

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení obsahu siřičitanů ve víně

Lucie Dibelková

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Dibelková**  
Osobní číslo: **C16059**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Stanovení obsahu siřičitanů ve víně**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte literární rešerši:

1. V teoretické části popište význam a využití siřičitanů a oxidu siřičitého v potravinářství. Dále se zaměřte na možnosti nahrazení siřičitanů a oxidu siřičitého v potravinách jinou chemikálií či metodou konzervace. Charakterizujte analytické metody a postupy, které se používají na stanovení siřičitanů a oxidu siřičitého v potravinách.
2. V experimentální části stanovte obsah siřičitanů ve víně dvěma metodami a tyto metody porovnejte.
3. Získané výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte s literaturou.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**


Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 19. 6. 2019

Lucie Dibelková

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tomáši Hájkovi Ph.D. za cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michaele Janečkové za odbornou pomoc při provedení experimentální části. Panu Tomáši Blatovi děkuji za poskytnutí vzorků vín.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se v teoretické části zaměřuje na využití a význam siřičitanů v potravinářství a jejich stanovení. Dále je zde popsán technologický proces výroby vína a jsou zde uvedeny možné náhrady siřičitanů použitelné jak ve víně, tak v ostatních potravinách.

Experimentální část je zaměřena na stanovení obsahu siřičitanů ve víně dvěma metodami, jodometricky a izotachoforeticky. Jodometrickou metodou byl stanoven obsah volných a celkových siřičitanů v deseti vzorcích bílých, růžových i červených vín. Izotachoforeticky byly stanoveny koncentrace pouze volných siřičitanů. Obě metody byly následně porovnány.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

siřičitany, oxid siřičitý, víno, jodometrie, izotachoforéza

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis focuses on the use and importance of sulphites in food industry and their determination. Further, possible substitutions of sulphites in food are described. The technological process of wine production is described in the last section of the theoretical part.

The experimental part is focused on the determination of sulphites in ten samples of white, pink and red wines by two methods, iodometric titration and isotachopheresis method. Both methods were used for the determination of free sulphites and only the iodometric method was used for the determination of total sulphites.

## **KEY WORDS**

sulphites, sulphur dioxide, wine, iodometry, isotachopheresis

# OBSAH

Úvod.....	12
1 Teoretická část.....	13
1.1 Víno.....	13
1.1.1 Rozdělení vín.....	13
1.1.2 Výroba vína.....	14
1.1.3 Síření vína.....	17
1.2 Siřičitany.....	18
1.2.1 Siřičitany z chemického hlediska.....	18
1.2.1.1 Oxid siřičitý.....	18
1.2.1.2 Siřičitany.....	18
1.2.2 Siřičitany v potravinářství.....	20
1.2.2.1 Siřičitany jako konzervanty.....	21
1.2.2.2 Siřičitany jako antioxidanty.....	21
1.2.2.3 Míra škodlivosti siřičitanů.....	22
1.2.2.4 Siřičitany jako alergeny.....	23
1.2.3 Náhrady siřičitanů.....	25
1.2.3.1 Polyfenoly.....	25
1.2.3.2 Lysozym.....	26
1.2.3.3 Kyselina askorbová.....	27
1.2.3.4 Koloidní stříbro.....	29
1.2.3.5 C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> a C <sub>10</sub> nasycené mastné kyseliny.....	29
1.2.3.6 Dimethyldikarbonát.....	29
1.2.3.7 Fyzikální metody.....	30
1.2.4 Siřičitany ve víně.....	31
1.2.4.1 Formy SO <sub>2</sub> .....	31
1.2.4.2 Legislativa.....	32
1.2.5 Stanovení siřičitanů.....	33
1.2.5.1 Průtoková injekční analýza (FIA).....	33
1.2.5.2 Monier–Williamsova metoda.....	34
1.2.5.3 Enzymatická metoda.....	34
1.2.5.4 Izotachforetické stanovení.....	34
1.2.5.5 Jodometrická metoda.....	34

1.2.5.6	Iontová chromatografie .....	35
1.2.5.7	Cyklická voltametrie s tištěnými elektrodami.....	35
2	Experimentální část .....	36
2.1	Vzorky.....	36
2.2	Jodometrické stanovení.....	36
2.2.1	Pomůcky .....	36
2.2.2	Činidla.....	36
2.2.3	Postup.....	37
2.2.4	Standardizace roztoků.....	37
2.3	Izotachoforetické stanovení .....	39
2.3.1	Přístroje a pomůcky .....	39
2.3.2	Činidla.....	39
2.3.3	Příprava roztoků.....	39
2.3.4	Postup.....	40
3	Výsledky a diskuze.....	41
3.1	Jodometrie .....	41
3.1.1	Obsah volného SO <sub>2</sub> ve vzorcích .....	41
3.1.2	Obsah celkového SO <sub>2</sub> ve vzorcích .....	42
3.2	Izotachoforéza .....	43
3.2.1	Kalibrační závislost délky zóny na koncentraci siřičitanů.....	44
3.2.2	Obsah volného SO <sub>2</sub> ve vzorcích .....	45
3.3	Porovnání .....	46
4	Závěr.....	48
5	Seznam použité literatury .....	49
6	Přílohy .....	52



## Seznam zkratk

EU .....	Evropská unie
IgE .....	Imunoglobulin E
FASEB .....	Federace amerických společností pro experimentální biologii
CSC .....	Komplex koloidního stříbra
UV .....	Ultrafialové záření
PEF .....	Pulsní elektrické pole
ES .....	Evropské společenství
FIA .....	Průtoková injekční analýza
°NM .....	Stupeň normalizovaného moštoměru
NADH, NAD <sup>+</sup> .....	Nikotinamidadeninukleotid
HMS .....	Hydroxymethylsulfonát

## Seznam ilustrací a tabulek

### Seznam ilustrací:

Obrázek 1: Schéma výroby bílého a červeného vína [3] .....	14
Obrázek 2: Značení alergenů na obalech potravin.....	25
Obrázek 3: Chemická struktura kyseliny rozmarýnové (A) a epigalokatechin galátu (B) .....	26
Obrázek 4: Struktura lysozymu [23].....	27
Obrázek 5: Chemická struktura kyseliny askorbové .....	28
Obrázek 6: Schéma působení kyseliny askorbové v potravinách [26] .....	28
Obrázek 7: Chemická struktura dimetyldikarbonátu .....	30
Obrázek 8: Základní schéma FIA .....	33
Obrázek 9: Ukázkový izotachoforeogram pro jeden standardní roztok a vzorek č. 3 .....	44
Obrázek 10: Kalibrační závislost délky zóny na koncentraci siřičitanů .....	45
Obrázek 11: Grafické znázornění obsahu siřičitanů z obou metod .....	46

### Seznam tabulek:

Tabulka 1: Seznam siřičitanů [13] .....	20
Tabulka 2: Popis vzorků vín .....	36
Tabulka 3: Standardizace $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ : Hmotnosti $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , objemy a výsledné koncentrace $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .....	38
Tabulka 4: Objemy $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pro standardizaci $\text{I}_2$ .....	38
Tabulka 5: Obsahu volného $\text{SO}_2$ ve víně stanovený jodometricky .....	42
Tabulka 6: Obsahu celkového $\text{SO}_2$ ve víně stanovený jodometricky.....	43
Tabulka 7: Výsledný obsah volného $\text{SO}_2$ ve vzorcích stanovený izotachoforeticky .....	45
Tabulka 8: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 1 .....	57
Tabulka 9: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 2.....	57
Tabulka 10: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 3 .....	57
Tabulka 11: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 4.....	57
Tabulka 12: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 5 .....	57
Tabulka 13: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 6.....	58
Tabulka 14: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 7.....	58
Tabulka 15: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 8.....	58
Tabulka 16: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 9.....	58
Tabulka 17: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 10.....	58

Tabulka 18: Délky zón HMS standardních roztoků kalibrační řady .....	59
Tabulka 19: Délky zón HMS vzorků .....	59
Tabulka 20: Výsledný obsah volného SO <sub>2</sub> ve vzorcích stanovený izotachforeticky z obou izotachforetických měření.....	59

## Úvod

Oxid siřičitý a jemu příbuzné siřičitany jsou látky, které v potravinářství mají dlouhou historii. Siřičitany jsou míněny soli kyseliny siřičité. V potravinářství jsou nejvýznamnější soli vápenaté, draselné a sodné. Se siřičitany se můžeme v dnešní době setkat v mnoha potravinách a nápojích. Mají velmi dobré konzervační i antioxidační vlastnosti. Patří mezi potravinářská aditiva a řadí se do kategorie konzervantů. Jsou značeny jako E 220 – E 228. Nevýhodou však jsou jejich účinky na lidský organismus, hlavně u dětí a lidí více citlivých. Siřičitany a oxid siřičitý jsou zařazeny mezi 14 látek nebo produktů vyvolávajících alergie nebo nesnášenlivost. Z tohoto důvodu je snaha hledat alternativy, nejlépe přírodního původu.

Jako pomocník při výrobě vína je oxid siřičitý znám již od starověku. V současnosti se ve vinařském procesu siřičitany stále ve velké míře používají. Kromě toho, že mají konzervační a antioxidační účinky mohou také pomáhat při čiření vína. Pomocí své antimikrobiální činnosti umožňují řídit kvašení. Žádná ze známých alternativ zatím nedokáže siřičitany ve víně plně nahradit.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Víno

Víno je již od starověku velmi oblíbeným nápojem. V dnešní době můžeme vybírat z mnoha různých druhů a typů vín. Ke klasickým bílým a červeným vínům se řadí také stále oblíbenější vína růžová. V posledních letech se začínají více objevovat i tzv. biovína, která jsou vyráběna ekologicky a neobsahují chemická rezidua.

### 1.1.1 Rozdělení vín

#### Podle barvy

Rozdělení dle barvy se řídí výslednou barvou vína nezávisle na barvě použitých hroznů. Vína se dělí na bílá, červená a růžová. Pro bílé víno mohou být použity hrozny zelené, žluté, růžové nebo červené. Červená vína se vyrábí pouze z modrých hroznů. Pro růžová vína se používají hrozny červené nebo modré [1].

#### Podle cukernatosti moštu

Cukernatost moštu se vyjadřuje ve stupních normalizovaného moštoměru ( $^{\circ}\text{NM}$ ), který označuje kolik kg cukru je obsaženo ve 100 litrech moštu. Víno s cukernatostí nejméně  $15^{\circ}\text{NM}$  se označuje jako Jakostní víno. Dále může být Jakostní víno s přívlastkem [1].

Jakostní vína s přívlastkem se dělí také podle cukernatosti:

- Kabinetní víno – nad  $19^{\circ}\text{NM}$
- Pozdní sběr – nad  $21^{\circ}\text{NM}$
- Výběr z hroznů – nad  $24^{\circ}\text{NM}$
- Výběr z bobulí – nad  $27^{\circ}\text{NM}$
- Ledové víno – nad  $27^{\circ}\text{NM}$
- Slámové víno – nad  $27^{\circ}\text{NM}$
- Výběr z cibéb – nad  $32^{\circ}\text{NM}$

#### Podle obsahu zbytkového cukru

Obsah zbytkové cukru ve víně je ovlivněn tím, kdy je kvašení ukončeno a kvasinky přestanou přeměňovat cukry na alkohol. Mohou tak vznikat vína suchá s obsahem zbytkového cukru nejvýše 4 g/l, polosuchá s obsahem do 12 g/l, polosladká s obsahem do 45 g/l a sladká s obsahem nejméně 45 g/l zbytkového cukru [2].

