

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
ZAHRADNICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

LEDNICE 2016

ANETA JARŮŠKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici

ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ SACHARIDŮ V MOŠTU A VÍNĚ

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce
Ing. Lenka Tomášková

Vypracoval/a
Aneta Jarůšková

Lednice 2016



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Aneta Jarůšková**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Vinohradnictví a vinařství
Název tématu: **Analytické metody pro stanovení sacharidů v moštu a víně**
Rozsah práce: minimálně 30 stran

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu pojednávající o analytických metodách pro stanovení sacharidů v moštu a víně
2. Zpracujte literární rešerši na dané téma.
3. Uveďte doporučení, která ze studií a praxe vycházejí.

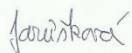
Seznam odborné literatury:

1. JANČÁŘOVÁ, I. – JANČÁŘ, L. – NÁPLAVOVÁ, A. Analýza vín – stanovení vybraných komponent. In *Aktuální aspekty pregraduální přípravy a postgraduálního vzdělávání učitelů chemie*. 1. vyd. Ostrava: Ostravská univerzita, 2010, s. 107–112. ISBN 978-80-7368-426-6.
2. PAVLOUŠEK, P. Cukernatost, kyseliny, hodnota pH a kvalita vína. *Vinař-sadař*. 2009. zv. 1, č. 5, s. 16–18. ISSN 1804-3054.
3. MALÍK, F. *Dobré víno*. 2. vyd. Bratislava: Polygrafia, 1996. 341 s. ISBN 80-88780-04-7.
4. MORENO, J. – PEINADO, R. *Enological chemistry*. 1. vyd. Waltham: Academic Press, 2012. 429 s. ISBN 978-0-12-388438-1.
5. FLAMINI, R. *Hyphenated techniques in grape and wine chemistry*. Chichester: John Wiley & sons, 2008. 345 s. ISBN 978-0-470-06187-9.
6. MINÁRIK, E. – NAVARA, A. *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1986. 547 s.
7. HERSTEIN, K M. – JACOBS, M B. *Chemistry and Technology of Wines and Liquors*. 2. vyd. B.m.n: 1951. 436 s.

Datum zadání bakalářské práce: leden 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2016

L. S.



Aneta Jarůšková
Autorka práce



Ing. Lenka Tomášková
Vedoucí práce



doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
Vedoucí ústavu



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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím 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 vědom/a, 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, 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.

V Lednici dne

Podpis

Poděkování:

V první řadě děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Lence Tomáškové za ochotu vždy pomoci a velkou trpělivost. Velké díky patří také doc. Ing. Jiřímu Sochorovi, Ph.D. za komentáře a cenné rady. Další dík patří Zahradnické fakultě Mendelovy univerzity za možnost studovat a vzdělávat se. Děkuji rodině a přátelům za podporu a za jejich pevné nervy.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ ČÁST.....	12
3.1	Sacharidy přítomné v moštu a ve víně	12
3.1.1	Monosacharidy.....	13
3.1.1.1	Glukóza	14
3.1.1.2	Fruktóza.....	14
3.1.2	Oligosacharidy	15
3.1.2.1	Laktóza.....	15
3.1.2.2	Maltóza.....	15
3.1.2.3	Sacharóza.....	16
3.1.3	Polysacharidy.....	16
3.2	Chromatografické metody	16
3.2.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC	19
3.3	Optické metody.....	20
3.4	Elektrochemické metody	26
3.5	Titrační metody.....	28
3.6	Enzymatické metody	30
3.7	Hydrometrie	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	Materiál a metody	33
4.1.1	Použité vzorky	33
4.1.2	Použité chemikálie	33
4.1.3	Použité přístroje	34
4.1.4	Postup.....	34
4.2	Vyhodnocení.....	35
4.3	Diskuze	38
5	ZÁVĚR.....	41
6	SOUHRN.....	43
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45

Seznam tabulek

Tab. 1 Obsah monosacharidů ve víně	14
Tab. 2 Obsah oligosacharidů ve víně	15
Tab. 3 Obsah polysacharidů ve víně	16
Tab. 4 Zastoupení látek stanovené iontovou chromatografií.....	19
Tab. 5 Rozdělení oblastí elektromagnetického spektra podle vlnové délky	21
Tab. 6 Výsledky stanovení podle Bertranda – TČ a VZ	36
Tab. 7 Výsledky stanovení podle Rebeleina – TČ a VZ	37
Tab. 8 Výsledky měření - ALPHA.....	38
Tab. 9 Bodování analytických metod.....	40

Seznam obrázků

Obr. 1 Příklady aldosa a ketosa	12
Obr. 2 Furanosa a pyranosa	13
Obr. 3 Vzorce D-glukózy a D-fruktózy.....	14
Obr. 4 Schéma HPLC	20
Obr. 5 Ruční kukátkový refraktometr	25
Obr. 6 Abbé refraktometr	25
Obr. 7 Ukázka moštoměrů	32
Obr. 8 Průběh stanovení redukujících cukrů podle Bertranda.....	36
Obr. 9 Barevné změny během stanovení podle Rebeleina	37

Seznam grafů

Graf 1 Srovnání hodnot redukujících cukrů podle metod u bílých vín	38
--	----

1 ÚVOD

Víno, alkoholický nápoj, který se stává stále více oblíbeným a vyhledávaným produktem na trhu, je složeno z mnoha chemických látek. Tyto látky se stanovují v laboratořích pomocí nejrůznějších analytických metod. Mezi hlavní měřené parametry patří pH, množství alkoholu, kyselin, SO₂ a v neposlední řadě také množství sacharidů, jejichž stanovení je hlavním tématem této práce.

Analytická chemie je důležitou součástí odvětví výroby vína. Proto dochází k neustálému vývoji analytických metod, které představují také kontrolu pro regule spojené s chemickým složením konečného produktu.

Historické základy analytické chemie sahají již do středověku, ale největší rozmach jednotlivých technik probíhá až od druhé poloviny 19. století. Vývoj je spojen s vynálezy mikroskopu a spektroskopu.

Analýza sacharidů se provádí pomocí klasických titračních i instrumentálních metod. Titrační metody jsou méně využívané především kvůli jejich zdlouhavému a náročnému procesu. Ale v menších laboratořích jsou dobrou alternativou drahých přístrojů.

Instrumentální metody dokáží neefektivněji stanovit množství sacharidů. Jedná se především o chromatografické a elektrochemické techniky. Neustále dochází k jejich automatizaci a rozvoji, aby bylo možné provádět co nejvíce a co nejpřesnějších analýz v co nejkratším čase.

Chromatografická stanovení představují nejčastěji využívané techniky ke stanovení sacharidů ve víně. Jsou neefektivnější a nejpřesnější variantou. Nejčastěji využívanou metodou chromatografie pro stanovení sacharidů je vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jejich klíčové výhody spočívají v časové úspoře a především v možnosti současně stanovit rozsáhlou škálu chemických látek. Nevýhoda této metody spočívá především ve vysoké pořizovací ceně.

V posledních letech zažívá velký vzestup také elektrochemická analýza. Ta ve velké míře nahradila většinu titračních a spektrometrických metod, které vykazují nižší citlivost a vyšší pracovní a časovou náročnost.

Méně využívané metody jsou enzymatické. K jejich vývoji dochází pozvolna. Výzkum těchto metod je založen na využití těch správných enzymatických činidel, jejichž příprava je finančně náročná. Velká přednost enzymatických metod spočívá v tom, že nepodléhají kalibračním chybám, jak je tomu u klasických spektrometrických

metod. To je hlavní důvod, proč jsou preferovány i přes jejich vysoké pořizovací a provozní náklady.

V dnešní době je povinností každého vinaře, aby zařídil analytický rozbor svého vína před uvedením na trh. Docílí se tak kontroly správného složení a případně nepovolených úprav a falšování vína.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je na základě prostudované literatury o analytických metodách, které se využívají pro stanovování sacharidů, popsat ty, které jsou nejčastěji využívány v praxi a uvést nejnovější trendy ve vývoji těchto metod.

Je provedeno stanovení sacharidů vybranými metodami. Tyto metody jsou vyhodnoceny z hlediska přesnosti a náročnosti na čas a obsluhu. Na základě prostudovaných studií a praktické části zhodnotit jakými výhodami a nevýhodami disponují jednotlivé metody.

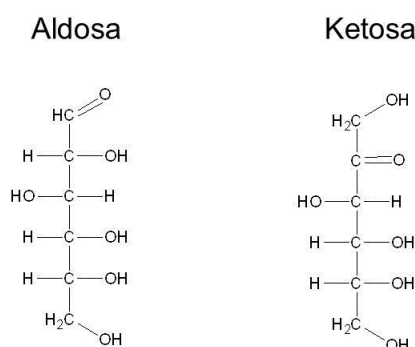
3 LITERÁRNÍ ČÁST

3.1 Sacharidy přítomné v moštu a ve víně

Pod pojmem sacharidy se označuje skupina nejvíce rozšířených organických látek. Nalezneme je ve všech potravinách a jsou základním zdrojem energie ve výživě nejen pro člověka ale i pro celou živočišnou říši (Stylianopoulos, 2013).

Z chemického hlediska se jedná o polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony. Ve svých molekulách obsahují minimálně tři atomy uhlíku. Sacharidy, které mají ve své struktuře aldehydovou skupinu, se nazývají aldosa a sloučeniny s ketonovou funkční skupinou se nazývají ketosa (Velíšek *et al.*, 2009).

Příklady aldosa a ketosa



Obr. 1 Příklady aldosa a ketosa (Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/2759119/>)

Sacharidy jsou v rostlinách produkovány fotosyntézou. Mají funkci stavební (celulóza tvoří stěny rostlinných buněk), zásobní (škrob, glykogen) a slouží jako zdroj energie (glukóza je nejrychlejší zdroj energie). Velmi specifickým sacharidem je ribóza v nukleových kyselinách (Vacek, 1985).

Sacharidy můžeme klasifikovat z různých hledisek. Nejznámější a nejvíce používané rozdělení je podle chemické stavby molekul. Dělíme je na monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy a heteroglykosidy (Zehnálek, 2003).

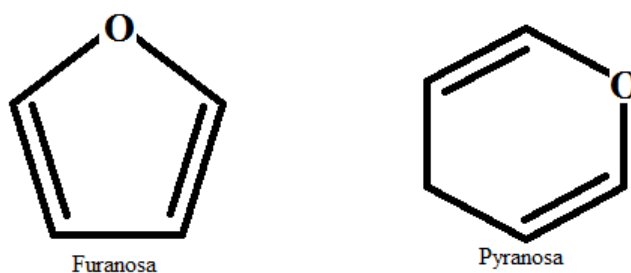
Dále je ale také můžeme rozdělit z hlediska výživových vlastností, fyziologických vlastností, nebo také jak jsou jednoduše nebo naopak složitě stravitelné pro člověka (Scientific Advisory Committee on Nutrition 2015).

Sacharidy jsou důležitou součástí chemického složení vína zejména tedy moštu. Díky přeměně sacharidů při alkoholové fermentaci, se z moštu stává konečný produkt - víno. Množství sacharidů, které zůstane ve víně při předčasném zastavení fermentace,

ovlivňuje jeho chuťové vlastnosti. Zvláště velký význam mají při snižování ostré chuti volných kyselin a také přidávají vínu příjemnou nasládlou chuť (Mulder, 1923).

3.1.1 Monosacharidy

První významnou skupinou sacharidů, které se vyskytují ve víně, jsou monosacharidy. Jsou to nejjednodušší cukry, které představují stavební jednotky pro složitější sacharidy. Podle počtu uhlíků v jejich řetězcích je rozdělujeme na triózy (tři uhlíky), tetrózy (čtyři uhlíky), pentózy (pět uhlíků), hexózy (šest uhlíků), atd. (Michlovský, 2014). Ve skutečnosti vytvářejí monosacharidy pětičlenné (furanózy) nebo šestičlenné (pyranosy) heterocykly (Zehnálek, 2003). Monosacharidy patří do skupiny redukujících cukrů. Obsahují volný aldehyd, který může být oxidován. Spadají sem sacharidy ve formě jak aldosa, tak ketosa (Zoecklein, c1995).



Obr. 2 Furanosa a pyranosa (Zdroj: archiv autora)

Koncentrace **pentóz** v moštu a ve víně se pohybuje mezi 0,3 – 2 g/l. Hlavními sacharidy v této skupině jsou D-xylóza a L-arabinóza. Ty mohou dosahovat koncentrací do několika stovek miligramů na litr. Další pentózy jako je D-ribóza a L-rhamnóza nepřekračují úroveň 100 mg/l (Moreno *et al.*, 2012).

