. F. C.; LOPES, T. I. M. S.; RANGEL, A. O. S. S. 1998. Enzymatic determination of L(+) lactic and L(-) malic acids in wines by flow-injection spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 1998, vol. 366, no. 1-3, p. 187-191. ISSN 0003-2670.
- LINGET, C.; NETTER, C.; HEEMS, D. et al. 1998. On-line dialysis with HPLC for the automated preparation and analysis of amino acids, sugars and organic acids in grape juice and wines. *Analisis*, 1998, vol. 26, no. 1, p. 35-39. ISSN 0365-4877.
- LLORENTE, M.; VILLARROYA, B.; Reverse-Phase HPLC of organic-acids in musts. *Chromatographia*, 1991, vol. 32, no. 11-12, p. 555-558. ISSN 0009-5893.
- LOPEZ, E. F.; GOMEZ, E. F. 1996. Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol, and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *Journal of Chromatographic Science*, 1996, vol. 34, no. 5, p. 254-257. ISSN 0021-9665.
- LOPEZTAMAMES, E.; PUIGDEU, M. A.; TEIXEIRA, E. et al. 1996. Organic acids, sugars, and glycerol content in white winemaking products determined by HPLC: Relationship to climate and varietal factors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1996, vol. 47, no. 2, p. 193-198. ISSN 0002-9254.

- LUPU, A.; COMPAGNONE, D.; PALLESCHI, G. 2004. Screen-printed enzyme electrodes for the detection of marker analytes during winemaking. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 513, no. 1, p. 67-72. ISSN 0003-2670.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ-JUAN, P. 2005. Analytical Methods in Wineries: Is It Time to Change? *Food Reviews International*, 2005, vol. 21, no. 2, p. 231-265. ISSN 8755-9129.
- MARCHAL, A.; GENIN, E.; WAFFO-TEGUO, P. et al. 2015. Development of an analytical methodology using Fourier transform mass spectrometry to discover new structural analogs of wine natural sweeteners. *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 853, p. 425-434. ISSN 0003-2670.
- MASÁR, M.; KANIANSKY, D.; BODOR, R. et al. 2001. Determination of organic acids and inorganic anions in wine by isotachopheresis on a planar chip. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 916, no. 1-2, p. 167-174. ISSN 0021-9673.
- MASSON, P. 2000. Influence of organic solvents in the mobile phase on the determination of carboxylic acid and inorganic anions in grape juice by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 881, no. 1-2, p. 387-394. ISSN 0021-9673.
- MATAIX, E.; DE CASTRO, M. D. L. 2001a. Determination of L-(-)-malic acid and L-(+)-lactic acid in wine by a flow injection-dialysis-enzymic derivatisation approach. *Analytica Chimica Acta*, 2001a, vol. 428, no. 1, p. 7-14. ISSN 0003-2670.
- MATAIX, E.; LUQUE DE CASTRO, M. D. 2001b. Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I280) and density in wines by flow injection. *Analyst*, 2001b, vol. 126, no. 2, p. 251-255.
- MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. 2005. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 2005, vol. 38, no. 10, p. 1175-1188. ISSN 0963-9969.
- MATO, I.; SUAREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. 2007. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*, 2007, vol. 102, no. 1, p. 104-112. ISSN 0308-8146.
- MAZZEI, F.; BOTRÈ, F.; FAVERO, G. 2007. Peroxidase based biosensors for the selective determination of D,L-lactic acid and L-malic acid in wines. *Microchemical Journal*, 2007, vol. 87, no. 1, p. 81-86. ISSN 0026-265X.
- MOREIRA, J. L.; SANTOS, L. 2004. Spectroscopic interferences in fourier transform infrared wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 513, no. 1, p. 263-268. ISSN 0003-2670.
- MORENO, M. D. G.; CAMPOY, C. J. J.; BARROSO, C. G. 2001. Method devised for determining low molecular weight organic acids in vinic samples by capillary electrophoresis: validation of the method with real samples. *European Food Research and Technology*, 2001, vol. 213, no. 4-5, p. 381-385. ISSN 1438-2377.