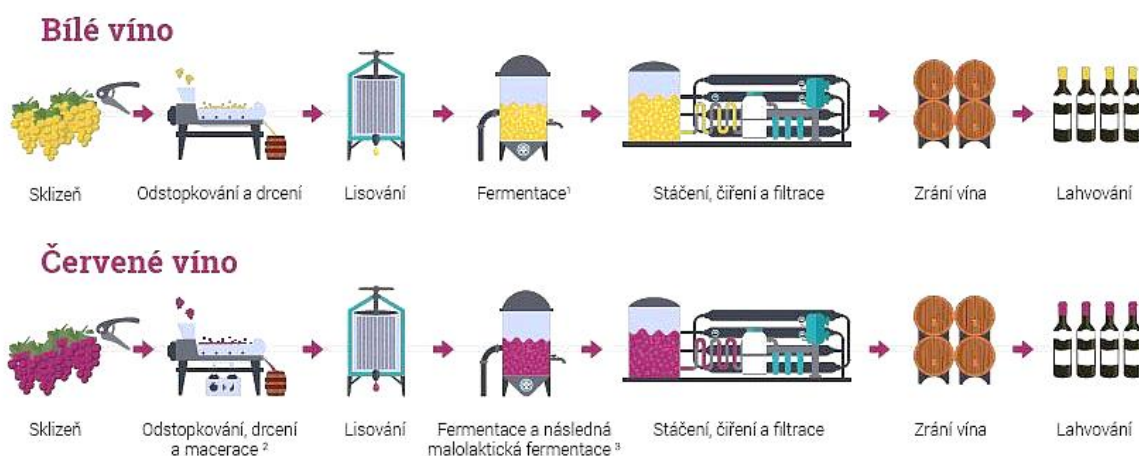
## Ostatní dělení

Dále můžeme rozlišit vína podle technologie výroby na šumivá a perlivá. Tyto dvě kategorie se od sebe liší tím, že šumivé víno získává oxid uhličitý činností kvasinek při sekundárním kvašení, ale perlivé víno je oxidem uhličitým pouze dosyceno uměle [1].

Jakostní vína musí být vyrobena z hroznů vypěstovaných v České republice. Jsou rozdělena na Jakostní víno známkové, které může být vyrobeno ze směsi hroznů nebo kombinací hotových jakostních vín, a Jakostní víno odrůdové, které může být vyrobeno maximálně ze 3 odrůd hroznů [2].

### 1.1.2 Výroba vína

Výroba bílého a červeného vína se v určitých krocích liší. Je tedy důležité při výrobě vína dodržet správný postup, který je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma výroby bílého a červeného vína [3]

### Sklizeň

Sklizeň v našich klimatických podmínkách probíhá od konce září do počátku října, kdy jsou hrozny v plné technologické zralosti. V případě špatného nebo naopak dobrého počasí v létě je možné, že se doba sklizně může lišit. Pokud by sklizeň proběhla dříve, než by hrozny stihly dozrát, bylo by výsledné víno kyselé s nepříjemnou chutí. Pozdnější sklizeň se provádí u hroznů, ze kterých se budou vyrábět vína přívlastková s vyšší cukernatostí. Hrozny se sbírají ručně nebo se využívají speciální techniky tzv. sklízeče. Po sběru je nutné co nejrychleji dostat hrozny z vinice do výroby, aby nedošlo ke kontaminaci nebo oxidaci [1].

## **Výroba moštu**

Nejprve je nutné hrozny namlít a ve většině případu je také zbavit třapin. Provádí se odstopkování a drcení hroznů na odzrňovačích nebo mlýnkoodzrňovačích. Takto nadrcené hrozny se nazývají rmut [4].

Pokud se vyrábí víno červené, provádí se nakvašování rmutu po dobu 4–14 dnů, podle žádaného zbarvení. Bílá vína se nakvašují pouze v případě aromatických odrůd a nakvašování probíhá pouze po dobu několika hodin. Nakvašování se provádí při teplotě 20–25 °C [1].

Po ukončení procesu nakvašování následuje lisování. K lisování se využívají lisy různých typů. V lisu se oddělí mošt od tuhých zbytků hroznů. Čím vyšší tlak se při lisování používá, tím větší je šance, že se mošt znečistí. Oddělené matoliny se mohou vylisovat i podruhé nebo potřetí, aby byla zvýšená výtěžnost [4].

## **Úprava moštu**

Pokud jsou v některých letech nepříznivé podmínky je možné mošt doslazovat nebo ho zahustit, např. vymrazováním nebo reverzní osmózou. U bílých vín by se mělo doslazovat nejvýše na hodnotu 21 °NM a u červených vín nejvýše na 22 °NM [4].

Odkalování slouží pro zbavení různých nečistot, které jsou stále v moštu přítomny jako např. rezidua pesticidů, zbytky pevných částí po lisování nebo škůdci z vinice. Provádí se sedimentací, která je podpořena zasířením a případně chlazením, které je však energeticky náročné. V průběhu odkalování nesmí dojít k rozkvašení. Další možnosti odkalení jsou odstředění nebo filtrace přes křemelinové filtry [4].

Může také nastat situace, kdy bude v moštu příliš velké nebo naopak malé množství kyselin. Okyselování se může provádět přidávkem maximálně 2 g/l kyseliny vinné. Odkyselování se provádí u moštů s nízkým obsahem cukru v nepříznivých ročnících a pouze pokud nelze kyselost snížit malolaktickým kvašením. Může se provést tzv. scelování, což je smíchání kyselého moštu s moštem sladším. Odkyselovat se může také přidávkem uhličitanu vápenatého, který na sebe naváže kyselinu vinnou [1].

## **Kvašení**

V moštu může docházet ke spontánnímu kvašení vlivem kvasinek, které jsou přítomny na hroznech. Pro řízené kvašení je nutné do moštu dodat vinařské kvasinky. K tomuto účelu se používají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ve vysušené aktivní formě nebo ve formě suspenze. Na začátku kvašení dochází k rozmnožování kvasinek a pozvolné fermentaci cukrů na ethanol a oxid uhličitý. Tato fáze trvá 2–3 dny. Potom nastává fáze bouřlivého kvašení, které trvá několik dní v závislosti na teplotě. Pokud se kvasí při nízkých teplotách, je doba kvašení

delší. V této fázi dochází k nárůstům teplot až nad 25 °C a musí se provádět chlazení na teploty okolo 15 °C, jinak by mohlo dojít k unikání těkavých aromatických látek. Po snížení obsahu cukru na 2–5 g/l nebo při požadované hodnotě alkoholu se přechází do fáze dokvašování, kdy kvasinky pomalu přestávají přeměňovat cukry na ethanol a oxid uhličitý a sedimentují ke dnu. Tato fáze může trvat až půl roku [1].

### **Formování vína**

Ve víně při dokvašení dochází k biologickým a fyzikálně-chemickým změnám. Dochází k vysrážení vinného kamene ve formě hydrogenvinanu draselného. Dále se sráží bílkoviny, slizy nebo polyfenoly a dochází k samočištění vína [1].

Dochází také k odbourávání kyselin pomocí jablečno-mléčného kvašení (malolaktická fermentace). V tomto procesu se přeměňuje kyselina jablečná na kyselinu mléčnou činností bakterií mléčného kvašení. Výsledkem je víno, které má jemnější chuť, sníženou celkovou kyselost a je více stabilní. Ve vínech s vyšším obsahem alkoholu tento proces probíhá hůře. Při obsahu alkoholu v rozmezí 12–15 obj. % dochází k úplnému zastavení činnosti těchto bakterií. Inhibičně působí také oxid siřičitý a nízká teplota. Pokud malolaktické kvašení není žádoucí je tedy možné ho zastavit silným zasířením a snížením teploty. Neprovádí se ve vínech s nízkým obsahem kyselin nebo ve vínech, kterým vyšší obsah kyseliny mléčné spíše v chuti škodí, např. Tramín nebo Ryzlink rýnský [4].

Pokud je víno již dokvašené, probíhá stáčení do čistých zasířených kvasných tanků. Stáčením se víno oddělí od všech sedimentů a kvasinek. Při prvním stáčení se může provést provzdušnění, aby došlo k dalšímu vysrážení zbylých kalů a po několika týdnech se provede stáčení druhé. V průběhu ležení v tancích je potřeba sudy dolévat vínem, aby byly plné a nepřicházely do styku se vzduchem [1].

### **Školení**

Provádí se před plněním do lahví a zahrnuje několik operací. První je čiření vína. K čiření se mohou používat různé látky jako např. želatina nebo kasein, které se vysráží s přítomnými tříslovinami. Dále se může použít bentonit, který je vhodný k odstranění bílkovin a dalších kalů z bílého vína, protože v červených vínech by částečně odstranil i barvu. Kasein přidaný do vína odstraňuje třísloviny a nepříjemné pachy. Dalšími látkami, které podporují čiření jsou kaolin, kyselina křemičitá nebo tanin [4].

Další operací je stabilizace a filtrace vína. Pro stabilizování se používá proces pasterace, ošetření oxidem siřičitým nebo kyselinou sorbovou. Pasterace je krátkodobé zahřátí na teplotu



60–70 °C a následné rychlé ochlazení. Filtrace se provádí na deskových nebo naplavovacích filtrech s křemelinou [1].

## **Lahvování**

Před plněním do lahví se ještě mohou provést konečné úpravy vína. Víno se může odkyselovat nebo okyselovat, osvěžovat oxidem uhličitým nebo u speciálních vín se může provést alkoholizace. Plnění vína se provádí nejčastěji do skleněných lahví o objemu 0,7 l, menší podíl se plní do lahví o objemu 0,5 l nebo do litrových lahví. Vína nižší jakosti se mohou plnit do papírových Tetra-pak obalů nebo do plastových lahví. K uzavření lahví se používají zátky z korku nebo plastu a v poslední době se čím dál více používají šroubovací uzávěry [1].

### **1.1.3 Síření vína**

Síření se využívá v celém vinařském výrobním procesu. Účinky síření jsou velmi rozsáhlé. Siřičitany působí proti mikrobiální kontaminaci a enzymatickému hnědnutí, mají konzervační a čířící účinky a regulují proces kvašení.

Síření vína se může provádět hned od počátku po rozemletí hroznů, aby se zabránilo oxidaci. Další přídavek siřidla je při odkalování, kdy se používá 100–150 mg/l SO<sub>2</sub> podle toho, v jakém stavu byly hrozny. Před kvašením se provádí síření, aby byly potlačeny divoké kvasinky přítomné na hroznech a mohla probíhat řízená fermentace pomocí vinařských kvasinek. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou proti siřičitanům více odolné a k jejich inhibici je potřeba větší množství. Jsou vyvinuty i kmeny kvasinek, které vydrží až 2000 mg/l SO<sub>2</sub>. Dále se síření využívá, pokud je při výrobě sladších vín potřeba ukončit fermentaci dříve nebo je nutné se vyhnout malolaktickému kvašení [5].

Siřičitany se mohou aplikovat v různých formách, např. sirné knoty (plátky), pevný disiřičitan draselný nebo kapalný oxid siřičitý. Sirné knoty mohou být kapavé nebo nekapavé. Používají se k ošetřování sudů, vína při stáčení nebo celých prostorů. Sirné knoty se zapálí, zavěsí do sudu a sud se uzavře zátkou. Spalováním se z 1 g síry uvolňují 2 g plynného oxidu siřičitého. Dávkování pomocí plátků není moc přesné. Přesnější je ošetření disiřičitanem draselným, kterého se naváží požadované množství, rozpustí se v malém objemu vína, a poté se přimíchá do zbytku vína. Disiřičitan draselný je nutné skladovat bez přístupu vzduchu nebo vlhkosti. Nejpřesnější a nejpohodlnější je síření kapalným oxidem siřičitým, který se prodává v tlakových lahvích různé velikosti, které jsou opatřeny dávkovačem [4,6].