Pentózy patří k redukujícím cukrům, ale kvasinky rodu *Saccharomyces* je nevyužívají. Říká se jim nezkrasitelné cukry. Redukční vlastnosti monosacharidů nese volný poloacetálový hydroxyl (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

Nejdůležitější skupinou sacharidů jsou **hexózy**. Jsou využívány jako zdroj energie pro kvasinky při alkoholové fermentaci, při které vzniká etanol a jiné produkty. Nejrozšířenějšími sacharidy v této skupině jsou D-glukóza, D-fruktóza, D-manóza a D-galaktóza. První tři hexózy jsou vzájemně snadno přeměnitelné. Jedná se o reakci zvanou tautomerizace. Při této reakci se mění keto forma jednoho sacharidu na enol formu a tak vzniká jiný sacharid (Moreno *et al.*, 2012).

Tab. 1 Obsah monosacharidů ve víně (Velíšek *et al.*, 2009)

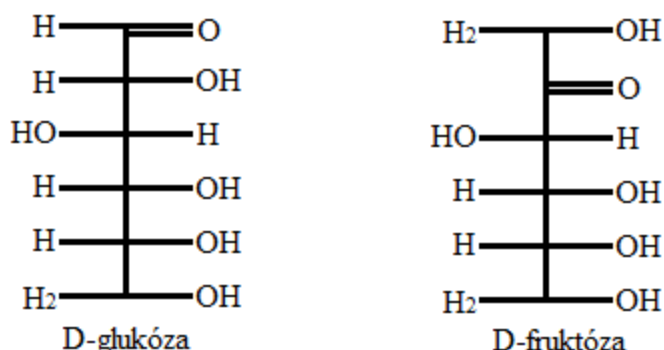
Název monosacharidu	Obsah v mg/l
Fruktóza	93 – 26500
Glukóza	56 – 25000
Galaktóza	6,3 – 249
Ribóza	6,3 – 62
Rhamnóza	2,2 – 121
Manóza	2 – 37
Fukóza	2 – 9
Arabinóza	1 – 242
Xylóza	0,6 – 146

3.1.1.1 Glukóza

Glukóza je nejrozšířenějším a nejdůležitějším sacharidem vůbec. Vyskytuje se jak ve volné tak i ve vázané formě (Vacek, 1985). Je též označovaná jako hroznový nebo škrobový cukr. Zralé hrozny obsahují okolo 8 % tohoto monosacharidu. V moštu je zastoupení glukózy v rozsahu 120 – 250 g/l, u suchých vín do 4 g/l zbytkového cukru. Poměr mezi glukózou a fruktózou bývá od 0,5 – 0,9 (Velíšek *et al.*, 2009).

3.1.1.2 Fruktóza

Fruktóza (nebo také ovocný cukr nebo levulosa) je z monosacharidů nejsladší. V ovoci a medu se vyskytuje ve volné formě (Vacek, 1985). U přezrálých hroznů převládá množství fruktózy nad množstvím glukózy (Velíšek *et al.* 2009).



Obr. 3 Vzorce D-glukózy a D-fruktózy (Zdroj: archiv autora)

3.1.2 Oligosacharidy

Monosacharidy se spojují pomocí glykosidové vazby do větších celků a vytvářejí složitější sacharidy (Zehnálek, 2003). Glykosidová vazba je vazba mezi poloacetálovou hydroxylovou skupinou jednoho monosacharidu a hydroxylovou skupinou druhého monosacharidu. Může se jednat o dva stejné, nebo různé monosacharidy (Vacek, 1985). Oligosacharidy jsou složeny ze dvou až deseti monosacharidů (Zehnálek, 2003).

Ve víně i jiných nápojích a potravinách se vyskytují volné i vázané oligosacharidy ve velkém množství. Nejvýznamnější jsou ty, které obsahují ve svém řetězci monosacharid D-glukózy a D-fruktózy (Velíšek *et al.*, 2009).

Ve víně jsou nejvíce zastoupeny disacharidy. Patří sem laktóza, maltóza, sacharóza a v menší míře také trehalóza (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

Tab. 2 Obsah oligosacharidů ve víně (Velíšek *et al.*, 2009)

Název oligosacharidu	Obsah v mg/l
Cellobióza	2 – 7
Maltóza	1 – 5
Laktóza	1 – 5
Trehalóza	0 – 61
Melibióza	stopy – 1
Raffinóza	0 – 1
Sacharóza	0

3.1.2.1 Laktóza

Laktóza nebo také mléčný cukr se vyskytuje především v mléce savců (v kravském mléce 4 – 5 %, v lidském mléce 5,5 – 7 % laktózy). Jedná se o disacharid, který se skládá z D-galaktózy a D-glukózy. Na ty se hydrolyzuje enzymem zvaným lakáza, která je obsažena v tenkém střevě savců a také ji produkují bakterie mléčné fermentace. Při ní dochází ke štěpení laktózy až na kyselinu mléčnou (Velíšek *et al.*, 2009).

3.1.2.2 Maltóza

Maltóza nebo také sladový cukr se vyskytuje téměř ve všech potravinách. Vzniká hydrolýzou škrobu působením kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, využívají ji také

pivovarské kvasinky a to až z 95 %. Skládá se ze dvou atomů monosacharidu D-glukózy (Velíšek *et al.*, 2009).

3.1.2.3 Sacharóza

Sacharóza je též nazývána řepným nebo třtinovým cukrem. Vzniká jako primární produkt fotosyntézy. Jedná se o nejvýznamnější neredukující disacharid. Skládá se z jednoho atomu D-fruktózy a jednoho atomu D-glukózy, na které se hydrolyzuje enzymem zvaným invertáza. Obsah v odrůdách rodu *Vitis vinifera* je nepatrný, ale v odrůdách původem z Jižní Ameriky a jejich hybridech (například *V. Labruscana*) může tvořit až 25% obsahu sacharidů (Velíšek *et al.*, 2009). Sacharóza se v některých případech přidává v suché formě do moštu ještě před fermentací a tak se ovlivňuje konečná sladkost vína (Bakker *et al.*, 2012).

3.1.3 Polysacharidy

Sacharidy, které se skládají z více než deseti monosacharidových jednotek, se nazývají polysacharidy neboli glykany. Jedná se o látky, které nejsou rozpustné ve vodě a nemají redukující vlastnosti. Rozdělují se na homopolysacharidy (složené z identických monosacharidů) a heteropolysacharidy (složené ze dvou a více odlišných monosacharidů). Polysacharidy nemají přímý vliv na sensorické vlastnosti vína, ale protože jsou významnou složkou buněčných stěn hroznů, souvisí jejich přítomnost s extrahováním barviv a aromatických látek (Moreno *et al.*, 2012).

Ve víně se vyskytují pektiny a gummy. Pektiny jsou lineární polymery kyseliny galakturonové, často esterifikované methylovou skupinou. Extrahují se do moštu během drcení a lisování. Hladina polysacharidů ve víně je obecně nízká (Jackson, 2008).

Tab. 3 Obsah polysacharidů ve víně (Michlovský, 2014)

Název polygosacharidu	Obsah v g/l
Pektiny	0,5
Kyselina galakturonová	0,5-2
β-glukan	0,3

3.2 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou založeny na rozdělení jednotlivých komponent ve stanovované látce mezi dvě fáze. Jedná se o metody separační. První fáze je pohyblivá (mobilní, eluční činidlo) a druhá nepohyblivá (stacionární). Veškeré informace získané během analýzy se zaznamenávají pomocí detektorů. Ty automaticky spolupracují s počítačovou jednotkou, která vyhodnocuje výsledky a sestavuje příslušné chromatogramy (Clark, 2007). Speciální chromatografické techniky mohou být využity k provedení obtížných analýz a také k získání kratší doby separace. (Meyer 2013).

Detektory využívané v chromatografii

K přímé detekci, separaci a kvantifikaci sacharidů (glukózy a fruktózy) se využívá *RI (refraktometrický) detektor*. Tento detektor pracuje na základě měření změn indexu lomu. Tuto metodu vyhodnotil ve své studii López-Tamames et al., 1996 jako velmi přesnou a citlivou. Výhoda je také v rychlosti, protože není potřeba žádné přípravy vzorku (López-Tamames et al., 1996).

Infračervené detektory (IR) se využívají pro stanovování organických látek, které vykazují špatnou schopnost absorpce v ultrafialové oblasti (Kuligowski et al., 2010). Jejich nevýhodou je nízká spolehlivost, která je způsobena krátkou vlnovou délkou infračerveného záření, které bývá často absorbováno také mobilní fází včetně vody. Proto se používají světelné zdroje, aby byly nežádoucí účinky omezeny. Dalším příkladem jak omezit tento nežádoucí účinek je využit zeslabení celkového odrazu (ATR) pomocí diamantu. Ve studii Edelman et al., 2003 byla tato varianta aplikována pro analýzu červených vín. Úspěšně byla stanovena nejen koncentrace sacharidů, ale také organické látky a alkoholy (Edelman et al., 2003).

Pro detekci sacharidů se používají také *kvantové kaskádní lasery (QC-lasery)*, které ve své studii využili Kuligowski, Quintás a Lendl, 2010, kdy stanovili zastoupení glukózy, kyseliny vinné, fruktózy, glycerolu a etanolu ve víně (Kuligowski et al., 2010).

Rozdělení chromatografických metod podle typu mobilní fáze:

Plynová chromatografie

Je založena na stanovení rovnováhy mezi mobilní plynnou fází a stacionární pevnou (GSC), nebo kapalnou (GLC) (Jančářová et al., 2003).

Ve studii Marcy et al., 1982 byla využita plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází s využitím trimethylsilyl (TMS) etheru pro stanovení organických

kyselin a sacharidů v hroznovém moštu. TMS se přidává ke stacionární fázi a napomáhá k lepší separaci jednotlivých látek. Z této studie vyplývá, že tato metoda poskytuje nejen rychlý způsob stanovení látek, ale také zaručuje přesné výsledky (Marcy a Carroll, 1982). Ve studii Skogerson et al., 2009 bylo provedeno srovnání dvou způsobů stanovení chemických látek (včetně sacharidů) ve víně. Srovnávala se metoda plynové chromatografie a protonové nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. V obou případech byly stanoveny nejhojnější sloučeniny ve víně: etanol, glycerol, sacharidy, organické kyseliny a aminokyseliny. Plynovou chromatografií bylo identifikováno 16 sacharidů, spektroskopii pouhých 6. Společnými stanovenými sacharidy byly fruktóza, fukóza, galaktóza, glukóza, ribóza a xylóza (Skogerson *et al.*, 2009).

Kapalinová chromatografie

Tato metoda je založena na stanovení rovnováhy mezi mobilní kapalnou fází a stacionární pevnou (LSC), nebo kapalnou (LLC) (Jančářová *et al.*, 2003).

Při kapalinové chromatografii může mobilní fázi představovat například kyselina sírová a ethylacetát. Právě pomocí těchto látek bylo ve studii de Villiers et al., 2004 stanoveno zastoupení glukózy a fruktózy ve víně. Analýza probíhala na základě detektoru ve viditelném spektru VIS. Tato metoda představuje zlepšení, co se týče produktivity kapalinové chromatografie (de Villiers *et al.*, 2004).

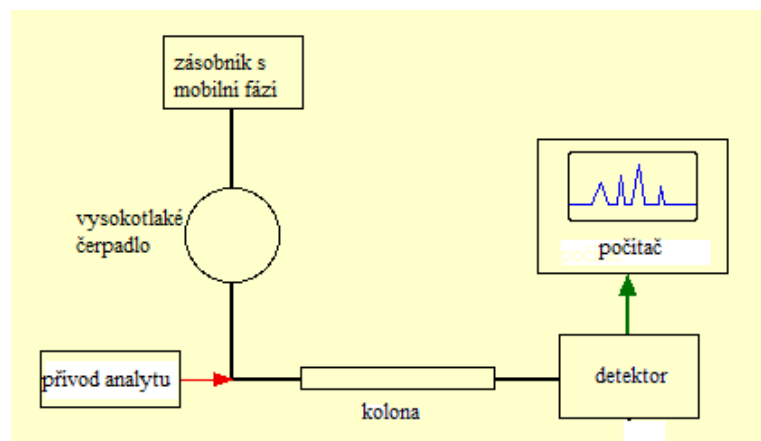
Iontově výměnná chromatografie (IEC) je založena na odtržení iontu, který je vázaný ve stacionární fázi. Následně probíhá jeho převod do kapalně mobilní fáze a jeho náhrada za stejně nabitý iont stanovované látky. Základem stacionární fáze je měnič iontů (Williams a Frasca, 2001). Ve studii Yan, Xingde a Weijun, 1997 byl ke stanovení sacharidů a organických kyselin ve víně pomocí IEC využit detektor vodivosti. K iontové chromatografii bylo použito menší množství hydroxidu sodného (NaOH). Za těchto podmínek jsou sacharidy schopny ionizace na anionty a mohou být při chromatografii separovány. V tabulce č. 4 jsou znázorněny výsledky této analýzy zkoušeného vína. Při provádění pokusu bylo také zjištěno, že iontová chromatografie s použitím detektoru vodivosti je citlivější na stanovení organických kyselin než pro stanovení sacharidů (Yan *et al.*, 1997). Ve studii Bruggink et al., 2005 byla pro analýzu nederivatizovaných sacharidů vyvinuta vysokoúčinná metoda IEC s využitím amperometrického detektoru. K mobilní fázi bylo přidáno množství hydroxidu sodného a také octanu sodného, který ještě zlepšil schopnost ionizace sacharidů. Detekční limity byly stanoveny 0,12 pmol pro glukózu, 0,22 pmol pro fruktózu a 0,11 pmol pro sacharózu (Bruggink *et al.*, 2005).