- NCBI. 2014. Taxonomy: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>, 2014.
- NORTON, K. M.; HEATHERBELL, D. A. 1988. A rapid, simple method for the estimation of malate and tartrate in grape juice. 1988. ISBN 0959786400.
- NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. 1983. Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages. Akademie-Verlag, 1983. Handbook of Aroma Research. ISBN 9789027715531.
- OLIVEIRA, S. M.; LOPES, T. I. M. S.; TOTH, I. V. et al. 2010. Simultaneous determination of tartaric acid and potassium in wines using a multicommuted flow system with dialysis. *Talanta*, 2010, vol. 81, no. 4-5, p. 1735-1741. ISSN 0039-9140.

- OTYEPKOVÁ, E. K., LIBOR. OTYEPKA, MICHAL. PANÁČEK, ALEŠ. 2004. Cvičení z vybraných fyzikálně-chemických metod <http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom.pdf>: Katedra fyzikální chemie, 2004.
- OUGH, C. S.; AMERINE, A. 1988. *Methods Analysis of Musts and Wines*. Wiley, 1988. Wiley-Interscience Publications. ISBN 9780471627579.
- PALLESCHI, G.; VOLPE, G.; COMPAGNONE, D. et al. 1994. Bioelectrochemical determination of lactic and malic-acids in wine. *Talanta*, 1994, vol. 41, no. 6, p. 917-923. ISSN 0039-9140.
- PATZ, C. D.; BLIEKE, A.; RISTOW, R. et al. 2004. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 513, no. 1, p. 81-89. ISSN 0003-2670.
- PAVLOUSEK, P.; KUMSTA, M. 2011. Profiling of Primary Metabolites in Grapes of Interspecific Grapevine Varieties: Sugars and Organic Acids. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011, vol. 29, no. 4, p. 361-372. ISSN 1212-1800.
- PAVLOUŠEK, P. 2011. *Pěstování révy vinné*. Grada Publishing a.s., 2011. ISBN 8024733145, 9788024733142.
- PAZO, M. T., C. CISNEROS, M. C. MONTERO, E. 1999. Determinación de ácidos orgánicos en vinos por C.L.A.R. *Alimentaria*. 1999, p. 139-142. ISSN 0300-5755
- PELEG, Y.; ROKEM, J. S.; GOLDBERG, I. et al. 1990. Inducible overexpression of the Fum1 gene in *Saccharomyces-Cerevisiae* - Localization of Fumarase and efficient Fumaric-acid bioconversion to L-Malic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, vol. 56, no. 9, p. 2777-2783. ISSN 0099-2240.
- PEREZ-CABALLERO, V.; AYALA, F.; ECHAVARRI, J. F. et al. 2003. Proposal for a new standard OIV method for determination of chromatic characteristics of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2003, vol. 54, no. 1, p. 59-62. ISSN 0002-9254.
- PRESECKI, A. V.; ZELIC, B.; VASIC-RACKI, D. 2007. Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, vol. 41, no. 5, p. 605-612. ISSN 0141-0229.
- PUCHADES, R.; HERRERO, M. A.; MAQUIEIRA, A. et al. 1991. Simultaneous enzymatic determination of l(-) malic acid and l(+) lactic acid in wine by flow injection analysis. *Food Chemistry*, 1991, vol. 42, no. 2, p. 167-182. ISSN 0308-8146.
- RAJKOVIC, M., NOVAKOVIC, IVANA AND PETROVIC,A. 2007. Determination of titratable acidity in white wine. *Journal of Agricultural Sciences*. 2007, vol. 52, p. 169-184.
- RAJKOVIC, M. B., SREDOVIC, IVANA D. 2009. The determination of titratable acidity and total tannins in red wine. *Journal of Agricultural Sciences*. 2009, vol. 54, p. 223-246.
- REBELEIN, H. 1961. Colorimetric determination of tartaric and lactic acids in wine and fruit juice. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 1961, vol. 57, p. 36-41.