## 1.2 Siřičitany

Mezi siřičitany se řadí celá skupina látek. Nejznámější jsou siřičitany sodné, draselné a vápenaté. Mohou se vyskytovat ve formě siřičitanu, disiřičitanu nebo hydrogensiřičitanu.

### 1.2.1 Siřičitany z chemického hlediska

Siřičitany mají ve své molekule obsažený siřičitanový anion  $SO_3^{2-}$  a příslušný kation. Podle vázaného kationtu se tvoří sloučeniny, které mají své specifické vlastnosti. Siřičitany jsou většinou krystalické pevné látky. Některé mohou zapáchat po oxidu siřičitém nebo síře.

#### 1.2.1.1 Oxid siřičitý

Oxid siřičitý ( $SO_2$ ) je bezbarvý, nehořlavý a jedovatý plyn. Při  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  a běžném tlaku kondenzuje na bezbarvou kapalinu. Intenzivně zapáchá, má kyselou chuť a způsobuje dýchací potíže, protože dráždí dýchací cesty. Při vystavení vysokým koncentracím oxidu siřičitého může docházet k bolestem na hrudi, zúžení dýchacích cest, vyrážkám a rozmazanému vidění. Při dlouhodobé expozici může docházet k chronickému otoku dýchacích cest, ztrátě čichu a chuti nebo chronickému kašli. Je to látka, která je dobře rozpustná ve vodě [7,8].

Reakcí oxidu siřičitého s vodou dochází ke vzniku kyseliny siřičité:



Tato reakce zjednodušeně popisuje přítomnost kyselých dešťů. Do ovzduší se oxid siřičitý dostává hlavně z hutí a elektráren a částečně také ze sopečných plynů. Dále může ve vzduchu reagovat s jinými sloučeninami a vytvářet jemné částičky, které vedou k snížení viditelnosti [8,9].

Oxid siřičitý vzniká spalováním síry za vzniku modrého plamene:



V průmyslu se používá při výrobě kyseliny siřičité a následně kyseliny sírové. Dále je využíván v potravinářství, papírenství nebo pro čištění odpadních vod [8,9].

#### 1.2.1.2 Siřičitany

Siřičitany jsou soli kyseliny siřičité, která vzniká rozpouštěním oxidu siřičitého ve vodě. Kyselina siřičitá ( $H_2SO_3$ ) je bezbarvá kapalina s výrazným zápachem po oxidu siřičitém. Může tvořit soli s různými prvky, jak siřičitany, tak i hydrogensiřičitany. Pro potravinářství jsou nejvýznamnější soli se třemi prvky, kterými jsou sodík, draslík a vápník [9].

##### Siřičitan sodný – $Na_2SO_3$

Siřičitan sodný je pevná látka bílé barvy ve formě prášku nebo jemných krystalků bez zápachu. Vyrábí se pomocí hydroxidu sodného, který protéká přes síto, kde je zachycen oxid

siřičitý. Má dobré bělicí účinky a v potravinářství se využívá jako konzervační látka například pro maso [10].

#### **Disiřičitan sodný – Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**

Disiřičitan sodný je krystalická nebo prášková pevná látka. Po styku s vodou začne zapáchat po oxidu siřičitém. Vyrábí se tak, že hydroxid sodný společně s plyny, které obsahují oxid siřičitý, se zavádí do nasyceného roztoku hydrogensiřičitanu sodného. Používá se jako antioxidant nebo jako redukční činidlo v kosmetickém průmyslu [10].

#### **Hydrogensiřičitan sodný – NaHSO<sub>3</sub>**

Hydrogensiřičitan sodný je bílá krystalická látka lehce zapáchající po síře. Vyrábí se reakcí hydroxidu sodného s oxidem siřičitým a vzniklý roztok musí mít hodnotu pH 3,5–4. Uplatňuje se jako bělidlo a konzervační prostředek v různých odvětvích [10].

#### **Siřičitan vápenatý – CaSO<sub>3</sub>**

Siřičitan vápenatý je bílá krystalická látka. Vyrábí se mísením vápenatých solí s alkalickými siřičitany. Používá se jako bělidlo na textilie a papír a v potravinářství jako konzervační látka [11].

#### **Hydrogensiřičitan vápenatý – Ca(HSO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**

Hydrogensiřičitan vápenatý je sloučenina, která se vyskytuje ve formě bezbarvého roztoku se silným zápachem oxidu siřičitého. Vyrábí se rozpouštěním siřičitanu vápenatého ve vodném roztoku oxidu siřičitého. Používá se při výrobě celulózy a v potravinářství jako konzervant [11].

#### **Siřičitan draselný – K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>**

Siřičitan draselný je bílý krystalický prášek. Vyrábí se probubláváním hydroxidu draselného oxidem siřičitým až do změny barvy indikátoru fenolftalein. Je součástí fotografických vývojek, v potravinářství se používá jako konzervant a antioxidant a využití má také v kosmetickém průmyslu [11].

#### **Disiřičitan draselný – K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**

Disiřičitan draselný je pevná látka v práškové nebo granulované formě, s velmi výrazným zápachem po oxidu siřičitém. Vyrábí se obdobně jako disiřičitan sodný s tím rozdílem, že se používají draselné sloučeniny. Používá se do fotografických vývojek a jako antioxidant nebo konzervant v potravinářství [10].

## Hydrogensířičitan draselný – $\text{KHSO}_3$

Hydrogensířičitan draselný je bílá krystalická látka se zápachem po oxidu siřičitém. Vyrábí se promýváním oxidu siřičitého hydroxidem draselným. Používá se jako bělidlo textilií a v potravinářství jako konzervační látka [11].

### 1.2.2 Sířičitany v potravinářství

Ve většině potravin a nápojů se vyskytují přídatné látky tzv. aditiva. Tyto aditiva se dělí do mnoha kategorií podle účelu použití. Každé aditivum nese své kódové označení písmenem E a příslušným trojčíslím, případně čtyřčíslím. Jsou to převážně látky průmyslově vyráběné, avšak některé z nich jsou syntetizovány na základě přirozeně se vyskytujících chemických sloučenin v přírodních zdrojích tzv. přírodně identická aditiva. Jako příklad lze uvést E 330, což je kyselina citrónová, na kterou můžeme narazit v citrusových plodech. Dále se samozřejmě také vyskytují aditiva přírodní. Patří sem například E 901, které označuje včelí vosk nebo E 406 čili agar. Z toho vyplývá, že ne všechna aditiva jsou škodlivá pro naše zdraví [12,13].

Sířičitany můžeme nalézt v široké škále potravin a nápojů. Řadí se do kategorie konzervantů a současně je můžeme nalézt také v kategorii antioxidantů. Oxid siřičitý a sířičitany jsou dle NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1169/2011 řazeny mezi látky nebo produkty vyvolávající alergie nebo nesnášenlivost. Jako sířičitany jsou označovány E 220 – E 228 (Tabulka 1), ale E 225 (sířičitan draselný) není jako aditivum povolen v České republice ani v celé Evropské unii. Celá tato skupina bývá někdy označována pouze jako oxid siřičitý, ale kromě oxidu siřičitého jsou zde i soli kyseliny siřičité. Důvodem pro takto velikou skupinu příbuzných látek je ten, že každá z nich má mírně odlišné vlastnosti. E 220 se používá například na ovoce, které je fumigováno, což je ochrana plyny před škůdci při skladování nebo v procesu zpracování. E 226 je relativně nerozpustný ve vodě. E 223 je používán jako bělicí činidlo a společně s E 224 jsou velmi stabilní i při větší manipulaci ve výrobě [13,14].

Tabulka 1: Seznam sířičitanů [13]

E kód	Název	Využití
E 220	Oxid siřičitý	Konzervant, antioxidant
E 221	Sířičitan sodný	Konzervant, antioxidant
E 222	Hydrogensířičitan sodný	Konzervant
E 223	Disířičitan sodný	Konzervant, antioxidant
E 224	Disířičitan draselný	Konzervant, antioxidant
E 226	Sířičitan vápenatý	Konzervant
E 227	Hydrogensířičitan vápenatý	Konzervant
E 228	Hydrogensířičitan draselný	Konzervant, antioxidant

### 1.2.2.1 Siřičitany jako konzervanty

Konzervanty slouží k prodloužení trvanlivosti výrobků. Působí proti růstu mikroorganismů a nežádoucím chemickým reakcím, které degradují potraviny a činí je tak nepoživatelnými až škodlivými. Nejznámějšími a zároveň nejstaršími konzervanty jsou ocet a kuchyňská sůl. V dnešní době je však již mnoho dalších konzervantů, které jsou vyrobeny uměle, a ne všechny se považují za zcela neškodné. Hojně používané jsou např. kyselina sorbová (E 200) a její soli (sorbany), které velmi účinně působí proti růstu velkého množství různých druhů kvasinek a plísní. Časté jsou také dusitan draselný (E 249) a dusitan sodný (E 250). Dusitany nachází uplatnění v masných výrobcích, kde působí proti bakteriím *Clostridium botulinum*. Zabraňují tak vzniku toxického botulinu, který tyto bakterie produkují [12,13].

Používání siřičitanů jako konzervantů je zaznamenáváno již od dob starověkého Říma. Mají širokou škálu využití. Všechny siřičitany dobře působí proti enzymatickému i neenzymatickému hnědnutí a mají antimikrobní účinky. Siřičitany mohou pronikat do buněk kvasinek pasivním a případně i aktivním transportem. Jsou silně nukleofilní a díky tomu jsou schopny štěpit disulfidické vazby v bílkovinách. Oxid siřičitý (E 220) je efektivní nejvíce v kyselých potravinách. Siřičitany se využívají například při výrobě sušeného ovoce pro zachování barvy, přidávají se do některých nápojů jako ochrana před mikroorganismy nebo se využívají v procesu zpracování ovoce a zeleniny pro zabránění enzymatického hnědnutí po oloupaní nebo porušení slupky [14,15].

### 1.2.2.2 Siřičitany jako antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které zamezují oxidaci způsobené reakcí potravin se vzdušným kyslíkem, tím umožňují prodloužit dobu uchovávání těchto potravin. Oxidace se u potravin projevuje barevnou nebo chuťovou změnou a žluknutím v případě tuků [12,13].

Dále mají antioxidanty funkci ochrannou pro lidský organismus. Chrání před volnými radikály, které se tvoří v těle z oxidačních procesů a také z kyslíku, který vdechujeme. Volné radikály jsou atomy kyslíku, které mají pouze jeden elektron a v těle na sebe váží druhý chybějící elektron. Chovají se velmi útočně a způsobují narušení buněčných stěn, struktury buňky a její DNA a v některých případech mohou vyvolat i nádorová onemocnění [13].

Přírodní antioxidanty mají funkci převážně jako prevence proti tvorbě volných radikálů v těle, a tím i zpomalování nástupu různých nemocí jako je například rakovina, malárie, ateroskleróza nebo mozková dysfunkce. Mezi přírodní antioxidanty patří z největší části

rostlinné fenolické sloučeniny. Dále tuto funkci mohou plnit také některé karotenoidy nebo fosfolipidy [16].