Tab. 4 Zastoupení látek ve víně stanovené iontovou chromatografií (Yan *et al.*, 1997)

Název	Obsah v mg/ml
Mannitol	0.44
Arabinóza	0.67
Glukóza	2.85
Fruktóza	0.25
Laktóza	1.47
Sacharóza	0.91
Rafinóza	0.74
Maltóza	1.76
Acetát	1.27

3.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

HPLC vznikla kolem roku 1970 a dnes je prakticky jedinou formou kapalinové sloupcové chromatografie, která se používá (Nedoma *et al.*, 1994). Jedná se v podstatě o vylepšenou formu sloupcové (kolonové) chromatografie. Hlavní rozdíl u vysokoučinné kapalinové chromatografie je v tom, že se využívají vysokotlaká čerpadla (tlak až do 400 atmosfér). Tak analyt prochází přes kolonu, ve které je umístěna stacionární fáze (sorbet), mnohem rychleji, než působením pouhé gravitace. Kapalína je vstřikována do kolony nepřetržitě a vytváří tak mobilní fázi, která nese stanovovanou látku neboli analyt. Stacionární fáze je tvořena obalovým materiálem kolony. Kolony však musejí být vyrobeny z materiálů, které odolávají vysokým tlakům, nejčastěji se jedná o borosilikátové tvrzené sklo nebo antikorozi ocel. Druhé velké zlepšení na koloně se týká detekčních metod, které jsou vysoce automatizované a extrémně citlivé (Clark, 2007).



Obr. 4 Schéma HPLC (Clark, 2007 + úpravy autora)

Ve většině případů se HPLC využívá ke stanovení většího množství chemických látek a nejen jedné skupiny. Ve studii Callul *et al.*, 1992 byla využita metoda HPLC s použitím iontově výměnné kolony a detektorem indexu lomu. Byl proveden rozbor hroznového moštu a sladkých vín. Metoda byla vyhodnocena v porovnání s klasickou HPLC metodou jako stejně přesná a účinná. Má tu výhodu, že při stanovení kyseliny jablečné nebylo zaznamenáno rušení vysokými koncentracemi sacharidů (Calull *et al.*, 1992). Celková analýza vína byla provedena ve studii Castellari *et al.*, 2007 s využitím dvou sériově zapojených detektorů (UV detektor a refraktometrický). Byly srovnány dva způsoby aplikování vzorku a to pomocí přímého vstříkávání a extrakci na pevné fázi pomocí SAX kazety. Z výsledků práce vychází, že varianta přímého vstříkávání je vhodnější než pomocí SAX kazety (Castellari *et al.*, 2007). Podle studie Kelebeka, 2009, který analyzuje vzorky vína pomocí HPLC je nejvíce zastoupeným sacharidem sacharóza, a to z 91,6 % z celkového obsahu sacharidů v testovaném víně. V této studii proběhlo také stanovení organických kyselin, obsahu fenolických látek a antioxidační aktivita vína (Kelebek *et al.*, 2009). Srovnání s enzymatickým stanovením vín, které bylo provedeno ve studii Walker *et al.*, 2003, se HPLC jeví jako přesnější a rychlejší varianta (Walker *et al.*, 2003).

3.3 Optické metody

Optické metody jsou založeny na interakci mezi zářením a částicemi prostředí. Při této reakci dochází k předávání energie, kterou můžeme změřit, je tzv. kvantovaná. Tok částic vycházející ze zdroje je okolním prostředím absorbován, reemitován, nebo polarizován. Může také docházet ke změně směru toku částic. Důležitým pojmem u spektrometrických metod je vlnová délka, která je definována jako vzdálenost mezi

minimem a maximem elektromagnetického záření. Velikost vlnové délky je závislá na prostředí, ve kterém se záření pohybuje (Jančářová *et al.*, 2003).

Tab. 5 Rozdělení oblastí elektromagnetického spektra podle vlnové délky (Jančářová *et al.*, 2003)

Oblast	Vlnová délka
Kosmické γ -záření	10^{-6} – 0,01 nm
Rentgenová oblast	0,01 – 10 nm
Vakuová ultrafialová	10 – 180 nm
Ultrafialová	180 – 380 nm
Viditelná	380 – 780 nm
Blízká infračervená	0,78 – 2,5 μ m
Střední infračervená	2,5 – 50 μ m
Daleká infračervená	50 – 1000 μ m
Mikrovlnná	1 – 600 mm
Radiofrekvenční	0,6 – 10 m

Spektroskopické metody

Pro tyto metody jsou typické interakce mezi zářením a prostředím. Podle mechanismů těchto interakcí se spektroskopické metody dělí na emisní a absorpční. Emisní i absorpční metody jsou obvyklými postupy při stanovování nových sloučenin, nebo při monitorování průběhu chemických reakcí (Klouda, 2003).

Emisní metody

Emisní metody jsou založené na velikosti záření, které vysílá stanovovaný vzorek. Emise neboli uvolňování energie může probíhat až po dodání určité energie stanovovanému vzorku. Ta se dodává pomocí tepla, elektrické energie, nebo proudem jiného elektromagnetického záření, či tokem elementárních částic (Klouda, 2003).

Mezi emisní metody patří atomová emisní spektrometrie, hmotnostní spektrometrie, fluorimetrie a fosforimetrie (Jančářová *et al.*, 2003). Relativní jednoduchost emisních metod a jejich dobrá citlivost tvoří základ pro širokou škálu využití, zejména pro stanovení stopových prvků. Pro analýzu sacharidů ve víně či v moštu se využívají zřídka (Tkachenko, 2006).

Hmotnostní spektrometrie

Princip hmotnostní spektrometrie je založen na separaci vzorku podle poměru mezi hmotností a nábojem stanovované látky (Kříženecká *et al.*, 2014). Touto metodou lze stanovit strukturu organických látek a biomolekul a kvalitativní i kvantitativní složení vzorku (Milde, 2010).

Hmotnostní spektrometry umožňují stanovení molekulové hmotnosti a objasnění struktury více sacharidů najednou (Rodrigues *et al.*, 2007). Hmotnostní spektrometrie byla využita ve studii Mutenda a Matthiesen, 2007 pro analýzu sacharidů. Molekuly sacharidů byly nejprve převedeny za sníženého tlaku na plynné ionty. Následně byl měřen jejich hmotnostní poměr, který poskytuje informace o předběžné identifikaci. Úplná identifikace pak probíhala při fragmentaci iontů v průběhu disociace (Mutenda a Matthiesen, 2007). Ve studii Bruggink *et al.*, 2005 bylo pro zvýšení citlivosti detekce sacharidů přidáno 0,5 mmol/l chloridu lithného (Bruggink *et al.*, 2005).

Srovnání atomové emisní spektrometrie a hmotnostní spektrometrie ve studii provedl Wiel, 2003. Ve vodném roztoku bylo s použitím atomové emisní spektrometrie stanoveno 39 prvků. Oproti tomu pomocí hmotnostní spektrometrie bylo stanoveno dokonce 67 prvků. Ze studie vyplývá, že hmotnostní spektrometrie je daleko citlivější metodou (Wiel, 2003).

Absorpční metody

Tyto metody jsou založeny na absorpci neboli pohlcování energie ze záření (Klouda, 2003). Absorpční metody je vhodné využívat při stanovení koncentrace určité sloučeniny. Je to z toho důvodu, že výsledky měření poskytnou absolutní hodnotu absorbance vzorku, což je u emisních metod z technického hlediska komplikované (Tkachenko, 2006). Výhodou absorpčních metod je také relativně nízká cena přístrojů. Organické látky se stanovují v ultrafialové, ve viditelné i v infračervené oblasti absorpce. Pro stanovení látky je důležitá příprava vzorku tzv. derivatizace (Kříženecká *et al.*, 2014).

Spektrofotometrie

Často využívanou absorpční metodou pro stanovení sacharidů patří molekulová absorpční spektrometrie neboli spektrofotometrie ve viditelné a UV oblasti. Na základě studie Roig a Thomas, 2003, při které se pomocí molekulové absorpční spektrometrie v UV oblasti stanovovalo množství sacharidů ve vodním roztoku, lze konstatovat, že je tato metoda vhodná pro stanovení sacharidů také ve víně. Dále bylo zjištěno, že

koncentrace kyselin neovlivňuje měření. Parametr, který však znemožňuje přesné spektrometrické měření v UV oblasti, je množství alkoholu, což potvrdily výsledky měřené ve vzorcích s různou koncentrací alkoholu. Pro stanovení sacharidů ve vzorku s vysokým obsahem alkoholu je nutné jeho zředění (Roig a Thomas, 2003). Vylepšením této metody pro stanovení redukcujících cukrů je využití sekvenčního vstřikovacího systému a s aplikací UV detektoru nastaveného na vlnovou délku 460 nm. Roztoky byly aplikovány přes trubky poháněné čerpadlem. Ve studii Araújo et al., 2000 byly takto upravenou metodou stanoveny redukcující cukry v portském a stolním víně. Byly provedeny změny v nastavení softwaru pro dva typy stanovení v závislosti na koncentraci redukcujících cukrů. Od 2 do 25 g/l (pro stolní vína) a od 20 do 140 g/l (pro portská vína). Díky těmto úpravám odpadá práce s ředěním a odbarvováním portských vín (Araújo *et al.*, 2000).

Infračervená spektrometrie

Metody založené na infračerveném spektru se dělí podle vlnové délky na NIR (blízká infračervená oblast) a MIR (střední infračervená oblast). Tyto dvě metody ve své studii využil a srovnal de Oliveira et al., 2014. Došel k závěru, že pro stanovení jednotlivých sacharidů (sacharóza, glukóza a fruktóza) je vhodnější MIR technika. Naopak ke stanovení celkového obsahu kyselin je vhodnější NIR. (de Oliveira *et al.*, 2014).

Velice přínosnou metodou absorpční infračervené spektrometrie je tzv. Fourier transform infrared (FTIR) spektrometrie. Tato metoda je založena na průchodu infračerveného záření. Stanovovaná látka absorbuje toto záření a následně dochází k vibracím, které způsobují změny v energii stanovovaných látek. Ve velké míře se využívá ke stanovení bílkovin (Berthomieu a Hienerwadel, 2009). Tato metoda není vhodná pro stanovování sacharidů v suchých vínech, ve kterých jsou zastoupeny látky v daleko vyšších koncentracích, než jsou sacharidy a právě tyto látky produkují významné interference při průběhu analýzy. Sloučeniny o menších koncentracích, jejichž absorpční oblast se neliší od jiných obsahově významnějších sloučenin, jsou pak hůře identifikovatelné jako je tomu u sacharidů (Moreira a Santos, 2004). Vylepšení této metody provedl ve studii Vonach et al., 1998 spojením FTIR s HPLC. Jedná se o univerzální způsob jak přímo stanovit hlavní složky vína (Vonach *et al.*, 1998).