- ROMERO, E. G.; MUNOZ, G. S.; ALVAREZ, P. J. M. et al. 1993. Determination of organic-acids in grape musts, wines and vinegars by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1993, vol. 655, no. 1, p. 111-117. ISSN 0021-9673.
- ROSELLO, S.; GALIANA-BALAGUER, L.; HERRERO-MARTINEZ, J. M. et al. 2002. Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, vol. 82, no. 10, p. 1101-1106. ISSN 0022-5142.

- ROSENBERG, M.; MIKOVA, H.; KRISTOFIKOVA, L. 1999. Production of L-tartaric acid by immobilized bacterial cells *Nocardia tartaricans*. *Biotechnology Letters*, 1999, vol. 21, no. 6, p. 491-495. ISSN 0141-5492.
- RYAN, J. J.; DUPONT, J. A. 1973. Identification and analysis of the major acids from fruit juices and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1973, vol. 21, no. 1, p. 45-49. ISSN 0021-8561.
- SAAVEDRA, L.; GARCIA, A.; BARBAS, C. 2000. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 881, no. 1-2, p. 395-401. ISSN 0021-9673.
- SAAVEDRA, L.; RUPEREZ, F. J.; BARBAS, C. 2001. Capillary electrophoresis for evaluating orange juice authenticity: a study on Spanish oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, no. 1, p. 9-13. ISSN 0021-8561.
- SAAVEDRA, L.; BARBAS, C. 2003. Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines. *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, no. 12-13, p. 2235-2243. ISSN 0173-0835.
- SACCANI, G.; GHERARDI, S.; TRIFIRO, A. et al. 1995. Use of Ion Chromatography for the measurement of organic-acids in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1995, vol. 706, no. 1-2, p. 395-403. ISSN 0021-9673.
- SHANGHAI, M., BIOCHEMICAL, CO., LTD. 2013. Online Database of Chemicals from Around the World <http://chemblink.com/products/6915-15-7.htm>, 2013.
- SCHINDLER, R.; VONACH, R.; LENDL, B. et al. 1998. A rapid automated method for wine analysis based upon sequential injection (SI)-FTIR spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1998, vol. 362, no. 1, p. 130-136. ISSN 0937-0633.
- SILVA, H.; ALVARES-RIBEIRO, L. 2002. Optimization of a flow injection analysis system for tartaric acid determination in wines. *Talanta*, 2002, vol. 58, no. 6, p. 1311-1318. ISSN 0039-9140.
- SORIANO, A.; PÉREZ-JUAN, P. M.; VICARIO, A. et al. 2007. Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 2007, vol. 104, no. 3, p. 1295-1303. ISSN 0308-8146.
- STAHL, E. 1969. *Thin-layer chromatography: A laboratory handbook*. Springer, 1969.
- STEIDL, R. 2010. *Sklepní hospodářství*. Narodni Vinařské Centrum, 2010. ISBN 8090320198, 9788090320192.
- SYMONDS, P. 1978. Applications of High-Performance Liquid-Chromatography to the determination of some organic-acids in wine. *Annales De La Nutrition Et De L Alimentation*, 1978, vol. 32, no. 5, p. 957-968. ISSN 0003-4037.
- TAKATA, I.; YAMAMOTO, K.; TOSA, T. et al. 1979. Screening of microorganisms having high fumarase activity and their immobilization with carrageenan. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1979, vol. 7, no. 2, p. 161-172. ISSN 0340-2118.
- TARANTILIS, P. A.; TROIANOU, V. E.; PAPPAS, C. S. et al. 2008. Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 2008, vol. 111, no. 1, p. 192-196. ISSN 0308-8146.
- TUSSEAU, D.; BENOIT, C. 1987. Routine High-Performance Liquid-Chromatographic determination of carboxylic-acids in wines and champagne. *Journal of Chromatography*, 1987, vol. 395, p. 323-333. ISSN 0021-9673.

- URTUBIA, A.; PEREZ-CORREA, J. R.; MEURENS, M. et al. 2004. Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy. *Talanta*, 2004, vol. 64, no. 3, p. 778-784. ISSN 0039-9140.