Syntetické antioxidanty mají největší uplatnění jako inhibitory oxidace tuků (žluknutí) a jako redukční látky, které odstraňují kyslík a další kyslíkaté sloučeniny a zabraňují tak reakci volných radikálů. Mezi syntetické antioxidanty se řadí např. kyselina askorbová (E 300) a její soli, dusitan sodný (E 250), oxid siřičitý (E 220) a jeho soli [16].

Siřičitany se využívají jako antioxidanty například k prodloužení životnosti dehydratované zeleniny a ovoce nebo masa, zvyšují stabilitu přirozených barviv v potravinách a také zvyšují stabilitu vitamínu A a C, ale naopak rozkládají vitamín B<sub>1</sub> [14].

### **1.2.2.3 Míra škodlivosti siřičitanů**

Aditiva v dnešní době nemají žádné řazení do skupin dle škodlivosti. Existují pouze aditiva povolená nebo aditiva zakázaná. V některých knihách nebo na webových stránkách se ale můžeme setkat s hodnocením škodlivosti aditiv a jejich zařazením do příslušných skupin. Tyto skupiny jsou však utvořeny pouze subjektivně dle autora příp. autorů.

Podle autorů knihy „Éčka v potravinách“ se aditiva dělí do tří skupin dle intenzity vlivu na lidské zdraví. První skupinou jsou látky nezpůsobující zdravotní problémy. Jsou to většinou aditiva přírodního původu nebo aditiva přírodně identická, která jsou vyrobena synteticky ale chemickou strukturou se nijak neliší od těch ryze přírodních. Tyto látky tedy nijak neškodí lidskému organismu a v některých případech mohou být i tělu prospěšné. Patří sem např. kurkumin (E 100), kyselina jablečná (E 296) nebo celulóza (E 460). Další skupinu představují látky méně vhodné, u nichž je jejich užívání sporné. Tyto aditiva mají špatné vlastnosti převážně pouze při jejich větší spotřebě, také mohou být problémové u citlivějších jedinců nebo u dětí. Řadí se sem např. sorbitol (E 953), karagenan (E 407) nebo chlorid draselný (E 508). Poslední skupinou jsou látky nevhodné. Zde jsou hlavně látky synteticky vyrobené, u kterých hrozí vznik přecitlivělosti a intolerance a také sem patří látky toxické. Do této skupiny se řadí veškeré siřičitany, dusitany nebo fosfáty [13].

Vít Syrový se své knize „Tajemství výrobců potravin“ aditiva rozděluje do pěti skupin podle dopadu na lidský organismus. Toto rozdělení je založeno na principu známkování ve škole. 1 je tedy nejlepší a 5 nejhorší. První skupinou jsou aditiva přírodního původu a aditiva přírodně identická. Jsou to látky, které působí na lidský organismus převážně příznivě a patří sem např. vitaminy nebo přírodní barviva. Druhou skupinu tvoří aditiva, která mohou být přírodního původu, ale už nejsou tělu tolik prospěšné jako aditiva z první skupiny. Dále do této skupiny patří látky, které mají chemickou strukturu pouze podobnou látkám přírodním.

Můžeme zde nalézt např. kyselinu octovou (E 260), agar (E 406) nebo citrát hořečnatý (E 345). Třetí skupina jsou aditiva, která jsou méně vhodná, ale v menším množství u zdravých dospělých osob nepůsobí žádné problémy. Problémy by mohly nastat v případě, že aditiva z této skupiny požije dítě nebo člověk se zvýšenou citlivostí a také, pokud jsou přijímána u zdravé osoby ve vysoké míře. Patří sem např. glycerol (E 422), kyselina citronová (E 330) a fumarát sodný (E 365). Čtvrtou skupinou jsou již aditiva nevhodná, která mohou našemu organismu uškodit. Jsou to hlavně látky vyrobené chemickou cestou, které nemají žádnou předlohu v podobě přírodních látek a jako příklad lze uvést Acesulfam K (E 950) nebo veškeré fosforečnany. Poslední, pátou, skupinou jsou aditiva, u kterých bychom se měli vyvarovat jejich požívání. Tyto látky mají struktury odvozené od struktur toxických chemikálií nebo jsou to přímo látky, které jsou pro konzumaci nevhodné a mohou ve větším množství způsobit i otravy. Řadí se sem např. Brillantní modř FCF (E 133), kyselina benzoová (E 210), tartrazin (E 102) a všechny siřičitany [12].

I přes to, že v obou případech jsou siřičitany zařazeny do nejvíce škodlivé kategorie, jsou siřičitany stále hojně využívány v potravinářství. Pro své účinky na lidský organismus jsou zařazeny do seznamu alergenních složek v potravinách. Někdy je možné se setkat s potravinou, kde jsou siřičitany použity pouze z estetického hlediska nebo z důvodu prodloužení trvanlivosti. Zde je výhodnější najít produkt, který sířen nebyl, zvláště pokud jde o potravinu, která bude podávána dětem. S takovými případy se můžeme setkat u sušeného ovoce, kdy například u sušených meruněk je rozdíl sířených a nesířených velmi dobře znatelný. Sířené meruňky mají výraznou oranžovou barvu, kdežto nesířené jsou hnědé. Dále jsou to různé müsli tyčinky nebo směsi. Tyto potraviny lze vyrábět i bez přídavku siřičitanů, poté se však musí více dbát na zajištění jiné ochrany proti mikrobiální kontaminaci. Siřičitany můžeme nalézt také u potravin zavařovaných nebo kysaných, kde není třeba užití konzervantů, jelikož samotný proces výroby těchto potravin slouží jako konzervace.

#### **1.2.2.4 Siřičitany jako alergeny**

Potravinové alergie se často nazývají alergiemi nesprávně, protože při alergické reakci je nutná účast imunoglobulinu E (IgE). Potravinové alergie jsou většinou vyvolány proteiny, které zvyšují citlivost a poté způsobí alergickou reakci u citlivých osob. Může se však objevit nežádoucí reakce na látku, která proteiny neobsahuje a takový případ by se již měl spíše nazývat zvýšenou citlivostí nebo přecitlivělostí [17,18].

Mechanismus alergické reakce na siřičitany dosud není zcela objasněn. Reakce je podmíněna několika faktory, jako jsou množství a forma siřičitanů v potravinách, druh potraviny a citlivost daného jedince [17].

Siřičitanová alergie se řadí mezi reakce, které nejsou způsobeny proteiny. Vzhledem k tomu, že oxid siřičitý je dráždivý plyn, se většina alergických reakcí projevuje podobně jako astma. Někdy může dojít i k pravé alergické reakci za účasti IgE, která se projevuje na kůži. Hlavními příznaky alergické reakce na siřičitany jsou dýchací potíže, neschopnost mluvení nebo polykání a sípot. Méně časté příznaky, podobné anafylaktickému šoku, jsou zrychlený tep, závratě, zrudnutí, nevolnost a průjem [18].

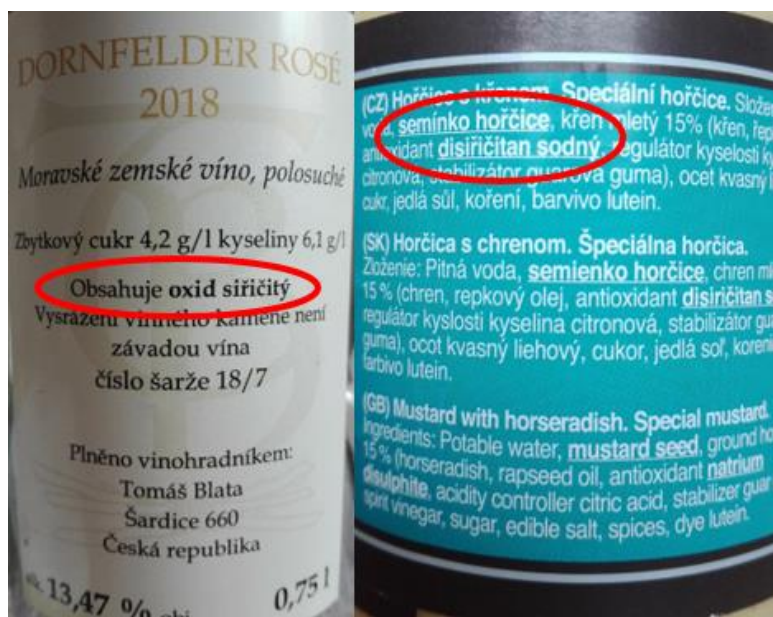
Účinky siřičitanů na některé astmatiky se začaly vyskytovat v polovině 70. let, kdy se příznaky alergie, jako kopřivka a sípání, léčily epinefrinem. Ten ale nezabíral na některé těžší formy alergie a docházelo tak ke ztrátám vědomí nebo anafylaktickým šokům. Z tohoto důvodu se začaly více zkoumat účinky siřičitanů na lidský organismus. V roce 1985 Federace amerických společností pro experimentální biologii (FASEB) došla k závěru, že pro většinu populace sice siřičitany nepředstavují závažné riziko, ale toto riziko je výrazně zvýšené u lidí trpících astmatem nebo u lidí citlivých na siřičitany [17].

V NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1169/2011 je uveden seznam látek nebo produktů vyvolávajících alergie nebo nesnášenlivost. Siřičitany jsou v seznamu pod číslem 12 a jsou definovány následovně: *„Oxid siřičitý a siřičitany v koncentracích vyšších než 10 mg/kg nebo 10 mg/l, vyjádřeno jako celkový SO<sub>2</sub>, které se propočítají pro výrobky určené k přímé spotřebě nebo ke spotřebě po rekonstituování podle pokynů výrobce“*.

Všechny tyto potravinové alergeny je nutno uvádět na obale potravin v seznamu složek a musí být od ostatního textu viditelně odlišeny např. tučným písmem, barvou pozadí, barvou písma nebo podtržením. V případě, že seznam složek na obale není, se tyto látky píšou samostatně ve spojení se slovem „obsahuje“ [19].



Na obrázku 2 je vlevo ukázka případu, kdy není uveden seznam složek. Vpravo je ukázka zvýraznění textu v seznamu složek.



Obrázek 2: Značení alergenů na obalech potravin

### 1.2.3 Náhrady siřičitanů

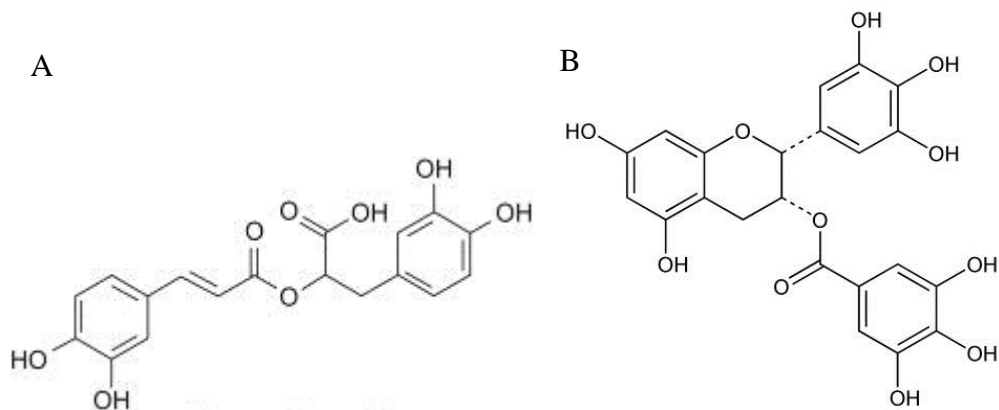
Siřičitany jsou přidávány do velkého množství potravin a nápojů a je snaha o redukci jejich používání. Vymýšlí se tedy různé alternativy a nové způsoby výroby bez použití siřičitanů. Velké procento těchto náhrad se zaměřuje především na omezení používání siřičitanů ve vinařství. Siřičitany lze nahradit např. polyfenoly, kyselinou askorbovou, lysozymem nebo využitím fyzikálních metod.