Kolorimetrie

Kolorimetrické metody jsou založené na práci s viditelným spektrem. Jako detektor bývá využíváno oko. Stanovení redukcujících cukrů podle Henniga je

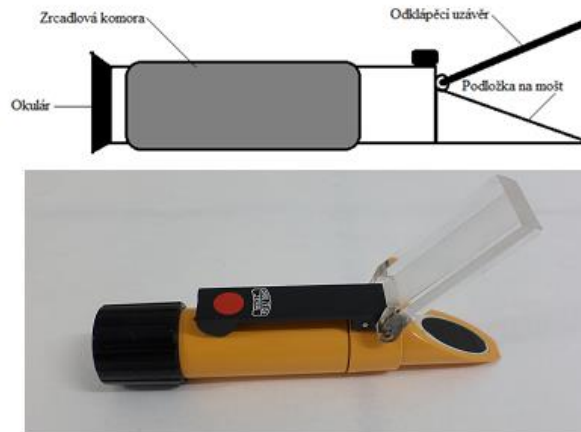
kolorimetrická metoda založena na subjektivním pozorování reakce redukujících cukrů a Fehlingova činidla ve zkumavkách. Reakce mezi určitým množstvím (5 ml) analyzovaného vína a stoupající koncentrací (1–10 ml) Fehlingova činidla způsobí vznik roztoků o různém zbarvení. Žluté znamená, že množství Fehlingova činidla je na přítomnou koncentraci redukujících cukrů příliš nízká. Až modré zbarvení nám indikuje přebytek Fehlingova činidla. Koncentrace redukujících cukrů je rovno počtu žlutých zkumavek až počet žlutých zkumavek + 1, výsledek je vyjádřen v g/l (Balík, 2006). Na principu kolorimetrie provedl výzkum DuBois et al., 1956, který nechal sacharidy a jejich deriváty ve víně reagovat s fenolem a koncentrovanou kyselinou sírovou (fenol-sírová kyselina). Při této reakci se vytvoří barevný komplex mezi sacharidem a fenolem. Roztok získá oranžovožlutou barvu. Tato reakce je využívána pro stanovení i velmi malého množství sacharidů a ve spojení s chromatografickými metodami je užitečným způsobem pro stanovení polysacharidů a jejich derivátů (DuBois *et al.*, 1956). Podle autora se tato metoda nazývá Duboisova metoda. Tato metoda byla využita ve studii Matsuhira et al., 2009 ke stanovení sacharidů s nízkou molekulovou hmotností v Cabernetu Sauvignon. Přednosti tohoto stanovení jsou v jeho jednoduchosti a nabízí tu výhodu, že není potřeba odbarvení červeného vína (Matsuhira *et al.*, 2009). Pro další zlepšení kolorimetrických metod je do vzorku přidán roztok vinanu sodnodraselného. Tuto modifikaci testovali Jue a Lipke, 1985 a došli k závěru, že takto upravená metoda vede ke zvýšení citlivosti pro stanovení sacharidů (schopnost determinace už od 1 nmol sacharidů) a zkrácení reakční doby (Jue a Lipke, 1985).

Nespektroskopické metody

Mezi optické metody patří také nespektroskopické metody, při kterých nedochází k výměně energie mezi zářením a prostředím. Prostředí pouze nějakým způsobem ovlivňuje vlastnosti procházejícího záření. Do této skupiny patří nefelometrie, turbidimetrie, refraktometrie, interferometrie a polarimetrie. (Nedoma *et al.*, 1994).

Refraktometrie

Principem refraktometrických stanovení je, že na rozhraní dvou prostředí se mění rychlost a směr šíření a paprsek světla se láme. Poměr rychlostí v rozdílných prostředích vyjadřujeme jako index lomu. Čím hustší a tedy i cukernatější mošt máme, tím více je světlo lámáno. Ruční refraktometry jsou využívány zejména ve vinohradech, při kontrole vyzrálости bobulí. Ruční refraktometry mohou být kukátkové anebo digitální. Výsledky jsou nejčastěji vyjádřeny v °Brix (Steidl, 2002).



Obr. 5 Ruční kukátkový refraktometr (Zdroj: archiv autora)

Abbé refraktometr je složitějším přístrojem, který využívá index lomu. Obsah sacharidů je stanoven jako rozpustná sušina moštu a vyjádřen v °Oe (Balík, 2006).



Obr. 6 Abbé refraktometr (Zdroj: archiv autora)

Postup při měření pomocí Abbé refraktometru je oproti ručním refraktometrům o něco složitější. Pomocí šroubů se nejdříve nastaví černobílé rozhraní tak, aby přesně procházelo středem kříže v prvním okuláru. Poté se z druhého okuláru odečte hodnota na stupnici. Měření by se mělo provádět ve více opakováních. Abbé refraktometr udává celkovou hustotu daného moštu, proto je tento způsob hodnocení nejpřesnější. Výsledky jsou ale pouze z malého množství stanovovaného vzorku, používá se pouze jedna kapka, proto je lepší měřit cukernatost moštu pomocí hustoměrů a moštoměrů (Mašláňová *et al.*, 2015).

3.4 Elektrochemické metody

Elektrochemické metody jsou založeny na elektrochemickém chování roztoků. Jsou zkoumány soustavy analyzovaného roztoku, který je v kontaktu s elektrodami elektrochemického článku (Klouda, 2003). Ve většině elektrochemických metod existují tři elektrody: pracovní elektroda, referenční elektroda a pomocná elektroda. Tyto tři elektrody jsou připojeny k řídicímu přístroji, který určuje potenciál pracovní elektrody a měří se výsledný proud. Nejvýznamnější elektroda je pracovní. Jedná se o místo, na kterém probíhají reakce (Adams, 1969). Elektrochemické metody jsou využívány především při stanovení materiálů, které jsou buď pevnými vodiči, nebo elektrolyty (Weppner *et al.*, 1978). Stanovují se koncentrace iontů, měří se pH roztoků. Sleduje se čistota destilované vody anebo čistota sacharózy v cukrovarnictví. Kontrolují se galvanické články, baterie a palivové články. (Brett *et al.*, 1993). Další uplatnění je v biosenzorice. Elektrochemické biosenzory kombinují citlivost elektroanalytických metod a přirozené selektivity biologické složky. Biologická složka vytváří elektrický signál, který je přímo úměrný její koncentraci. Tato zařízení jsou běžně používána v oblastech ochrany životního prostředí, průmyslu a zemědělství (Ronkainen *et al.*, 2010).

Sacharidy ale nevykazují žádný náboj, z tohoto důvodu je analýza sacharidů elektrochemickými metodami složitá. Proto byly vyvinuty metody, které jsou založeny na ionizaci sacharidů s využitím vysoce alkalického elektrolytu (Soga a Serwe, 2000).

Do skupiny elektrochemických metod, které jsou založeny na oxidačně-redukčních reakcích, patří potenciometrie, voltametrie, nebo elektrogravimetrie. Pro další skupinu metod je typické měření elektrických vlastností. Jedná se například o měření vodivosti u konduktometrie anebo stanovení kapacity u dielektrimetrie. Některé separační metody, které jsou založeny na rozdílu rychlostí nabitých částic, jako je elektroforéza a izotachoforéza se také zahrnují do elektrochemických metod (Klouda, 2003).

Potenciometrie

Potenciometrická stanovení jsou založena na měření napětí na elektrochemickém článku, kdy se sleduje závislost napětí na koncentraci iontů stanovované látky. Potenciál pracovní elektrody závisí na koncentraci iontů stanovované látky. Referenční elektroda vykazuje konstantní potenciál. Probíhají zde elektrochemické reakce, při kterých se mění chemická energie na elektrickou (Kříženecká *et al.*, 2014).

Studie Moio et al., 2001 využívá potenciometrii na základě fosforylace glukózy a fruktózy rychlý a jednoduchý postup jejich stanovení. Reakce je katalyzována enzymem hexokinázou, která zajišťuje průběh fosforylace, při které dochází k produkci H^+ iontů. Pomocí pH metru a automatizovaného softwaru se zjistí celková koncentrace glukózy a fruktózy ve vzorku vína. Navržená metoda je jednoduchá a rychlá především z toho důvodu, že není potřeba žádná úprava vzorku a údaje jsou automaticky zaznamenávány a vyhodnocovány (Moio *et al.*, 2001).

Elektroforéza

Princip elektroforézy je založen na rozdílném pohybu stanovovaných látek při použití elektrického pole elektrolytu. Při těchto stanoveních záleží na povrchovém napětí částic stanovované látky. Elektroforézní metody představují díky své automatizaci, rychlosti a přesnosti důležitou součást analytických metod využívaných v praxi (Brett *et al.*, 1993).

Studie Soga a Serwe, 2000 využívá ke stanovení sacharidů elektroforézní metodu s použitím UV detektoru. Byla detekována směs složená z 28 cukerných látek. Sacharidy byly identifikovány v tomto pořadí ribóza, manóza, xylóza, glukóza, galaktóza, fukóza, fruktóza, rhamnóza, laktóza, sacharóza (Soga a Serwe, 2000).

Kapilární elektroforéza

V případě kapilární elektroforézy probíhá separace stanovovaných látek v kapiláře. Ta je naplněná roztokem elektrolytu, nejčastěji roztokem pufru (Brett *et al.*, 1993). S využitím fotometrických detektorů, amperometrie, nebo hmotnostní spektrometrie a správných derivačních činidel, představuje tato metoda přínosnou alternativu ke stanovení sacharidů. Oefner a Chiesa, 1994 testovali řadu derivačních činidel zahrnující 2-aminopyridin, 4-amino-benzoovou kyselinu, 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonovou kyselinu, 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonu a 3-(4-karboxybenzoyl)-2-chinolin-karboxaldehydázou. Každá alternativa má své výhody a kombinace testovaných činidel umožňuje přesné mapování sacharidů (Oefner a Chiesa, 1994). Ze studie Chen *et al.*, 1998 vyplývá, že pro uvolnění sacharidů je nejvhodnější silně kyselá hydrolyza kyselinou trifluoroctovou. Při této reakci vzniknou sloučeniny sacharidů (aminocukry), které jsou derivatizovány pomocí APTS (8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate). Detekce takto vzniklých sacharidů je prováděna pomocí fluorescenčních laserových detektorů (Chen *et al.*, 1998). Ve studii Noe *et al.*, 1999 bylo ve víně stanoveno také zastoupení sacharidů o menších koncentracích jako je arabinóza, rhamnóza, ribóza, xylóza a galaktóza. Bylo prokázáno větší zastoupení pentóz ve víně, které bylo infikováno

Botrytis cinerea. I když existuje mnoho různých technik kapilární elektroforézy pro stanovení sacharidů, v praxi jsou málo aplikovány (Noe *et al.*, 1999).

Kapilární zónová elektroforéza

Ke stanovení sacharidů se také využívá kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis – CZE). Jedná se o nepoužívanější a nejjednodušší typ kapilární elektroforézy. Princip je založen na rozdělení látek ve stanovovaném vzorku do tzv. zón podle mobility. Neutrální látky nemohou být bez přípravy touto metodou stanoveny (Brett *et al.*, 1993). Sádecká a Polonský, 2000 ve svém výzkumu objasňují, že použití chirálního derivačního činidla (fenylethylaminu) vede k jednoduššímu stanovení sacharidů. Přidáním činidla dochází k derivatizaci inverzních sacharidů a tím ke změně jejich pohybu v elektrolytu. Tato metoda byla v nedávné době upravena pro analýzu redukujících cukrů ve víně. Aby se dosáhlo lepšího oddělení D-glukózy a D-manózy byl vzorek derivatizován pomocí (R)-(+)-1-fenylethylaminu. Takto upravenou metodou byla zjištěna přítomnost D-glukózy, D-mannosy, D-xylózy, L-arabinózy, D-galaktózy a ve stopových množstvích D-xylóza a D-ribóza (Sádecká a Polonský, 2000). Červená vína se musí před kapilární zónovou elektroforézou odbarvit. Sáenz-López *et al.*, 2004 využil k oddělení pigmentů červených vín křemenných kapilár z taveného křemene s účinnou délkou 56 cm a vnitřním průměrem 75 μ m (Sáenz-López *et al.*, 2004).

3.5 Titrační metody

Titrační metody jsou založeny na reakci titračního činidla a analyzovaného roztoku. Měří se objem spotřebovaného titračního činidla do bodu ekvivalence. Bod ekvivalence se indikuje buď vizuálně, nebo pomocí indikačních instrumentálních metod. Indikátory jsou látky, které mění barvu v závislosti na pH (Jančářová *et al.*, 2003; Nedoma *et al.*, 1994).

Manganometrická titrace

Manganometrická stanovení jsou založena na oxidačních vlastnostech roztoku manganistanu draselného, jehož vlastnosti závisí na okolním prostředí. Manganistan se v kyselém prostředí redukuje na bezbarvé manganaté ionty. V neutrálním prostředí vzniká jeho redukcí oxid manganičitý. V silně zásaditém prostředí se redukuje až na manganan (Jančářová *et al.*, 2003). Mezi velkou přednost manganistanu draselného patří jeho fialové zbarvení, díky němuž se snadno zjistí bod ekvivalence. Naopak nevýhodou je to, že vodné roztoky jsou velmi málo stabilní. Ke standardizaci roztoku se

nejčastěji používá kyselina šťavelová, oxid arsenitý nebo také hexakyanoželeznatan draselný. V některých případech bývá použita i Mohrova sůl (Renger *et al.*, 1998).