- VAHL, K.; KAHLERT, H.; BÖTTCHER, D. et al. 2008. A potential high-throughput method for the determination of lipase activity by potentiometric flow injection titrations. *Analytica Chimica Acta*, 2008, vol. 610, no. 1, p. 44-49.
- VAHL, K.; KAHLERT, H.; SCHOLZ, F. 2010. Rapid automatic determination of calcium and magnesium in aqueous solutions by FIA using potentiometric detection. *Electroanalysis*, 2010, vol. 22, no. 19, p. 2172-2178.
- VAHL, K.; KAHLERT, H.; VON MÜHLEN, L. et al. 2013. Determination of the titratable acidity and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis. *Talanta*, 2013, vol. 111, no. 0, p. 134-139. ISSN 0039-9140.
- VELÍŠEK, J. 2002a. *Chemie potravin: 1. OSSIS*, 2002a. ISBN 9788086659008.
- VELÍŠEK, J. 2002b. *Chemie potravin: 2. OSSIS*, 2002b. ISBN 9788086659015.
- VÉRETTE, E.; QIAN, F.; MANGANI, F. 1995. On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *Journal of Chromatography A*, 1995, vol. 705, no. 2, p. 195-203.
- VODRÁŽKA, Z. 1996. *Biochemie. Academia*, ISBN 80-200-0600-1.
- VOLPE, G.; MOSCONE, D.; COMPAGNONE, D. et al. 1995. In vivo continuous monitoring of L-lactate coupling subcutaneous microdialysis and an electrochemical biocell. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1995, vol. 24, no. 1-3, p. 138-141. ISSN 0925-4005.
- VONACH, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. 1998. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 824, no. 2, p. 159-167. ISSN 0021-9673.
- VORARAT, S.; AROMDEE, C.; PODOKMAI, Y. 2002. Determination of alpha hydroxy acids in fruits by capillary electrophoresis. *Analytical Sciences*, 2002, vol. 18, no. 8, p. 893-896. ISSN 0910-6340.
- WALL, P. E.; ROYAL SOCIETY OF, C. 2005. *Thin-layer Chromatography: A Modern Practical Approach*. Royal Society of Chemistry, 2005. RSC chromatography monographs. ISBN 9780854045358.
- WOOD, E. J. 1987. *Data for Biochemical Research (third edition): by R M C Dawson, D C Elliott, W H Elliott and K M Jones*, pp 580. Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1986. ISBN 0-19-855358-7. *Biochemical Education*, 1987, vol. 15, no. 2, p. 97. ISSN 0307-4412.
- YANG, M. H.; CHOONG, Y. M. 2001. A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C-2-C-12) volatile organic acids in foods. *Food Chemistry*, 2001, vol. 75, no. 1, p. 101-108. ISSN 0308-8146.

8. Seznam použitých zkratk

HPLC	High Performance Liquid Chromatography, vysokoučinná kapalinová chromatografie
NADP+	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate, nikotinamid-adenin- dinukleotid-fosfát
LC	Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie
GC	Gas Chromatography, plynová chromatografie
PC	Paper Chromatography, papírová chromatografie
TLC	Thin Layer Chromatography, tenkovrstvá chromatografie
FID	Flame Ionization Detector, plamenový ionizační detektor
MS	Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometr
IC	Ion Chromatography, iontová chromatografie
UV-VIS	Ultra-Violet–VISible spectroscopy, spektrofotometrický detektor
IR	Infra-Red spectroscopy, infračervený detektor
TCD	Thermal Conductivity Detector, vodivostní detektor
ATR	Attenuated Total Reflectance, horizontální zeslabení odrazu
CE	Capillary Electrophoresis, kapilární elektroforéza
CZE	Capillary Zone Electrophoresis, kapilární zónová elektroforéza
NIR	Near Infra-Red, oblast blízká infračervená
MIR	Middle Infra-Red, střední infračervená oblast
FIA	Flow Injection Analysis, průtoková injekční analýza