#### 1.2.3.1 Polyfenoly

Polyfenolické sloučeniny mají chelatační účinky na volné radikály a působí tedy jako antioxidanty. Dále jsou schopny působit antimikrobiálně. Patří sem také skupina anthokyanů, které jsou označovány jako E 163 a jsou to přírodní barviva. Přirozeně se vyskytují v přírodních zdrojích např. ve formě flavonoidů, fenolických kyselin nebo taninů. Nejsou však dostupné informace o možnostech použití v potravinách z hlediska toxicity nebo různých interakcí pro veškeré polyfenolické sloučeniny [20].

Antimikrobiální účinek souvisí s počtem a umístěním hydroxylových skupin na benzenovém kruhu (viz Obrázek 3). Hydroxylové skupiny poškozují strukturu bílkovin a lipidů v buněčných membránách bakterií a navazují aktivní místa enzymů. Buňka má poté narušený metabolismus a zpomaluje se její růst. Antimikrobiální účinek polyfenolových extraktů z rostlin je značně závislý na přítomnosti kyslíku, pH, teplotě a době skladování potravin. Polyfenoly můžeme najít ve velkém množství rostlin. Ve višních je obsažena kyselina

hydroxyskořicová a anthokyaniny, v rozmarýnu kyselina rozmarýnová (Obrázek 3A), v čajových listech epigalokatechin galát (Obrázek 3B) a tyto látky působí proti množení rodu *Salmonella* nebo *Listeria*. V brusinkách nebo černém rybízu jsou proanthokyanidiny, které působí např. proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* [20].

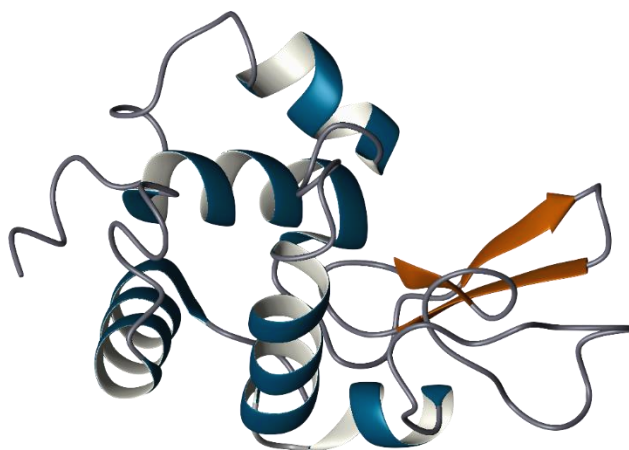


Obrázek 3: Chemická struktura kyseliny rozmarýnové (A) a epigalokatechin galátu (B)

Jako antioxidační činidla mohou sloužit fenolické kyseliny a flavonoidy. Působí redukčně, zachycují volné radikály a mají chelatační účinky. Velmi dobře účinkují v kombinaci s ostatními antioxidy a nijak neruší jejich účinek. Extrakty ze zeleného čaje (katechiny) působí velmi dobře proti oxidaci lipidů. Katechiny jsou stabilní v kyselém prostředí (pod pH 4). Nemohou být vystavovány vysokým teplotám, proto je nutné je přidávat do potravin až na konci výrobního procesu a v případě potřeby také upravit pH. Kromě zeleného čaje se katechiny vyskytují také v kakau nebo červeném vínu. Mezi polyfenolické antioxidy se řadí i běžně používaný a legislativou schválený extrakt z rozmarýnu (E 392). Tento extrakt má tu výhodu, že je stabilní až do 200 °C [20].

### 1.2.3.2 Lysozym

Lysozym (viz Obrázek 4) je enzym, který můžeme nalézt hlavně ve vaječných bílcích, ze kterých je nejčastěji izolován. Může se vyskytovat také v mléce savců, některých rybách nebo v slzách. Je využíván jako konzervační činidlo pro mořské plody, zeleninu nebo ovoce. Zabraňuje tvorbě plynu v sýrech, u kterých je tento děj nežádoucí. V seznamu přídatných látek ho nalezneme pod kódem E 1105. V posledních letech jsou sledovány účinky lysozymu ve víně jako případná vhodná alternativa siřičitanů [21,22].



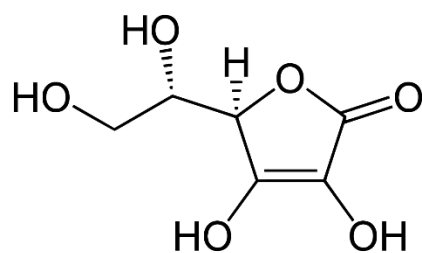
Obrázek 4: Struktura lysozymu [23]

Lysozym hydrolyzuje 1,4-glykosidickou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem, které jsou přítomné v peptidoglykanu buněčných stěn bakterií, a tím je zabíjí. Působí hlavně proti grampozitivním bakteriím, protože mají lépe přístupnou peptidoglykanovou část. Gramnegativní bakterie mají oproti grampozitivním méně peptidoglykanu, a navíc mají tuto část krytou vnější membránou z lipopolysacharidů, fosfolipidů a proteinů [22].

Přídavkem lysozymu do vína je možno upravovat nástup malolaktického kvašení, protože lysozym tento děj zastavuje nebo oddaluje. Jako náhrada siřičitanů by mohl být využíván díky své účinnosti proti nežádoucímu růstu bakterií mléčného kvašení a efektivní mikrobiologické stabilizaci po malolaktickém kvašení. Nevýhodou však je interakce lysozymu s polyfenoly v červeném víně, tím způsobený pokles účinku a také vyblednutí červeného vína a tvorba sraženin v něm. Lysozym není tepelně stabilní a tvoří zákal při vyšších teplotách. Jeho aktivita vzrůstá spolu se vzrůstající hodnotou pH, což neplatí v případě siřičitanů. Lysozym není účinný proti kvasinkám ani proti bakteriím octového kvašení (G- bakterie) a nemá antioxidační účinky. Z těchto důvodů nelze lysozym samostatně využívat jako náhradu za siřičitany ale je možné používat tyto dvě látky současně a alespoň snížit obsah siřičitanů ve víně [21].

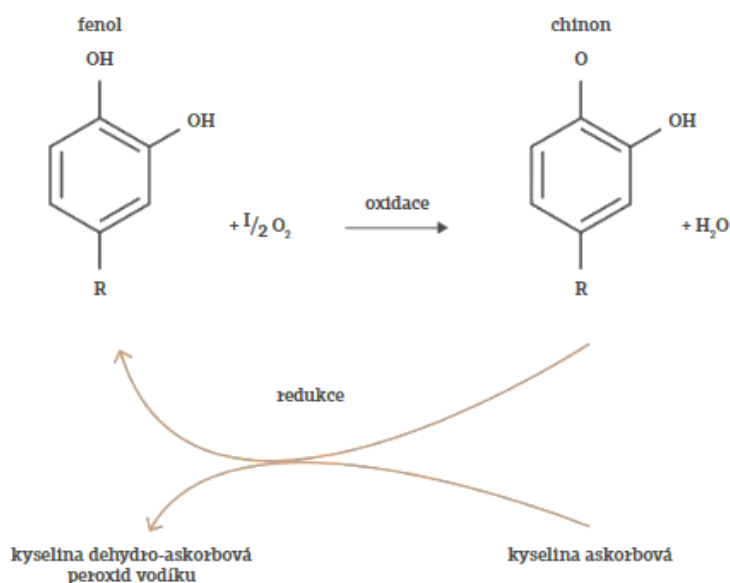
### 1.2.3.3 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová (E 300), známá také jako vitamin C, je nejvíce sledovanou látkou v případě alternativ siřičitanů. Chemická struktura je znázorněna na obrázku 5. Zabraňuje enzymatickému hnědnutí a působí jako rychlý antioxidant. Samostatně není schopná nahradit siřičitany, ale ve vínech může působit společně s nimi a v čerstvém ovoci nebo zelenině v kombinaci s jinými látkami [24,25].



Obrázek 5: Chemická struktura kyseliny askorbové

V ovoci a zelenině dochází k hnědnutí díky reakcím chinonů, které vznikají z fenolických látek činností polyfenoloxidázy. Kyselina askorbová redukuje chinony zpět na fenolické látky, jak je vyobrazeno na obrázku 6, a brání tak hnědnutí potravin. Časem se oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou a peroxid vodíku. Není možné jí tedy využít pro dlouhodobější účinek. Ve směsi s kyselinou citrónovou dokáže prodloužit trvanlivost loupáných brambor až na 2 týdny. Je možné také použít její izomer, kyselinu erythorbovou [24].



Obrázek 6: Schéma působení kyseliny askorbové v potravinách [26]

Použití ve víně je možné pouze se siřičitany. Kyselina askorbová se ve víně může chovat jako antioxidant, pokud je ve správném poměru s přidanými siřičitany. Pokud by byla hladina siřičitanů nízká, mohlo by docházet k opačnému nežádoucímu procesu oxidace vznikajícím peroxidem vodíku. Působí velmi rychle a po kratší dobu než siřičitany. Tento účinek je vhodné využít při zpracování hroznů nebo před lahvováním, kdy jsou víno nebo mošt nejvíce vystaveny vzdušnému kyslíku [25,27].

#### 1.2.3.4 Koloidní stříbro

Komplex koloidního stříbra (CSC) by mohl být vhodnou alternativou pro siřičitany používané ve vinařství. Oba způsoby, siřičitany i CSC, vykazují velmi podobné výsledky. Přídavek 1 g CSC do 1 kg moštu odpovídá účinku zhruba 50 mg siřičitanů na 1 kg moštu. CSC je v práškové formě s částicemi menšími než 10  $\mu\text{m}$ . Je složen z inertního anorganického nosiče a nanočástic stříbra, které jsou na povrchu tohoto nosiče. Je nerozpustný ve vodě a v ethanolu [21].

CSC má antimikrobiální účinky a účinně působí proti bakteriím mléčného a octového kvašení. Vína s použitím CSC obsahují o něco méně ethanolu a acetaldehydu než vína se siřičitany, i přes to, že jsou veškeré cukry zfermentovány. To značí, že CSC ovlivňuje metabolismus kvasinek a s tím spojenou produkci ethanolu. Při dlouhodobějším sledování bylo zjištěno, že obsah těkavých kyselin ve víně se při skladování nezvyšuje. Menší problém nastává při kontrole barvy výsledného vína. CSC nemá antioxidační vlastnosti a v bílých vínech nedokáže zabránit hnědnutí, takže tato vína mají nahnědlou barvu. Z tohoto důvodu by bylo vhodné zkombinovat CSC s vhodným antioxidantem, např. kyselinou askorbovou [21,28].