Stanovení redukujících cukrů podle Bertranda je manganometrické metoda založena na interakci mezi volnou karbonylovou skupinou a Fehlingovým činidlem. Probíhá reakce mezi redukujícími cukry a CuSO_4 , při níž dochází ke vzniku ekvivalentního množství Cu_2O . Bod ekvivalence je určen změnou barvy roztoku. Metoda je sice přesná, ale jedná se o časově náročnou metodu. Z tohoto důvodu se v praxi již téměř nepoužívá. Je nahrazena automatizovanými technikami jako jsou HPLC a elektrochemické metody (Kolusheva *et al.*, 2011). Stanovení podle Bertranda má nevýhodu také v nestabilitě roztoku KMnO_4 , způsobenou citlivostí na organické hmoty. Tyto odchylky však bývají při vyhodnocení zcela ignorovány (Wildman a Hansen 1940).

Jodometrická titrace

Jodometrie je metoda, která se využívá ke stanovení redukčního činidla pomocí titrace odměrným roztokem jódu, nebo se také využívá při reakcích s oxidačním činidlem a následnou titrací odměrným roztokem thiosíranu nebo arsenitu (Kříženecká *et al.*, 2014, Nedoma *et al.*, 1994). Specifickým činidlem v jodometrii je škrobový maz, ten se díky trijodidu zbarvuje na modrou až fialovou barvu a tím dochází k indikaci dosažení bodu ekvivalence (Bartoš *et al.*, 2004). Ke změně barvy dochází při vzniku výsledné dvojnásobné vazby, v důsledku enolizace (vznik enolů z aldehydů nebo ketonů). Tato reakce je ovlivněna různými faktory jako je koncentrace sacharidů, množství zásaditých látek, teplota a doba reakce (Zoecklein, c1995).

Stanovení redukujících cukrů podle Rebeleina je založeno na redukci přebytku mědi, který zůstane po reakci s redukujícími cukry. Tento přebytek je následně redukován přebytkem jodidového iontu k produkci ekvivalentního množství jódu. Poté se jód titruje thiosíranem sodným (Balík, 2006). Do roztoku se přidává vinan sodno-draselný kvůli snadnějšímu oddělování sraženiny Cu_2O . Komplex mědi a vinanu je stabilní i při vysokých teplotách, redukováná měď však netvoří tak pevný komplex s vinanem a snadno se v roztoku vysráží (Joslyn, 1970). Při tomto způsobu stanovení redukujících cukrů se musí dbát na několik vlivů, které by měly být pečlivě kontrolovány, aby byly výsledky správné. Používané roztoky jsou ve většině případů před stanovováním již nějakou dobu připraveny, což může vést k nepřesnostem výsledků. Roztoky nemohou být úspěšně uschovávány, protože podléhají snadnému rozkladu. Řešením je alespoň prodloužení doby rozkladu, kdy se roztoky uschovávají

v chladných prostorách nebo lednicích. Dalším ovlivňujícím faktorem je teplota. Při teplotách do 90°C se reakce urychluje, jakmile dosáhne teplota 100°C a více, nastává snížení množství mědi a tak mohou nastat určité odchylky (Zoecklein *et al.*, 2013).

Potenciometrická titrace

Tyto metody jsou založeny na potenciálu stanovovaných látek. Potenciál obecně závisí na zastoupení iontů v roztoku. Při indikaci se využívá retenční a indikační elektroda. Napětí se měří potenciometrem v závislosti na přidaném množství titračního činidla (Kříženecká *et al.*, 2014). Výsledky ze studie DE-AO, 2007 ukazují, že tato metoda je vysoce citlivá, rychlá a také pohodlná z hlediska detekce výsledků. Směrodatná odchylka byla pouze 0,09 (DE-AO, 2007). Ve studii Shalaby *et al.*, 1989 byl proveden pokus se zahříváním sacharidů ve vroucí vodní lázni s přebytkem alkalického roztoku bromidu a rtuti. Detekce konečného bodu byla provedena pomocí selektivní elektrody. Na základě statistické analýzy výsledků získaných touto metodou bylo prokázáno, že tato metoda může být použita se stejnou přesností jako metoda podle Bertranda (Shalaby *et al.*, 1989).

3.6 Enzymatické metody

Enzymy jsou biologické katalyzátory, díky kterým probíhá mnoho složitých chemických reakcí. Při těchto reakcích probíhá interakce mezi substrátem a enzymem za vzniku komplexu, který se dále štěpí na produkt. Enzym se uvolní v nezměněné formě. Reakce bývají nejefektivněji katalyzovány při pokojové teplotě a pH 7 (Guilbault, 1970). Enzymy jsou průmyslově připravovány a využívají se ke stanovování zhruba patnácti složek obsažených v nápojích. Tyto metody jsou velmi citlivé, a proto dokáží konkurovat i ostatním metodám a je to hlavní důvod, proč jsou používány také při analýzách vína. Tyto metody jsou založeny na měření nárůstu nebo poklesu absorbance NADH nebo NADPH, které jsou absorbovány v určité oblasti vlnových délek. Měření se obvykle provádí pomocí spektrofotometru při vlnové délce 340 nm. Nevýhody těchto metod jsou ve vyšší náročnosti na čas a finanční náročnosti. Enzymatické metody se využívají také jako referenční metody k ověření chromatografických (HPLC a IEC) a elektrochemických metod (Mato *et al.*, 2005).

Princip enzymatického stanovení glukózy a fruktózy je založen na biochemické reakci, ve které dochází díky ATP k fosforylaci glukózy a fruktózy za vzniku glukózy-6-fosfátu a fruktózy-6-fosfátu. V přítomnosti NADP a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy se glukóza-6-fosfát oxiduje na kyselinu 6-fosfoglukonovou. Koncentrace glukózy je

úměrná množství NADPH vzniklého redukcí NADP. Fruktóza-6-fosfát se pomocí fosfoglukózoizomerázy mění na glukózo-6-fosfát a dále oxiduje na kyselinu 6-fosfoglukonovou. V obou případech se měří koncentrace NADPH pomocí UV/VIS spektrometru jako absorbance při vlnové délce 340 nm (Balík, 2006).

Ve vinařství se enzymatické metody využívají především pro výzkum. Například při stanovení isomerní povahy kyseliny mléčné, která vzniká ze sacharidů při malolaktické fermentaci (Lafon-Lafourcade, 1978). Pomocí enzymatické reakce lze stanovit obsah glycerolu ve víně. Ve studii Nunes Fernandes et al., 2004 byla jako katalyzátor reakce využita glycerol dehydrogenáza. Spektrometricky pak bylo stanoveno množství vzniklého NADH, které představuje úměrnou koncentraci glycerolu ve víně. Tento postup umožňuje stanovení glycerolu bez předběžných úprav vzorku. (Nunes Fernandes *et al.*, 2004). V praxi se často enzymatickými metodami stanovuje především kyselina askorbová, fenolické látky a zajímavostí je také stanovení množství histaminu ve víně, který je ve větší míře pro člověka škodlivý (Landete *et al.*, 2004; Shekhovtsova et al. 2006; Stevanato *et al.*, 2004).

3.7 Hydrometrie

Hydrometrická stanovení se provádějí pomocí areometrů. Jedná se o skleněné přístroje, které fungují na základě stanovení hloubky ponoru v měřené kapalině. Hloubka ponoru a následné výsledky jsou ovlivněny teplotou a povrchovým napětím kapaliny. Areometry se dělí, podle toho jakou hodnotu udávají, na hustoměry a moštoměry. Hustoměry udávají pouze hustotu daného roztoku. Moštoměry jsou areometry, ze kterých lze přímo vyčíst koncentraci sacharidů. V praxi se využívá ke stanovení cukernatosti moštů (Balík, 2006).

Existují různé typy měřících přístrojů, které se od sebe liší stupnicí:

Československý normalizovaný moštoměr udává cukernatost ve stupních Normalizovaného moštoměru (°NM) tj. počet kilogramů cukru ve 100 l moštu.

Klosterneuburský moštoměr udává počet kilogramů cukru na 100 kg moštu. Stupeň Klosterneuburského moštoměru se značí °Kl a používá se především v Rakousku a na území Maďarska.

Oechsleho moštoměr je jedním z areometrů, který nezahrnuje obsah necukerných látek v moštu. Jeho stupnice udává relativní hustotu v Oechsleho stupních (°Oe). Tento moštoměr se používá hlavně v Německu a Švýcarsku.

Ballingův hustoměr udává ve stupních Brix ($^{\circ}\text{Brix}$, $^{\circ}\text{Bx}$) hmotností procento cukru při 20°C (Balík, 2006).



Obr. 7 Ukázka moštoměrů (Zdroj: archiv autora)

Práce s areometry není žádným způsobem náročná. Důležité je používat dokonale suché a čisté přístroje a dostatečně velké odměrné válce. Některé přístroje jsou spojeny s teploměry, které jsou dobrou a výhodnou součástí. Je totiž nutné si předem změřit teplotu moštu a naměřené hodnoty pak upravit podle tabulek. Výsledky odečítáme ze stupnice až poté, co se areometr v moštu ustálí a nedotýká se stěn odměrného válce. Cukernatost udává množství cukrů v roztoku. Cukernatost moštu má přímé spojení s pozdějším obsahem alkoholu a buketních látek ve víně. Jedná se o rozhodující faktor při zařďování budoucích vín podle kvality (Global Wines, 2001-2009).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Použité vzorky

Pro účely experimentální části byly použity následující vzorky vín. Jednalo se o dvě bílá vína. Vína byla českého původu, vypěstovaná na Jižní Moravě a zakoupená ve vinotéce Moravský sommelier v Lednici.

Tramín červený (TČ) – polosuché víno ročníku 2013, s obsahem alkoholu 12,5%. Výrobce tohoto vína je Víno Mikulov (K Vápence), patří pod kolekci Sommelier Club. Hrozny pocházely z vinařské obce Mikulov, viniční trať Pod Svatým Kopečkem I. Jedná se o jakostní víno s přívlastkem pozdní sběr, to znamená, že při sběru měl mošt cukernatost minimálně 21°NM.

Vetlínské zelené (VZ) – suché víno ročníku 2015 s obsahem alkoholu 13% od Břeclavského malovinaře Josefa Mráze (Gen. Šimka). Toto víno bylo vypěstováno na Moravě, ve vinařské obci Hrušky, která spadá pod Slováckou podoblast. Víno bylo zaříděno jako Moravské zemské, tedy vyrobeno výlučně z hroznů vypěstovaných na území Moravy. Víno bylo nakoupeno jako sudové (č. šarže 5/15).

4.1.2 Použité chemikálie

Pro stanovení redukcí cukrů podle Bertranda byly použity chemikálie:

- **Carez I:** roztok $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$
- **Carez II:** roztok $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$
- 0,02 molární roztok $KMnO_4$
- Roztok $Fe_2(SO_4)_3$: v 1000 ml je rozpuštěno 50 g $Fe_2(SO_4)_3$ + 110 ml koncentrované H_2SO_4
- **Fehling I:** v 1000 ml je rozpuštěno 69,3 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
- **Fehling II:** v 1000 ml je rozpuštěno 346 g vinanu sodno-draselného a 103,2 g NaOH. Musíme rozpouštět odděleně a až následně smíchat.

Pro stanovení redukcí cukrů podle Rebeleina byly použity chemikálie:

- **Roztok č. 1:** v 1000 ml je rozpuštěno 41,92 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 10 ml 0,5 molárního roztoku H_2SO_4
- **Roztok č. 2:** v 1000 ml je rozpuštěno 250 g vinanu sodno-draselného + 80 g NaOH. Musíme rozpouštět odděleně a až následně smíchat.

- **Roztok č. 3:** v 1000 ml je rozpuštěno 300 g KI + 100 ml 1 molárního NaOH
- **Roztok č. 4:** 16 % roztok kyseliny sírové H₂SO₄
- **Roztok č. 5:** 0,5 % škrobový maz
- **Roztok č. 6:** v 1000 ml je rozpuštěno 13,7772 g Na₂S₂O₃ · 5H₂O + 50 ml 1 molárního NaOH

4.1.3 Použité přístroje

ALPHA FTIR Spectrometer BRUKER, Německo

- k analýze vína není potřeba žádný spotřební materiál
- není potřeba žádná příprava vzorku před analýzou
- použita vzorkovací ATR technika
- možnost rozšíření kalibrací
- intuitivní software
- modul pro odběr vzorků QuickSnap™

4.1.4 Postup

Stanovení redukujících cukrů podle Bertranda

Nejdříve byly vzorky vín čířeny Carezovými roztoky a to následujícím způsobem. Do 100 ml odměrné baňky bylo pipetováno po 50 ml vzorku TČ (VZ) a následně bylo přidáno 5 ml roztoku Carez I a 5 ml roztoku Carez II. Obsah baňky byl důkladně promíchán. Poté byla baňka doplněna až po rysku destilovanou vodou a obsah byl opět promíchán. Připravený roztok byl pomocí filtračního papíru a nálevky přefiltrován do kádinky.

Do kónické baňky s vnějším zábrusem bylo následně odpipetováno 25 ml roztoku Fehling I a stejné množství roztoku Fehling II. K těmto roztokům bylo přidáno 20 ml čířeného vzorku TČ (VZ). Pečlivě promíchaná směs byla během 4-5ti minut přivedena k varu. Po uplynutí přesně 2 minut byla směs ochlazená 100 ml destilované vody. Po dobu cca 3 minut byl vzorek ponechán v klidu, aby došlo k usazení vyloučeného oxidu měďného na dno kónické baňky. Tekutina nad oxidem měďným byla slita přes fritu spojenou s vodní vývěvou tak, aby se na fritu přeneslo minimální množství oxidu měďného. Zbytek oxidu měďného, který zůstal usazený na dně kónické baňky, byl opakovaně prolit horkou destilovanou vodou. Frita byla následně přenesena na kónickou baňku s oxidem měďným, který byl rozpuštěn přelitím frity roztokem síranu

železitého o objemu 10–40 ml. Nakonec byla frita propláchnuta také horkou destilovanou vodou. Po rozpuštění veškerého oxidu měďného byla co nejdříve provedena titrace roztokem KMnO_4 do růžového zbarvení.

Stanovení redukujících cukrů podle Rebeleina

Do kuželovité baňky bylo napipetováno 10 ml roztoku č. 1 a 5 ml roztoku č. 2. Po promíchání byly přidány 2 ml vzorku TČ (VZ). Během 4–5ti minut byla směs přivedena k varu, který probíhal přesně po dobu 1,5 minuty. Poté byla směs co nejrychleji chlazená 25 ml destilované vody a pod tekoucí vodou byla její teplota upravena až na laboratorní teplotu. Po přidání 10 ml roztoku č. 3, 10 ml roztoku č. 4 a 10 ml roztoku č. 5 byla tato směs neprodleně titrována roztokem č. 6 do mléčně bílého. Toto zbarvení muselo vydržet po dobu alespoň tří minut. Současně byl proveden také slepý pokus, jehož stanovení probíhalo zcela totožně, akorát místo vzorku vína byly přidány 2 ml destilované vody.

Stanovení na přístroji ALPHA

ALPHA je analyzátor, který využívá FTIR metodu, založenou na absorpci infračerveného záření při průchodu analyzovaným vzorkem. Jedná se o spektrometrickou metodu. Před prvním měřením byl přístroj důkladně propláchnut deionizovanou vodou. Od každého vzorku bylo použito množství 1 ml. Z tohoto množství bylo 0,5 ml použito na propláchnutí přístroje. Ze zbývajících množství se provedly 3 měření, automaticky byly vyhodnoceny průměrné hodnoty.

4.2 Vyhodnocení

Veškeré rozbory byly provedeny v laboratořích Zahradnické fakulty v Lednici na Ústavu Vinohradnictví a vinařství. Každý vzorek byl jednotlivými metodami přeměřen ve třech opakováních. Výsledky byly zprůměrovány a jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Vyhodnocení stanovení redukujících cukrů podle Bertranda

Stanovení podle Bertranda proběhlo 15. 3. 2016. Po provedení pokusu byla nejdříve vypočtena hmotnost mědi podle vztahu $c = a \cdot f \cdot 7,157$

a...spotřeba KMnO_4

f...faktor $\text{KMnO}_4 = 1,0013$

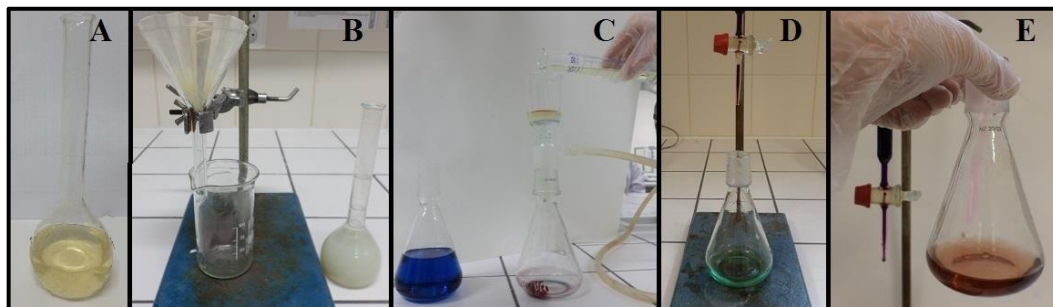
Výsledná hodnota byla pomocí tabulek převedena na odpovídající hmotnost redukujících cukrů stanovených v kónické baňce. Přepočtem na známý objem

testovaného vína byla vyjádřena koncentrace redukujících cukrů ve TČ (VZ). Výsledky byly zaznamenány do tabulky 6.

Tab. 6 Výsledky stanovení podle Bertranda – TČ a VZ

Tramín červený - TČ	
c ₁ red. cukrů [g /l]	9,9
c ₂ red. cukrů [g /l]	7,9
c ₃ red. cukrů [g /l]	9,4
Průměrná c red. cukrů [g/l]	9,1
Veltlínské zelené - VZ	
c ₁ red. cukrů [g /l]	9,1
c ₂ red. cukrů [g /l]	7,8
c ₃ red. cukrů [g /l]	8,5
Průměrná c red. cukrů [g/l]	8,5

Na obrázku 8 je znázorněný průběh stanovení podle Bertranda od přípravy vzorků až po konečné zbarvení po ukončení titrace. Nejdříve probíhala úprava vzorků přidáním Carezových roztoků (A). Filtrací (B) bylo získáno vyčiřené víno, které mohlo být následně stanovováno. Obrázek C zachycuje přelévání oxidu měďného roztokem síranu železitého. Na obrázku D a E je viditelná barevná změna na začátku titrace roztokem KMnO₄ a po jejím ukončení.



Obr. 8 Průběh stanovení redukujících cukrů podle Bertranda

Vyhodnocení stanovení redukujících cukrů podle Rebeleina

Stanovení podle Rebeleina proběhlo ve dnech 16. 3. a 22. 3. 2016. Výsledná koncentrace redukujících cukrů byla vypočtena podle vztahu: $c = a - b$

a...spotřeba roztoku č. 6 při titraci slepého pokusu [ml]

b...spotřeba roztoku č. 6 při titraci vzorku vína [ml]

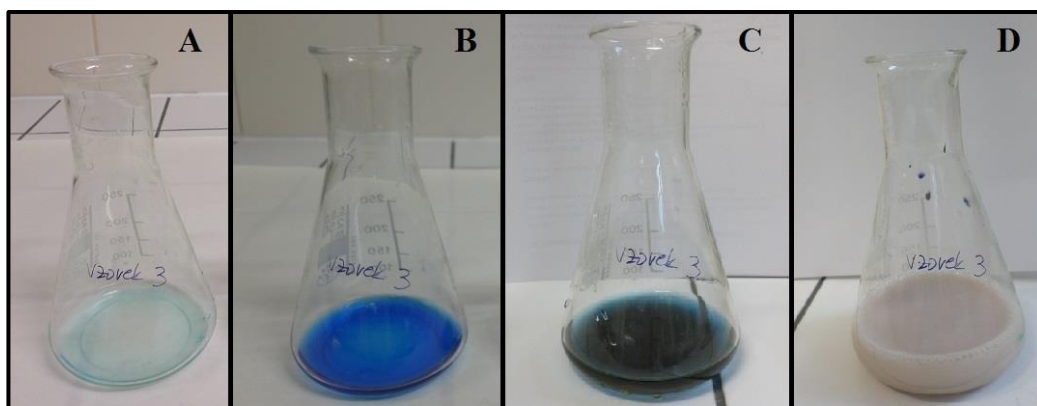
c...výsledná koncentrace redukujících cukrů [g/l]

Výsledky jednotlivých opakování a průměrné hodnoty byly zaznamenány do tabulky 7.

Tab. 7 Výsledky stanovení podle Rebeleina – TČ a VZ

Tramín červený - TČ	
c ₁ red. cukrů [g /l]	8
c ₂ red. cukrů [g /l]	9
c ₃ red. cukrů [g /l]	9
Průměrná c red. cukrů [g/l]	8,7
Veltlínské zelené - VZ	
c ₁ red. cukrů [g /l]	8,4
c ₂ red. cukrů [g /l]	8,5
c ₃ red. cukrů [g /l]	8,3
Průměrná c red. cukrů [g/l]	8,4

Na obrázku 9 jsou znázorněny barevné změny směsi TČ v průběhu stanovení podle Rebeleina. Obrázek A a B znázorňuje barevný rozdíl před přidáním roztoku č. 2 a po přidání. Na obrázku C byl roztok po vaření ochlazován na laboratorní teplotu. Poslední z obrázků je zachycením barevné změny po ukončení titrace.



Obr. 9 Barevné změny během stanovení podle Rebeleina

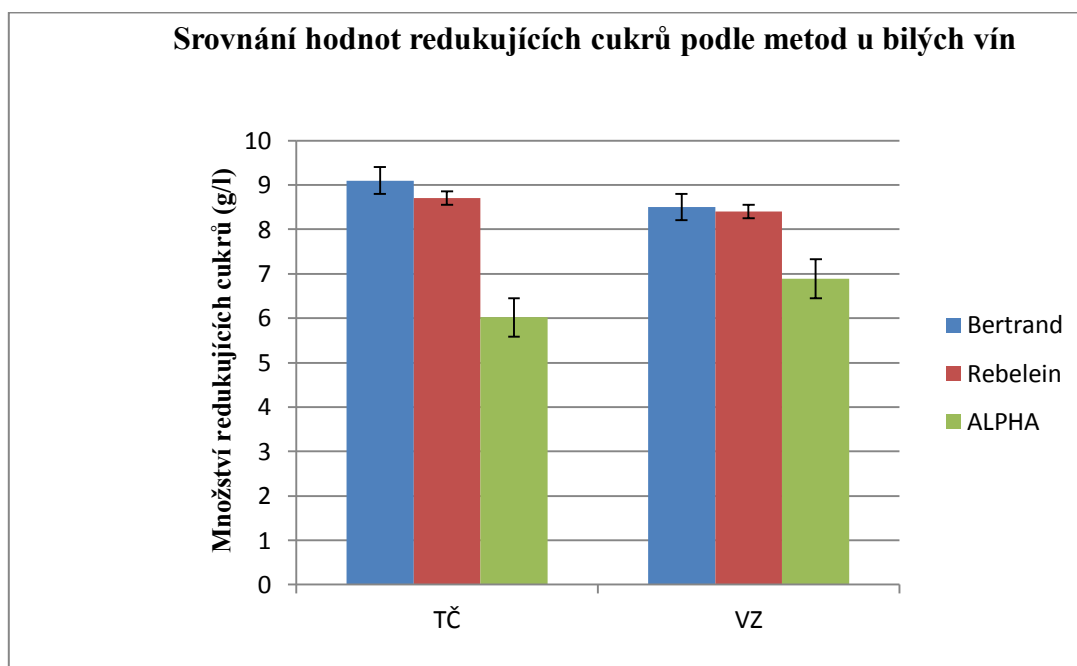
Vyhodnocení měření na přístroji ALPHA

Poslední stanovení proběhlo automaticky na přístroji ALPHA 19. 4. 2016. Přístrojem bylo stanoveno nejen množství redukujících cukrů, ale také další parametry, které jsou znázorněny v tabulce 8.

Tab. 8 Výsledky měření - ALPHA

	Alkohol	Titř. kys.	Red. cukry	Jablečná	Mléčná	Octová	Vinná	Glycerol	pH
	[%]	[g /l]							
TČ	12,38	6,57	6,02	2,67	0,58	0,62	2,46	6,57	3,38
VZ	12,57	5,47	6,89	1,19	0,49	0,35	1,97	6,39	3,35

Graf 1 znázorňuje srovnání výsledků ze všech tří metod u vzorků TČ a VZ. Je viditelné, že výsledky titračních metod jsou u jednotlivých vzorků velmi podobné. Rozdíl mezi stanovením podle Bertranda a Rebeleina u vzorku VZ se liší o pouhou desetinu g/l . Oproti tomu vyhodnocení na přístroji ALPHA uvedlo značně odlišné výsledky. V grafu 1 je znázorněno jak malý rozdíl je ve výsledných hodnotách při stanovení podle Rebeleina, u jednotlivých vzorků. Víno polosuché (TČ) má srovnatelné množství redukujících cukrů jako víno suché (VZ).