#### 1.2.3.5 $\text{C}_6$ , $\text{C}_8$ a $\text{C}_{10}$ nasycené mastné kyseliny

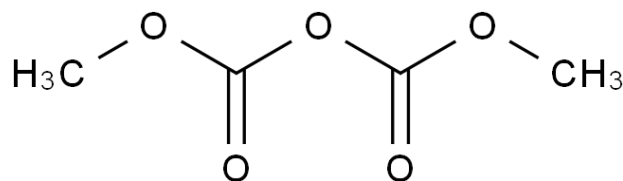
Nasycené mastné kyseliny s kratšími řetězci vykazují antimikrobiální aktivitu a jsou jednou z možností, jak snížit obsah siřičitanů ve víně. Nejsou schopny siřičitany plně nahradit ale pouze doplnit jejich funkci. Potlačují alkoholovou a malolaktickou fermentaci a je tedy možné je využít ke stabilizaci vína po kvašení [21].

Ovlivňují permeabilitu buněčné membrány tím, že se rozpouští ve fosfolipidové dvojvrstvě a zabraňují tak dalším výměnám látek buňky s okolím. Kvasinka přestane přeměňovat glukózu na ethanol a odumírá. Mastné kyseliny jsou vázány v buňkách a společně s kvasinkami jsou z vína odstraněny. Malé množství mastných kyselin ve víně zůstává, ale v tomto množství podporuje vůni a chuť vína v dobrém smyslu. Pokud by bylo zbytkové množství větší, mohlo by docházet k nežádoucímu zápachu vína. Při použití těchto kyselin v koncentraci 9 mg/l je možné snížit následný přídavek oxidu siřičitého skoro o polovinu [21,29].

#### 1.2.3.6 Dimethyldikarbonát

Dimethyldikarbonát (E 242) není vhodný pro úplnou náhradu siřičitanů, pouze jako doplněk ke snížení jejich množství, protože nemá antioxidační vlastnosti a není účinný proti bakteriím. Chemická struktura dimethyldikarbonátu je znázorněna na obrázku 7. Působí proti kvasinkám. Reaguje s aminoskupinami aktivních míst enzymů a zapříčiní jejich nevratné

poškození a smrt kvasinky. Jeho účinek je jednorázový a je vhodné ho použít při lahvování k odstranění kvasinek, aby nedocházelo k dalšímu nežádoucímu kvašení. Vznikají i vedlejší produkty, mezi které patří metanol, a je nutné kontrolovat jeho hladinu ve víně. Je povolen v maximálním množství 200 mg/l u vín, které mají více jak 5 g/l zbytkového cukru [21].



Obrázek 7: Chemická struktura dimethyldikarbonátu

### 1.2.3.7 Fyzikální metody

#### UV záření

Ultrafialové záření je elektromagnetické záření o vlnové délce 100–400 nm. Má antimikrobiální účinky, nejvíce při vlnové délce 254 nm. Používá se v potravinářství např. pro sterilizaci vody nebo tekutých potravin. Nemá antioxidační vlastnosti a ve víně je vhodné použít ho v kombinaci s menší dávkou siřičitanů nebo jiného antioxidantu [21].

UV záření působí proti bakteriím i kvasinkám, ale kvasinky jsou více odolné a závisí také na kmeni nebo fázi růstu. UV záření způsobuje změnu v DNA těchto mikroorganismů a brání tak dalšímu množení. Změna probíhá hlavně na pyrimidinových bázích, tyminu a cytosinu, kterých mají kvasinky méně [26].

Při ošetření vína je UV záření účinnější v případě vína bílého, protože skrz červené víno záření prochází hůře. Kvůli tomuto problému se vytvořilo zařízení, které by mělo zlepšit ošetření červených vín. Víno zde prochází průhlednou trubicí, která je omotána kolem UV lampy a je více prostupné pro UV záření. Při určitých vlnových délkách nebo dobách expozice může docházet ke snížení organoleptických vlastností vína a je nutno tuto techniku optimalizovat. Je možné také použít UV záření pouze pro dezinfekci sudů nebo nádrží a vyhnout se tak použití chemických prostředků [21].

#### Pulsní elektrické pole (PEF)

Tento proces může být využíván k antimikrobiálnímu ošetření v nápojích a kapalných potravinách. Má velmi dobré účinky, není energeticky náročný a může probíhat kontinuálně. U vín by mohl plně nahradit siřičitany, protože působí antimikrobiálně, zabraňuje hnědnutí moštu a zvyšuje výlisnost hroznů [21,26]

Přístroj se skládá ze dvou elektrod, mezi kterými protéká nápoj nebo potravina. Dochází zde k velmi krátkým, silným elektrickým pulzům (5 až 50 kV/cm). Mikroorganismy umírají

následně poté, co dojde ke vzniku pórů v buněčných membránách, tzv. elektroporaci, čímž se zvýší propustnost a dále může docházet k mechanickému poškození nebo úplnému rozpadu buňky. Může docházet k vratnému procesu, kdy utvořené póry v membráně jsou malé a po chvíli se zpět utvoří celistvá buněčná membrána. Aby bylo tomuto ději zabráněno, je nutno zvýšit sílu elektrického pole nebo přidat více pulzů. Dodanou energií dochází k nárůstům teplot v médiu a je nutno do kontinuálního procesu zavést chlazení, nebo použít proces diskontinuální. Další nevýhodou by mohlo být uvolňování kovů z elektrod. PEF byl zkoumán zatím pouze v laboratorních podmínkách a některé druhy mikroorganismů jsou více odolné a je nutné proces optimalizovat přímo ve výrobě [21].

#### **1.2.4 Siřičitany ve víně**

Siřičitany se do vína přidávají za účelem snížení až odstranění nežádoucích procesů ve víně a mohou také usnadňovat proces výroby vína (čiření, regulace kvašení).

##### **1.2.4.1 Formy SO<sub>2</sub>**

Siřičitany se ve víně vyskytují jako SO<sub>2</sub>, který může být přítomen v několika formách.

##### **Molekulární SO<sub>2</sub>**

Tato forma se nejvíce podílí na antimikrobiálním účinku ve víně, ale má i antioxidační účinky. Někdy je nazýván také jako aktivní SO<sub>2</sub>. Je to hydratovaná forma oxidu siřičitého, která se poté ve víně vyskytuje jako nedisociovaná kyselina siřičitá. Je jednou ze součástí volného SO<sub>2</sub>. Jeho množství je závislé na hodnotě pH, kdy při snižujícím se pH se zvyšuje množství molekulárního SO<sub>2</sub> oproti druhé formě volného SO<sub>2</sub>. Antimikrobiální účinky vykazuje molekulárního SO<sub>2</sub> při koncentraci 0,8–1,3 mg/l. Usmrcuje mikroorganismy tím, že proniká dovnitř buněk a reaguje zde s enzymy a bílkovinami. Dále spotřebovává kyslík, který většina mikroorganismů ve víně potřebuje k životu a napadá buňku i z vnější strany, kde poškozuje buněčnou stěnu. Pokud koncentrace přesáhne 2,5 mg/l, má již víno znatelný zápach [9,30].

##### **Volný SO<sub>2</sub>**

Volný SO<sub>2</sub> se skládá z molekulárního SO<sub>2</sub> (nedisociovaná forma H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) a hydrogensiřičitanového aniontu HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> (disociovaná forma H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>). HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> je reaktivní forma, která reaguje se sloučeninami ve víně a tím tvoří vázaný SO<sub>2</sub>. Tyto reakce chrání víno před oxidací, hnědnutím a nežádoucími zápachy [31].

## Vázaný SO<sub>2</sub>

Vázaný a volný SO<sub>2</sub> tvoří společně tzv. celkový SO<sub>2</sub>, který je ve vínech sledován a jeho limit je dán zákonem. Vázaný SO<sub>2</sub> je tvořen různými sloučeninami, které vznikají reakcí HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> s látkami ve víně, z největší části s acetaldehydem.

Acetaldehyd ve víně vzniká jako meziprodukt fermentace cukrů na alkohol a také oxidací ethanolu a způsobuje nepříjemný zápach a pachut' vína. Hydrogensířičitanový anion se váže s acetaldehydem za vzniku kyseliny acetaldehyd-sířičité, která již tyto špatné vlastnosti nemá. HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> se může vázat také s cukry, hlavně s glukózou za tvorby kyseliny glukoso-sířičité, a s fruktózou za vzniku kyseliny fruktoso-sířičité. Tím, že se utvoří vazba s cukry, dojde k inaktivaci žádané funkce sířičitanů ve víně. Z tohoto důvodu jsou povolena vyšší množství sířičitanů ve sladkých vínech. Dále může docházet k vazbám s fenolickými sloučeninami, pektiny nebo s kyselinou pyrohroznovou [30].

### 1.2.4.2 Legislativa

Maximální povolený obsah celkového oxidu sířičitého ve víně je uveden v příloze I B NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 606/2009 (viz příloha 1). Mezní hodnoty se liší v závislosti na druhu nebo cukernatosti vína.

Vína s výjimkou šumivého a likérového vína:

- 150 mg/l pro červená vína
- 200 mg/l pro bílá a růžová vína

Vína s obsahem nejméně 5 g cukru (glukosa + fruktosa) na litr:

- 200 mg/l pro červená vína
- 250 mg/l pro bílá a růžová vína
- 300 mg/l pro přesně definovaná vína – např. pozdní sběr, Bordeaux supérieur a další (viz příloha 1)
- 350 mg/l pro přesně definovaná vína – např. výběr z hroznů, Tokajský mászláš a další (viz příloha 1)
- 400 mg/l pro přesně definovaná vína – např. výběr z bobulí, výběr z cibéb a další (viz příloha 1)

Likérová vína:

- 150 mg/l pro likérová vína s obsahem cukru menším než 5 g/l
- 200 mg/l pro likérová vína s obsahem cukru alespoň 5 g/l



Šumivá vína:

- 185 mg/l pro jakostní šumivá vína
- 235 mg/l pro ostatní šumivá vína

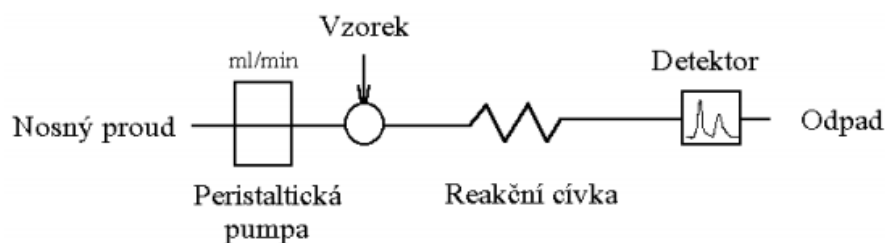
## 1.2.5 Stanovení siřičitanů

Siřičitany lze stanovit různými metodami. V této kapitole je uvedeno několik vybraných metod pro stanovení siřičitanů.

### 1.2.5.1 Průtoková injekční analýza (FIA)

Tato metoda může být použita pro stanovení volných i celkových siřičitanů ve vzorcích nápojů i potravin. Podle formy vzorku je případně nutné převedení do roztoku. Je mnoho způsobů, jak tuto analýzu provést, protože je možno volit různé způsoby detekce.

Základní schéma FIA je znázorněno na obrázku 8. Nosná kapalina pomocí peristaltického čerpadla proudí konstantní rychlostí v přístroji. Do proudu nosné kapaliny se dávkovacím ventilem vstříkují vzorek. Vzorek je unášen do reakční cívky, kde dojde k promíchání nebo chemické reakci s činidlem. Činidlo může být přidáváno za dávkovacím ventilem také pomocí čerpadla. Roztok prochází detektorem a poté je vypouštěn do odpadu. Detektory mohou být např. spektrofotometrické, flourometrické, refraktometrické nebo coulometrické [32].