Graf 1 Srovnání hodnot redukujících cukrů podle metod u bílých vín

4.3 Diskuze

Byl proveden pokus týkající se stanovení sacharidů ve vzorcích vín třemi analytickými způsoby. Z naměřených dat a jejich vyhodnocení lze konstatovat, že titrační metody, které byly využity, jsou pro stanovení sacharidů vhodnější variantou nežli automatická analýza na spektrometrickém přístroji ALPHA. Tato přístrojová analýza není pro stanovení sacharidů vhodnou alternativou, jedná se spíše o orientační metodu využívanou pro rychlé ale méně přesné měření. Množství redukujících cukrů u vzorku TČ jsou stanoveny podle Bertranda na 9,1 g/l a podle Rebeleina na 8,7 g/l. Vzorek VZ obsahuje podle Bertrandovy metody 8,5 g/l a podle Rebeleina 8,4 g/l.

Z časového hlediska jsou titrační metody velmi náročné. Nejdéle probíhalo stanovení podle Bertranda, při němž byla nejdříve provedena příprava vzorků spojená s filtrací. Při průběhu samotného pokusu byly zaznamenány další časové prostoje spojené se zahříváním a ochlazováním vzorků a následnou filtrací přes fritu. Každé stanovení se provádělo ve třech opakováních, takže celkový pokus probíhal v rámci několika hodin. Naproti tomu analýza obou vzorků ve třech opakováních na přístroji ALPHA byla provedena během necelé půl hodiny a byly stanoveny nejen redukující cukry, ale také řada dalších chemických látek. Také Yebra et al., 1993 ve své studii uvádí výhody spektrometrických stanovení především v jejich rychlosti a snadné přípravě vzorků. Provedl stanovení sacharidů dle Bertranda, Rebeleina a atomové absorpční spektrometrie. Oproti ručním metodám, které zaberou v průměru hodinu až hodinu a půl na stanovení jednoho vzorku, byla určena průměrná doba trvání stanovení jednoho vzorku přístrojovou analýzou na pouhé tři minuty (Yebra *et al.*, 1993).

Pro snadnější a rychlejší průběh titračních metod bych doporučila využití automatických titračních zařízení. Ve studii Nazarenko, 2010 byly zkoumány různé možnosti automatické detekce při titracích. S využitím instrumentálních detektorů (CCD na bázi spektrofotometru, kamera s RGB digitalizací, fotodiody s příslušnými filtry) se zkrátila doba titrace a zvýšila se přesnost (s chybou 0,1-1%). Tato alternativa představuje cenově dostupnou možnost jak vylepšit titrační metody zejména v malých laboratořích a na univerzitách. Pořizovací náklady se pohybují pouze ve stovkách dolarů (Nazarenko, 2010). Automatická titrační zařízení jsou také vhodnější pro stanovení červených vín. Klasický způsob nahradil Feng et al., 2009 při svém experimentu automatickým potenciometrickým titrátorem spojeným s vysokoteplotní

redoxní elektrodou. Stanovení sacharidů takto vylepšenou metodou vykazovalo nízkou relativní odchylku 0,124% - 1.637% (Feng *et al.*, 2009).

De Castro *et al.*, 2005 ve své studii také srovnával různé způsoby stanovení redukujících cukrů. Použil stanovení jak titrační, tak i pomocí HPLC, spektrofotometrie a refraktometrie. Došel k závěru, že všechny přístrojové analytické metody, jsou výhodnější než ty titrační. Ne že by byly titrační metody nepřesné, ale nemají žádné specifické výhody. Naopak u modernějších analytických metod využívající přístroje je možné stanovovat více látek najednou, což je v dnešní době velkou výhodou (De Castro *et al.*, 2005).

Bodově byly na základě prostudované literatury a praxe ohodnoceny jednotlivé analytické metody z hlediska přesnosti, obtížnosti na obsluhu, náročnosti na čas a finančních nákladů. Bodová škála je od 1 do 5, kdy 5 je nejlepší možné ohodnocení. Porovnání je uvedeno v tabulce 9. Celkově nejlépe ohodnocené byly chromatografické metody. Nejméně bodů bylo přiděleno enzymatickým metodám, ale nelze říct, že jsou nejméně vhodným způsobem pro stanovení sacharidů. Jejich největším nedostatkem je finanční a časová náročnost, která je spojena s přípravou a pořizováním vhodných enzymatických činidel.

Tab. 9 Bodování analytických metod

Metody	Přesnost	Obtížnost	Náročnost na čas	Finanční náklady
Chromatografické	5	5	5	1
Spektrometrické	1	4	4	4
Elektrochemické	4	3	3	3
Titrační	3	2	1	5
Enzymatické	2	1	2	2

5 ZÁVĚR

Analytické metody jsou využívány pro stanovení nejrůznějších chemických komponent nejen ve víně ale také v ostatních nápojích a potravinách. Tyto metody jsou neustále zdokonalovány, hlavně na úrovni technických přístrojů, což vede k získávání stále přesnějších dat za kratší dobu. Analytické metody, využívané ke stanovení sacharidů v moštu a ve víně, jsou hodnoceny na základě několika aspektů, podle kterých lze tyto metody navzájem porovnávat.

Nejlépe hodnocené jsou chromatografické metody. Jejich přednosti jsou založené zejména na vysoké citlivosti a přesnosti stanovení. Ve většině případů není nutná předchozí příprava vzorků (derivatizace, filtrace, dekolorizace, aj.). Pokud jsou nějaké úpravy vzorků nutné, jedná se pouze o snadné pracovní postupy.

Doba stanovení se liší podle typu chromatografické metody. Nejpomalejším způsobem je nízkotlaká kapalinová chromatografie (LPC), kdy stanovení probíhá i několik hodin. Nejefektivnější a nejrychlejší je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kdy stanovení probíhá pouze pár minut. Právě HPLC je v současné době nejvíce využívanou metodou. Má velké pole působnosti, často bývá spojena se spektrometrickými detektory. Její velkou nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady. Cena jednoho stanovení sacharidů metodou HPLC s refraktometrickou detekcí je 1250 Kč.

Spektrometrické a Elektrometrické metody byly ohodnoceny stejným počtem bodů. Zde je důležité si uvědomit, že srovnání metod záleží na stanovované látce. Pro stanovení sacharidů jsou z hlediska přesnosti sice lepší elektrochemické metody, ale jejich nevýhody spočívají ve vyšší obtížnosti. Ta je spojená s přípravou vzorků. Je potřeba ze sacharidů, které jsou jinak neutrální, uvolnit energii takovým způsobem, aby se uvolnila kontrolovaně a mohla být měřena. V dnešní době disponují obě tyto metody automatizovanými počítači, které ihned vyhodnotí naměřené hodnoty. Pořizovací náklady jsou podle typu přístroje rozdílné. Drahé elektrochemické přístroje mohou být nahrazeny sensory s jednoduchou elektronikou.

Cena spektrometrického stanovení glukózy, fruktózy a sacharózy v akreditovaných laboratořích se pohybuje okolo 330 Kč.

Titrační metody se umístily na předposledním místě. Největší nevýhoda těchto metod spočívá ve zdlouhavém a obtížném procesu samotného stanovení. Mnohé

studie, které využívají ke stanovení sacharidů titrační metody, jsou z padesátých let 20. století. Jedná se o velmi dlouho používané metody, ale s postupem času je jejich využití nahrazováno plně automatizovanými přístroji. Titrační metody nejsou finančně nákladné, proto se používají v univerzitních a menších laboratořích. Ke zjednodušení pracovní náročnosti přispívá využití automatických titračních přístrojů.

Další metody jsou enzymatické. V bodování se umístily na posledním místě. Jejich největší přednost spočívá v přesnosti a rychlosti stanovení. Jsou vysoce sensitivní na organické a biochemické látky. Jejich využívání v praxi je však brzděno finanční náročností. Nejen že pořizovací náklady enzymatických analyzátorů jsou vysoké, ale ke stanovení je zapotřebí enzymatických činidel. Zdlouhavá příprava a uschovávání těchto preparátů jsou velmi drahé záležitosti. Proto se v praxi tyto metody vyskytují prozatím velmi málo.

6 SOUHRN

Analytické metody pro stanovení sacharidů v moštu a víně

Víno je velmi komplexní produkt, který obsahuje velké množství látek. Mnoho z nich je ve velmi nízkých koncentracích, ale i přesto hrají důležitou roli. Celková analýza vína je sice náročná, ale jde o jediný způsob jak získat potřebné informace.

Literární část této bakalářské práce seznamuje čtenáře s chemickými vlastnostmi sacharidů, které se nejvíce podílejí na celkové charakteristice vína. Jedná se především o glukózu, fruktózu a sacharózu. Bylo uvedeno rozdělení analytických metod, které se využívají ke stanovení sacharidů v moštu a ve víně a na základě prostudovaných studií uvedeny trendy, které se v této oblasti v současné době využívají a které vedou ke zvýšené účinnosti pro stanovení sacharidů.

V experimentální části byly ke stanovení redukujících cukrů u dvou vzorků bílých vín využity dvě titrační metody. Analýza vzorků proběhla také na spektrometrickém přístroji ALPHA. Na základě praxe a poznatků z literatury byly metody porovnány z hlediska přesnosti, obtížnosti, časové náročnosti a finančních nákladů spojených s jejich užíváním.

Klíčová slova: sacharidy, chemická analýza, chromatografie, spektrometrie, elektrochemické metody, titrační metody, enzymatické metody, ALPHA

RESUMÉ

Analytical methods for the determination of carbohydrates in must and wine

Wine is a complex product contains of large number of substances. Many of them are in very low concentrations, but nevertheless play an important role. Overall analysis of wine is indeed difficult, but it is the only way to get needed information.

Literary part of this thesis introduces the readers with the chemical properties of carbohydrates, which are the most important for total characteristics of the wine. The most represented carbohydrates are glucose, fructose and sucrose. It summarized the distribution of analytical methods for determination of carbohydrates in must and wine. Based on studies there were presented trends which are in this area currently used and which lead to increasing efficiency for the determination of carbohydrates.

In the experimental part was for determine the reducing sugars in the two samples of white wine used two titration methods. Analysis of samples was also determined by spectrometric instrument ALPHA. Methods were compared from the aspects of accuracy, difficulty, time demands and financial costs associated with their application based on the experiment and knowledge of the literature.

Keywords: carbohydrates, sugars, chemical analysis, chromatography, spectrometry, electrochemical methods, titration methods, enzymatic methods, ALPHA

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ARAÚJO, Alberto N., José L F C LIMA, António O S S RANGEL a Marcela A. SEGUNDO, 2000. Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. In: *Talanta* [online]. s. 59–66. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-9140(99)00338-0
- ADAMS, Ralph N. *Electrochemistry at solid electrodes*. New York: Marcel Dekker, 1969. Monographs in electroanalytical chemistry and electrochemistry.
- BAKKER, Jokie a Ronald J CLARKE. *Wine flavour chemistry*. 2nd ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2012. ISBN 978-1-4443-3042-7.
- BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. 3. vyd. /. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2006. ISBN 80-7157-933-5.
- BARTOŠ, Martin, *et al.* *Analytická chemie I*. Univerzita Pardubice, 2004.
- BERTHOMIEU, Catherine a Rainer HIENERWADEL, 2009. *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy* [online]. 2009. ISBN 0166-8595. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-009-9439-x
- BRETT, Christopher M. A. a Ana Maria Oliveira. BRETT. *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. New York: Oxford University Press, 1993. ISBN 0198553889.
- BRUGGINK, Cees, Rolf MAURER, Heiko HERRMANN, Silvano CAVALLI a Frank HOEFLER, 2005. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* [online]. s. 104–109. ISBN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.03.108
- CALULL, M., R. M. MARC?? a F. BORRULL, 1992. Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchange high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A* [online]. roč. 590, č. 2, s. 215–222. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(92)85384-6