Obrázek 8: Základní schéma FIA

### Celkový SO<sub>2</sub>

Připraví se kalibrační řada standardu SO<sub>2</sub> pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> s přidavkem NaOH. Vzorky se upraví tak, aby mohly být dávkovány do přístroje. Úprava může probíhat destilačně nebo extrakcí. Nápoje se upravovat nemusí. Vzorek se nejprve zalkalizuje hydroxidem sodným, tím se uvolní vázané siřičitany, a poté je dávkován do přístroje. Po nadávkování je vzorek unášen nosným roztokem (destilovaná voda) a následně okyselen kyselinou sírovou. Dojde k uvolnění plynného SO<sub>2</sub>, který prochází skrz teflonovou membránu. Přes membránu projde do roztoku malachitové zeleně, kterou SO<sub>2</sub> odbarví a proudí do spektrofotometrického detektoru. Měří se stupeň odbarvení při 615 nm. Obsah siřičitanů v mg/l se zjistí za pomoci kalibrační závislosti koncentrace na výšce píků siřičitanů [33].

## **Volný SO<sub>2</sub>**

Tato metoda je uváděna pro červená a bílá vína, ale mohla by být použita i pro jiné nápoje nebo potraviny. Je stejná jako pro celkový SO<sub>2</sub> pouze s tím rozdílem, že se vzorek nealkalizuje ale pouze okyseluje. V tomto případě je použita kyselina citrónová, která uvolňuje plynný SO<sub>2</sub> z volných ale i malé části vázaných siřičitanů [33].

### **1.2.5.2 Monier–Williamsova metoda**

Tato metoda má několik možných modifikací a jsou vhodné pro stanovení celkových siřičitanů. Původní metoda se provádí tak, že se okyselený vzorek převede do roztoku peroxidu vodíku. Dojde k uvolnění kyseliny sírové, která se poté titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného za použití vhodného indikátoru [34].

Jednou z úprav této metody je, že se místo titrace přidá chlorid barnatý, utvoří se sraženina a ta se potom váží. Další úpravou je vyhodnocení pomocí diferenční pulzní polarografie nebo “square-wave“ voltametrie [34,35].

### **1.2.5.3 Enzymatická metoda**

Enzymatická metoda se využívá pro stanovení celkových siřičitanů v potravinách a nápojích. Důležitou roli zde hraje nikotinamidadeninukleotid (NADH). Reakce se účastní dva enzymy, sulfitoxidas a NADH-peroxidasa. Sulfitoxidas v přítomnosti kyslíku oxiduje siřičitany na sírany za současné tvorby peroxidu vodíku. NADH-peroxidasa v přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje NADH na NAD<sup>+</sup>. Množství NAD<sup>+</sup> je poté rovno množství obsažených siřičitanů. Detekce je provedena spektrofotometricky, kdy se měří úbytek absorbance NADH při 340 nm [36].

### **1.2.5.4 Izotachoforetické stanovení**

Při izotachoforetickém stanovení probíhá separace látek na základě odlišné mobility iontů v elektrickém poli. Vzorek se dávkuje mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Postupem času dochází k ustálenému stavu a všechny ionty se pohybují stejnou rychlostí, každý ve své zóně. V této metodě siřičitanové ionty tvoří s formaldehydem velmi stabilní komplex (hydroxymethylsulfonát – HMS), který je detekován vodivostním detektorem. Výsledkem je izotachoforeogram, kde výška značí kvalitu a délka zóny kvantitu [37,38].

### **1.2.5.5 Jodometrická metoda**

Jodometrická titrace je uvedena v NAŘÍZENÍ KOMISE (EHS) č. 2676/90 jako „Rychlá metoda stanovení“. Touto metodou lze zjistit obsah volných i celkových siřičitanů. Metoda je využívána pro rozbor vín v akreditovaných laboratořích [39].

Nejprve se provádí stanovení volných siřičitanů. U bílých a růžových vín se pipetuje 50 ml vzorku. U červeného vína by při zvolení stejného objemu mohl nastat problém, protože škrobový maz v bodě ekvivalence barví roztok do tmavě modré barvy. Červená vína jsou také tmavě zbarvená a barevný přechod škrobového mazu v nich není znatelný. Pro červená vína je tedy vhodné volit nižší objemy vzorku a následně vzorek zředit tak, aby změna barvy indikátoru v bodě ekvivalence byla dobře viditelná. Pro uvolnění plynného SO<sub>2</sub> se do vzorku přidává kyselina sírová. Titrace se provádí odměrným roztokem jodu do modrého zbarvení škrobového mazu. Ve stejném podílu se následně provede titrace vázaných siřičitanů. Provádí se ve dvou krocích. Uvolnění vázaných siřičitanů se uskutečňuje pomocí přídatku NaOH. Pro převedení siřičitanů na plynný SO<sub>2</sub> se znovu použije kyselina sírová a provede se titrace roztokem jodu na škrobový maz. Druhý krok se provádí stejně jako předchozí. Liší se pouze zvýšením objemu přidávaných činidel [40].

#### **1.2.5.6 Iontová chromatografie**

Stanovení pomocí iontové chromatografie se využívá pro stanovení celkového oxidu siřičitého. Iontová chromatografie může být podle náboje sledované látky rozdělena na aniontovou a kationtovou. Stacionární fáze má opačný náboj oproti analyzované látce a během měření mezi nimi probíhají iontové interakce. Každý ion se na stacionární fázi zdrží jinak dlouhou dobu. Podle doby zdržení (retenčního času) se potom ionty různého druhu od sebe oddělí a do detektoru putují postupně. Nejvíce využívaný je vodivostní detektor [41].

Pro stanovení celkových siřičitanů se využívá metoda kalibrační křivky. Vhodným kalibračním roztokem je síran sodný. Pro uvolnění vázaných siřičitanů ze vzorku se použije NaOH. Pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se převedou siřičitany na sírany. Na detekci se využívá vodivostní detektor [42].

#### **1.2.5.7 Cyklická voltametrie s tištěnými elektrodami**

Cyklická voltametrie se využívá k měření proudu, který protéká pracovní elektrodou v závislosti na potenciálu, který se mění v čase. Výsledná závislost je zaznamenána jako voltamogram s charakteristickými píky. Pracovní elektrody, které se zde používají jsou tištěné elektrody ze stříbra s nanočásticemi zlata. Tyto elektrody jsou velmi citlivé pro stanovení siřičitanů ve víně. Výhodou je také to, že lze siřičitany stanovovat i za přítomnosti polyfenolů ve víně. Při použití jiných elektrod pro cyklickou voltametrii by polyfenoly rušily stanovení z důvodu podobných oxidačních potenciálů s SO<sub>2</sub> [43].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Vzorky

Stanovení obsahu siřičitanů ve víně bylo provedeno dvěma metodami: jodometricky a izotachforeticky. Vzorky vín byly odebrány z nerezových sudů s plovoucím víkem. Vzorků bylo celkem 10, přičemž 2 vzorky byly stejného druhu ale lišily se rokem sklizně. Specifikace vzorků je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2: Popis vzorků vín

Číslo vzorku	Odrůda	Ročník	Dělení podle obsahu zbytkového cukru	Dělení podle barvy
1	Veltlínské zelené	2018	Polosuché	Bílé
2	Neuburg	2018	Suché	Bílé
3	Müller Thurgau	2018	Suché	Bílé
4	Frankovka klaret	2017	Polosladké	Bílé
5	Hibernal	2018	Sladké	Bílé
6	Modrý Portugal	2018	Polosuché	Růžové
7	Dornfelder	2018	Suché	Růžové
8	Dornfelder	2017	Suché	Růžové
9	Modrý Portugal	2017	Suché	Červené
10	Dornfelder	2017	Suché	Červené

### 2.2 Jodometrické stanovení

Jodometrické stanovení oxidu siřičitého, resp. siřičitanů ve víně bylo provedeno podle NAŘÍZENÍ KOMISE (EHS) č. 2676/90 [39].

#### 2.2.1 Pomůcky

- Titrační baňky (250 ml)
- Byreta (25 ml)
- Pipety (2, 10, 20, 50 ml)
- Odměrné válce (10, 50, 100 ml)

#### 2.2.2 Činidla

- Chelaton III, 30 g/l
- Hydroxid sodný (NaOH), 4 M
- Kyselina sírová (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1:10

- Škrobový maz
- Roztok jodu, 0,025 M

### 2.2.3 Postup

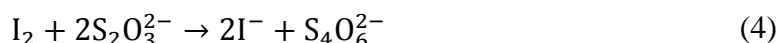
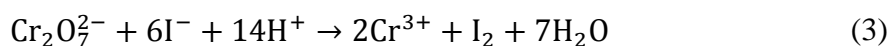
Prvním krokem bylo stanovení volného oxidu siřičitého. V případě bílého a růžového vína bylo odpipetováno 50 ml vzorku vína. V případě červeného vína bylo odpipetováno 20 ml vzorku vína a zředěno vodou z důvodu lepší viditelnosti barevného přechodu při titraci. Dále byl přidán 1 ml Chelatonu III, 5 ml škrobového mazu a nakonec 3 ml kyseliny sírové. Roztok byl ihned titrován 0,025M roztokem jodu, dokud nepřetrvávalo modré zbarvení po dobu 10 až 15 sekund. Spotřeba použitého jodu byla označena jako  $V_1$ .

Ve stejném podílu byl stanoven i vázaný oxid siřičitý. Bylo přidáno 8 ml 4M hydroxidu sodného a po promíchání byl roztok ponechán 5 minut v klidu. Po uplynutí této doby bylo přidáno 10 ml kyseliny sírové a ihned titrováno 0,025M roztokem jodu. Spotřeba byla označena jako  $V_2$ . Dále bylo přidáno 20 ml 4M hydroxidu sodného. Roztok byl protřepán a ponechán v klidu 5 minut. Poté bylo přidáno 100 ml studené destilované vody, 30 ml kyseliny sírové a ihned titrováno 0,025M roztokem jodu. Spotřeba byla označena jako  $V_3$ .

### 2.2.4 Standardizace roztoků

#### Standardizace 0,1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Standardizace byla provedena na základní látku pevný dichroman draselný. Jod vzniklý oxidací jodidu byl titrován na indikátor škrobový maz. Jedná se o nepřímou titraci a reakce probíhá podle rovnice:



Do titrační baňky bylo naváženo diferenčně vypočítané množství dichromanu draselného pro 1 titraci, přidáno přiměřené množství destilované vody, 5 ml 2M kyseliny sírové a asi 1 g tuhého jodidu draselného. Roztok byl titrován odměrným 0,1M roztokem thiosíranu sodného do slabě nažloutlého odstínu. Poté bylo přidáno 5 ml škrobového mazu a modrý roztok byl dotitrován do odbarvení indikátoru.