- CASTELLARI, M., a. VERSARI, U. SPINABELLI, S. GALASSI a a. AMATI, 2007. An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* [online]. roč. 23, č. 13, s. 2047–2056. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1081/JLC-100100472
- CLARK, Jim. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - HPLC. In: *Chemguide: Helping you to understand Chemistry* [online]. Cambridge: Longman, 2007 [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
- Cukernatost. In: *Global Wines: Váš dodavatel vína* [online]. Praha: Global Wines, 2009 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.global-wines.cz/cukernatost>
- DE-AO, Xie. Determination of reducing sugar content in wine by potentiometric titration [J]. *Food Engineering*, 2007, 3: 020.
- DE CASTRO, MD LUQUE; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ-JUAN, P. *Analytical Methods in Wineries: Is It Time to Change?*. Food Reviews International, 2005, 21: 231-265.
- DE OLIVEIRA, Gabrieli Alves, Fernanda DE CASTILHOS, Catherine Marie Geneviève Claire RENARD a Sylvie BUREAU, 2014. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Research International* [online]. roč. 60, s. 154–162. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2013.10.051
- DE VILLIERS, a., F. LYNEN, a. CROUCH a P. SANDRA, 2004. Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine. *Chromatographia*. roč. 59, s. 403–409.
- DUBOIS, Michel, K. a. GILLES, J. K. HAMILTON, P. a. REBERS a Fred SMITH, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* [online]. roč. 28, č. 3, s. 350–356. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac60111a017

- EDELMANN, Andrea, Josef DIEWOK, Josefa Rodriguez BAENA a Bernhard LENDL, 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* [online]. roč. 376, č. 1, s. 92–97. ISSN 16182642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-003-1879-0
- FENG Xiao-yuan, LI Wen-sheng, WANG Bao-gang, ZHANG Chang-song, SHI Lei, YANG Jun-jun (Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093); *Determination of reducing sugar of fruits by automatic potentiometric titration*[J]; *Food Science and Technology*; 2009-08
- GUILBAULT, George G. *Enzymatic methods of analysis*. [1st ed.]. New York: Pergamon Press, 1970. ISBN 0080069894.
- How Does High Performance Liquid Chromatography Work? In: *Waters: The science of what's possible*[online]. Massachusetts: Waters Corporation, 2016 [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ
- CHEN, Fu Tai A, Thomas S. DOBASHI a Ramon A. EVANGELISTA, 1998. Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis. *Glycobiology* [online]. roč. 8, č. 11, s. 1045–1052. ISSN 09596658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/8.11.1045
- JACKSON, Ron S. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed. Burlington: Elsevier Acad. Press, 2008. ISBN 978-0-12-373646-8.
- JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. 1.vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. ISBN 80-7157-647-6.
- JOSLYN, A (ed.). *Methods in food analysis: physical, chemical and instrumental methods of analysis*. 2nd edit. New York: Academic Press, 1970. Food science and technology.

- JUE, Chong K. a Peter N. LIPKE, 1985. Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. roč. 11, č. 2-3, s. 109–115. ISSN 0165022X. Dostupné z: doi:10.1016/0165-022X(85)90046-6
- KELEBEK, Hasim, Serkan SELLI, Ahmet CANBAS a Turgut CABAROGLU, 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal* [online]. roč. 91, č. 2, s. 187–192. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2008.10.008
- KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- KOLUSHEVA, T.; MARINOVA, A. *Fast complexometric method for analysis of reducing sugars obtained during starch hydrolysis*. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 2011, 46.1: 75-80.
- KŘÍŽENECKÁ, Sylvie; SYNEK, Václav. *Základy analytické chemie*. Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014.
- KULIGOWSKI, J., G. QUINTÁS a B. LENDL, 2010. High performance liquid chromatography with on-line dual quantum cascade laser detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wine and grape juice. *Applied Physics B: Lasers and Optics* [online]. roč. 99, č. 4, s. 833–840. ISSN 09462171. Dostupné z: doi:10.1007/s00340-010-4013-y
- LAFON-LAFOURCADE, S, 1978. [Enzymatic methods in the analysis of musts and wines]. *Ann Nutr Aliment* [online]. roč. 32, č. 5, s. 969–974. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=754599
- LANDETE, J M, S FERRER a I PARDO, 2004. Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food additives and contaminants* [online]. roč. 21, č. 12, s. 1149–1154. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652030400019737

- LÓPEZ-TAMAMES, Elvira, M. A. PUIG-DEU, Evanilda TEIXEIRA a Susana BUXADERAS, 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*. roč. 47, č. 2, s. 193–198. ISSN 00029254.
- MARCY, J E a D E CARROLL, 1982. *A rapid method for the simultaneous determination of major organic acids and sugars in grape musts*. 1982. ISBN 0002-9254.
- MATO, Inés; SUÁREZ-LUQUE, Silvia; HUIDOBRO, José F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 2005, 38.10: 1175-1188.
- MATSUHIRO, Betty, Rodrigo TORRES, Elisa A. ZÚÑIGA, Maria J. AGUIRRE, Leonora MENDOZA a Mauricio ISAACS, 2009. Determination of low molecular weight carbohydrates in Cabernet sauvignon red wines. *Journal of the Chilean Chemical Society* [online]. roč. 54, č. 4, s. 405–407. ISSN 07179324. Dostupné z: doi:10.4067/S0717-97072009000400018
- MEYER, V. R., 2013. CHROMATOGRAPHY | Overview. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.00080-9
- MICHLOVSKÝ, Miloš. Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře. Vyd. 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014. ISBN 978-80-905319-2-5.
- MILDE, David. Hmotnostní spektrometrie. *Katedra analytické chemie - UP v Olomouci* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/10-im-ms-1352292974.pdf>
- MOIO, L., A. GAMBUTI, L. DI MARZIO a P. PIOMBINO, 2001. Differential pHmeter determination of residual sugars in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. roč. 52, č. 3, s. 271–274. ISSN 00029254.
- MOREIRA, José Luís a Lúcia SANTOS, 2004. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. In: *Analytica Chimica Acta* [online]. s. 263–268. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2003.09.029

- MULDER, Gerrit Jan. *The chemistry of wine*. Editor H JONES. London: John Churchill, New Burlington Street, 1923.
- MUTENDA, Kudzai E a Rune MATTHIESEN, 2007. Analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. roč. 367, s. 289–301. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1385/1-59745-275-0:289
- NAZARENKO, Alexander Y., 2010. Optical Sensors for Manual and Automatic Titration in Undergraduate Laboratory. *Spectroscopy Letters* [online]. roč. 43, č. 7-8, s. 555–560. ISSN 0038-7010. Dostupné z: doi:10.1080/00387010.2010.510705
- NEDOMA, Josef, Vilém KOUTNÍK a Petr HRDLIČKA. *Anorganická a analytická chemie* [příl.]. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1994. ISBN 80-7157-133-4.
- NOE, Christian R., Bodo LACHMANN, Sven MÖLLENBECK a Peter RICHTER, 1999. Determination of reducing sugars in selected beverages by capillary electrophoresis. *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung a* [online]. roč. 208, s. 148–152. ISSN 1431-4649. Dostupné z: doi:10.1007/s002170050392
- NUNES FERNANDES, Elizabeth, Mariele Nair DE CAMPOS MOURA, José Luis F COSTA LIMA a Boaventura F. REIS, 2004. Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry. *Microchemical Journal* [online]. roč. 77, č. 2, s. 107–112. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2004.02.003
- OEFNER, P J a C CHIESA, 1994. *Capillary electrophoresis of carbohydrates*. [online]. ISBN 0959-6658 (Print). Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-875-1
- RENGER, František; KALOUS, Jaromír. *Analytická chemie "I*. Univerzita Pardubice, Chemicko-technologická fakulta, 1998.
- RIBÉREAU-GAYON, P., Y. GLORIES, A. MAUJEAN a D. DUBOURDIEU, 2006. *Handbook of Enology* [online]. ISBN 0470010371. Dostupné z: doi:10.1002/0470010398

- RODRIGUES, João A., Adrian M. TAYLOR, David P. SUMPTON, James C. REYNOLDS, Russell PICKFORD a Jane THOMAS-OATES, 2007. *Mass Spectrometry of Carbohydrates: Newer Aspects* [online]. 2007. ISBN 0123739209. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2318(07)61003-8
- ROIG, Benoit a O. THOMAS, 2003. UV monitoring of sugars during wine making. *Carbohydrate Research* [online]. roč. 338, č. 1, s. 79–83. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6215(02)00396-8
- RONKAINEN, Niina J, H Brian HALSALL a William R HEINEMAN, 2010. Electrochemical biosensors. *Chemical Society reviews* [online]. roč. 39, č. 5, s. 1747–63. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/b714449k
- SÁDECKÁ, J. a J. POLONSKÝ, 2000. *Electrophoretic methods in the analysis of beverages* [online]. 2000. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)00426-X
- SÁENZ-LÓPEZ, Rubén, Purificación FERNÁNDEZ-ZURBANO a María Teresa TENA, 2004. Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. roč. 1052, č. 1-2, s. 191–197. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.08.007
- SCIENTIFIC ADVISORY COMMITTEE ON NUTRITION, 2015. Carbohydrates and Health. *TSO The Stationary Office*. č. August, s. 1–6.
- SHALABY, A., R. EL-HEHABY a A. ABOUL-KHEIR, 1989. Indirect potentiometric titration of reducing carbohydrates. I. Using alkaline potassium mercuric bromide solution and sulphide selective electrode. *Acta Pharmaceutica Hungarica*. roč. 59, č. 5, s. 201–204. ISSN 00016659.
- SHEKHOVTSOVA, Tatyana N., Svetlana V. MUGINOVA, Julia A. LUCHININA a Anna Z. GALIMOVA, 2006. Enzymatic methods in food analysis: determination of ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta* [online]. roč. 573-574, s. 125–132. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2006.05.015

- SKOGERSON, Kirsten, Ron RUNNEBAUM, Gert WOHLGEMUTH, Jeffrey DE ROPP, Hildegard HEYMANN a Oliver FIEHN, 2009. Comparison of Gas Chromatography-Coupled Time-of-Flight Mass Spectrometry and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Metabolite Identification in White Wines from a Sensory Study Investigating Wine Body. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. roč. 57, č. 15, s. 6899–6907. ISSN 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf9019322
- SOGA, Tomoyoshi a Maria SERWE, 2000. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry* [online]. roč. 69, č. 3, s. 339–344. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(00)00044-3
- STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 2002. ISBN 80-903201-0-4.
- STEVANATO, Roberto, Sabrina FABRIS a Federico MOMO, 2004. New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. roč. 52, č. 20, s. 6287–6293. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf049898s
- STYLIANOPOULOS, C., 2013. Carbohydrates: Chemistry and Classification. In: *Encyclopedia of Human Nutrition* [online]. s. 265–271. ISBN 978-0-12-384885-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-375083-9.00041-6
- TKACHENKO, Nikolai V. *Optical spectroscopy: methods and instrumentations*. Elsevier, 2006.
- VACEK, Lubor. *Organická chemie*. 1.vyd. Brno: VŠZ, 1985.
- VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 1: [Investice do rozvoje vzdělávání, reg.č.: CZ1.07/2.2.00/15.0084]*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.

- VONACH, R., B. LENDL a R. KELLNER, 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* [online]. roč. 824, č. 2, s. 159–167. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00570-6
- WALKER, Teresa, Justin MORRIS, Renee THRELFALL a Gary MAIN, 2003. Analysis of wine components in Cynthiana and Syrah wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. roč. 51, č. 6, s. 1543–1547. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf026132o
- WEPPNER, Werner; HUGGINS, Robert A. *Electrochemical methods for determining kinetic properties of solids. Annual Review of Materials Science*, 1978, 8.1: 269–311.
- WIEL, Henk J Van De, 2003. Determination of elements by ICP-AES and ICP-MS. *National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)*. č. September, s. 1–37.
- WILDMAN, Sam G a Elmer HANSEN, 1940. A SEMI-MICRO METHOD FOR THE DETERMINATION OF REDUCING SUGARS. *Plant Physiology* [online]. 10., roč. 15, č. 4, s. 719–725. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437868/>
- WILLIAMS, a a V FRASCA, 2001. Ion-exchange chromatography. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* [online]. roč. Chapter 8, s. Unit8.2. ISSN 1934-3663. Dostupné z: doi:10.1002/0471140864.ps0802s15
- YAN, Zhu, Zhang XINGDE a Niu WEIJUN, 1997. Simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in beer and wine by ion chromatography. *Mikrochimica Acta* [online]. roč. 127, s. 189–194. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/BF01242721

YEBRA, M.C., M. GALLEGU a M. VALCÁRCEL, 1993. Automatic determination of reducing sugars by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. roč. 276, č. 2, s. 385–391. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2670(93)80409-E

ZEHNÁLEK, Josef. *Biochemie 2*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. ISBN 80-7157-716-2.

ZOECKLEIN, Bruce W. *Wine analysis and production*. New York: Chapman & Hall, c1995. ISBN 0412989212.

ZOECKLEIN BRUCE W., KENNETH C. FUGELSANG, BARRY H. GUMP, FRED S. NURY., by Bruce W. Zoecklein, Kenneth C. Fugelsang, Barry H. Gump, Fred S. Nury. *Production Wine Analysis*. Boston, MA: Springer Verlag, 2013. ISBN 9781461581482