#### Výpočet navážky $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ :

$$m = \frac{1}{6} \cdot M_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \cdot (c \cdot V)_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{1}{6} \cdot 294,2 \cdot 0,1 \cdot 0,01 = \mathbf{0,04903 \text{ g}} \quad (5)$$

### Výpočet přesné koncentrace:

Výpočty koncentrací byly provedeny podle rovnice 6 z hodnot uvedených v tabulce 3, kde jsou zároveň i uvedeny výsledné koncentrace Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Tabulka 3: Standardizace Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Hmotnosti K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, objemy a výsledné koncentrace Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Hmotnost K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> [g]		Objem Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [ml]		Koncentrace Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [mol/l]	
<b>m<sub>1</sub></b>	0,0481	<b>V<sub>1</sub></b>	9,2	<b>c<sub>1</sub></b>	0,1066
<b>m<sub>2</sub></b>	0,0488	<b>V<sub>2</sub></b>	9,6	<b>c<sub>2</sub></b>	0,1036
<b>m<sub>3</sub></b>	0,0482	<b>V<sub>3</sub></b>	8,9	<b>c<sub>3</sub></b>	0,1104

Ukázkový výpočet koncentrace:

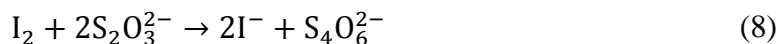
$$c_1 = \frac{6 \cdot m_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}{M_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \cdot V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} = \frac{6 \cdot 0,0481}{294,2 \cdot 9,2 \cdot 10^{-3}} = 0,1066 \text{ mol/l} \quad (6)$$

Výpočet průměrné koncentrace:

$$c = \frac{c_1 + c_2 + c_3}{3} = 0,1068 \text{ mol/l} \quad (7)$$

### Standardizace 0,025M jodu

Ke standardizaci jodu byl jako základní látka využit standardizovaný roztok thiosíranu. Jako indikátor byl použit škrobový maz. Reakce probíhá podle rovnice:



Do titrační baňky bylo odpipetováno 10 ml 0,025M roztoku jódu, přidáno přiměřené množství vody, 5 ml HCl (1:4) a titrováno 0,1M roztokem thiosíranu sodného do světle žluté barvy. Poté bylo přidáno 5 ml škrobového mazu a modrý roztok byl dotitrován do odbarvení.

### Výpočet přesné koncentrace:

Výpočet koncentrace byl proveden podle rovnice 9 pomocí objemů uvedených v tabulce 4.

Tabulka 4: Objemy Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pro standardizaci I<sub>2</sub>

Objem Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [ml]	
<b>V<sub>1</sub></b>	4,7
<b>V<sub>2</sub></b>	4,7
<b>V<sub>3</sub></b>	4,7

$$c = \frac{\frac{1}{2} \cdot (c \cdot V)_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}{V_{\text{I}_2}} = \frac{\frac{1}{2} \cdot 0,1068 \cdot 4,7}{10} = 0,02509 \text{ mol/l} \quad (9)$$

## 2.3 Izotachoforetické stanovení

Izotachoforetické stanovení bylo využito pouze pro stanovení volných siřičitanů ve víně a bylo provedeno podle metody, která je popisována v diplomové práci Bc. Jana Černohorského. Metoda je založena na detekci stabilního hydroxymethylsulfonátu (HMS), který vzniká reakcí siřičitanů s formaldehydem [38].

### 2.3.1 Přístroje a pomůcky

- Elektroforetický analyzátor EA 102, Villa Labeco, Slovensko
- Laboratorní pH metr inoLab pH 720, WTW Německo
- Analytické váhy KERN ABT 120-4M, KERN a Sohn GmbH, Německo
- Pipety Proline, Sartorius Stedim, Německo
- Odměrné baňky (250, 100, 50 ml)

### 2.3.2 Činidla

- Kyselina chlorovodíková (HCl), 0,01 M a 1 M
- $\beta$ -alanin ( $C_3H_7NO_2$ )
- Kyselina octová ( $CH_3COOH$ ), 0,01 M a 1 M
- Disiřičitan sodný ( $Na_2S_2O_5$ )
- Formaldehyd ( $CH_2O$ ), 36–38%

### 2.3.3 Příprava roztoků

#### Vedoucí elektrolyt (0,01M HCl + $\beta$ -alanin)

Do 250ml odměrné baňky bylo pipetováno 2,5 ml 1M HCl a následně byl objem doplněn destilovanou vodou po rysku. Do takto připraveného roztoku byl v malých dávkách přidáván  $\beta$ -alanin do doby, než bylo dosaženo hodnoty pH 3,2.

#### Koncový elektrolyt (0,01M $CH_3COOH$ )

Do 100ml odměrné baňky byl odpipetován 1 ml 1M  $CH_3COOH$  a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### Kalibrační řada

Byl připraven zásobní roztok odvážením 0,0608 g disiřičitanu sodného do 100ml odměrné baňky s 1 ml formaldehydu. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Z tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada ředěním. Ze zásobního roztoku bylo pipetováno 2 ml, 1 ml, 0,5 ml, 250  $\mu$ l, 125  $\mu$ l a 62,5  $\mu$ l do 50ml odměrných baněk,

tj. ředěno 25x, 50x, 100x, 200x, 400x a 800x. Koncentrační rozsah siřičitanů byl 0,64–20,48 mg/l.

### **Roztoky vzorků**

Vzorky byly připraveny odpipetováním 5 ml vína do 50ml odměrné baňky s 1 ml formaldehydu a doplněny destilovanou vodou po rysku.

### **2.3.4 Postup**

Nejprve byl naplněn zásobník vedoucího elektrolytu a do přístroje nadávkován koncový elektrolyt pro ověření činnosti přístroje. Vzorek byl dávkován do přístroje pomocí dávkovacího kohoutu o objemu 30  $\mu$ l. Měření probíhalo v analytické koloně při hnacím proudu 30  $\mu$ A po dobu 30 minut. Pro každý vzorek i roztoky standardů kalibrační řady bylo měření provedeno dvakrát.



### 3 Výsledky a diskuze

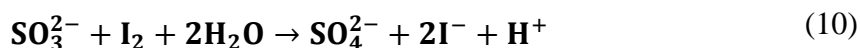
Bylo provedeno stanovení siřičitanů ve víně pomocí dvou metod. Oběma metodami byl stanoven volný oxid siřičitý ve víně. Jodometrickou metodou byl stanoven i celkový oxid siřičitý ve víně. Stanovení pomocí dvou metod bylo provedeno z důvodu porovnání obou metod.

#### 3.1 Jodometrie

Jodometrické stanovení vycházelo z NAŘÍZENÍ KOMISE (EHS) č. 2676/90. Tato metoda umožňuje stanovení jak volných, tak celkových siřičitanů. Je použitelná pro vína bílá i červená [39].

Volný a vázaný oxid siřičitý byl stanoven v jednom podílu. Nejprve byl stanoven volný oxid siřičitý. Okyselený vzorek kyselinou sírovou, díky kterému došlo k uvolnění plynného SO<sub>2</sub>, byl titrován odměrným roztokem jodu do modrého zbarvení škrobového mazu. Ihned po této titraci bylo provedeno stanovení vázaných siřičitanů ve dvou krocích. Nejprve byl přidán roztok NaOH, který uvolnil vázané siřičitany. Plynný SO<sub>2</sub> byl poté uvolněn kyselinou sírovou. Následovala druhá titrace jodem na škrobový maz a třetí titrace se provedla stejným způsobem jako druhá s tím rozdílem, že byly použity jiné objemy činidel. Podrobný postup je uveden v kapitole 2.2.3. U každého vzorku byla titrace provedena třikrát a veškeré spotřeby jodu jsou uvedeny v příloze 2. Pro výpočty byly použity průměrné hodnoty spotřeb.

Obsah siřičitanů ve víně byl vyjádřen v mg oxidu siřičitého v 1 litru vína. Výpočet se řídil chemickou rovnicí reakce a rovností látkových množství:



$$n_{\text{SO}_3^{2-}} = n_{\text{I}_2} \quad (11)$$

$$c_{\text{SO}_3^{2-}} \cdot V_{\text{SO}_3^{2-}} = c_{\text{I}_2} \cdot V_{\text{I}_2} \quad (12)$$

##### 3.1.1 Obsah volného SO<sub>2</sub> ve vzorcích

Obsah volného oxidu siřičitého, resp. siřičitanů ve víně není samostatně limitován legislativou, proto jsou jeho hodnoty spíše informativní. Větší význam mají dohromady s vázaným oxidem siřičitým jako celkový SO<sub>2</sub>.

Pro výpočet byl použit vztah uvedený v rovnici 13, kde V<sub>1</sub> značí spotřebu při první titraci, kterou byly stanoveny volné siřičitany.

$$c_{\text{SO}_3^{2-}} = \frac{c_{\text{I}_2} \cdot V_1 \cdot M_{\text{SO}_2}}{V_{\text{vzorku}}} \quad (13)$$

Ukázkový výpočet pro vzorek č. 1:

$$c_{\text{SO}_3^{2-}} = \frac{0,02509 \cdot 0,33 \cdot 64}{50} = 10,59 \cdot 10^{-3} \text{ g/l} = \mathbf{10,59 \text{ mg/l}} \quad (14)$$

Tabulka 5: Obsahu volného SO<sub>2</sub> ve víně stanovený jodometricky

Vzorek	Obsah volného SO <sub>2</sub> [mg/l]
1	10,59
2	22,48
3	4,82
4	3,21
5	46,89
6	33,08
7	44,98
8	3,21
9	20,87
10	17,68

Z Tabulky 5 je patrné, že obsah volných siřičitanů ve víně se pohyboval v relativně malém rozmezí. Nejméně volných siřičitanů obsahoval vzorek č. 4 (Frankovka klaret 2017, bílé, polosladké) a vzorek č. 8 (Dornfelder 2017, růžové, suché), kdy obsah volných siřičitanů byl pouhých 3,21 mg/l a vzorek č. 3 (Müller Thurgau 2018, bílé, suché) s obsahem volných siřičitanů 4,82 mg/l. Naopak nejvíce volných siřičitanů obsahoval vzorek č. 7 (Dornfelder 2018, růžové, suché) s obsahem volných siřičitanů 44,98 mg/l a vzorek č. 5 (Hibernal 2018, bílé, sladké) s obsahem 46,89 mg/l volných siřičitanů. Porovnáním vzorků č. 7 a 8, což jsou vína stejného druhu ale s odlišným rokem sklizně, je možné se domnívat, že obsah volných siřičitanů se postupem času snižuje.

### 3.1.2 Obsah celkového SO<sub>2</sub> ve vzorcích

Obsah celkového oxidu siřičitého ve víně je dán součtem volného a vázaného oxidu siřičitého. Tyto hodnoty již nesmí dle zákona překračovat stanovenou mez, která se pro jednotlivá vína liší (Viz kapitola 1.2.4.2).

Výpočet obsahu celkových siřičitanů byl proveden podle rovnice 15. Součet spotřeb všech tří titrací udává spotřebu pro celkové siřičitany, kde V<sub>1</sub> je spotřeba pro volné siřičitany, V<sub>2</sub> a V<sub>3</sub> jsou spotřeby pro vázané siřičitany.

$$c_{\text{SO}_3^{2-}} = \frac{c_{\text{I}_2} \cdot (V_1 + V_2 + V_3) \cdot M_{\text{SO}_2}}{V_{\text{vzorku}}} \quad (15)$$

Ukázkový výpočet pro vzorek č. 1:

$$c_{\text{SO}_3^{2-}} = \frac{0,02509 \cdot (0,33 + 1,66 + 0,2) \cdot 64}{50} = 70,33 \cdot 10^{-3} \text{g/l} = \mathbf{70,33 \text{ mg/l}} \quad (16)$$

Tabulka 6: Obsahu celkového SO<sub>2</sub> ve víně stanovený jodometricky

Vzorek	Obsah celkového SO <sub>2</sub> [mg/l]	Limit [mg/l]	Splněn limit
1	70,33	250	ANO
2	89,28	200	ANO
3	96,67	200	ANO
4	33,07	250	ANO
5	255,32	250	NE
6	186,59	250	ANO
7	123,96	200	ANO
8	132,64	200	ANO
9	115,61	150	ANO
10	134,88	150	ANO

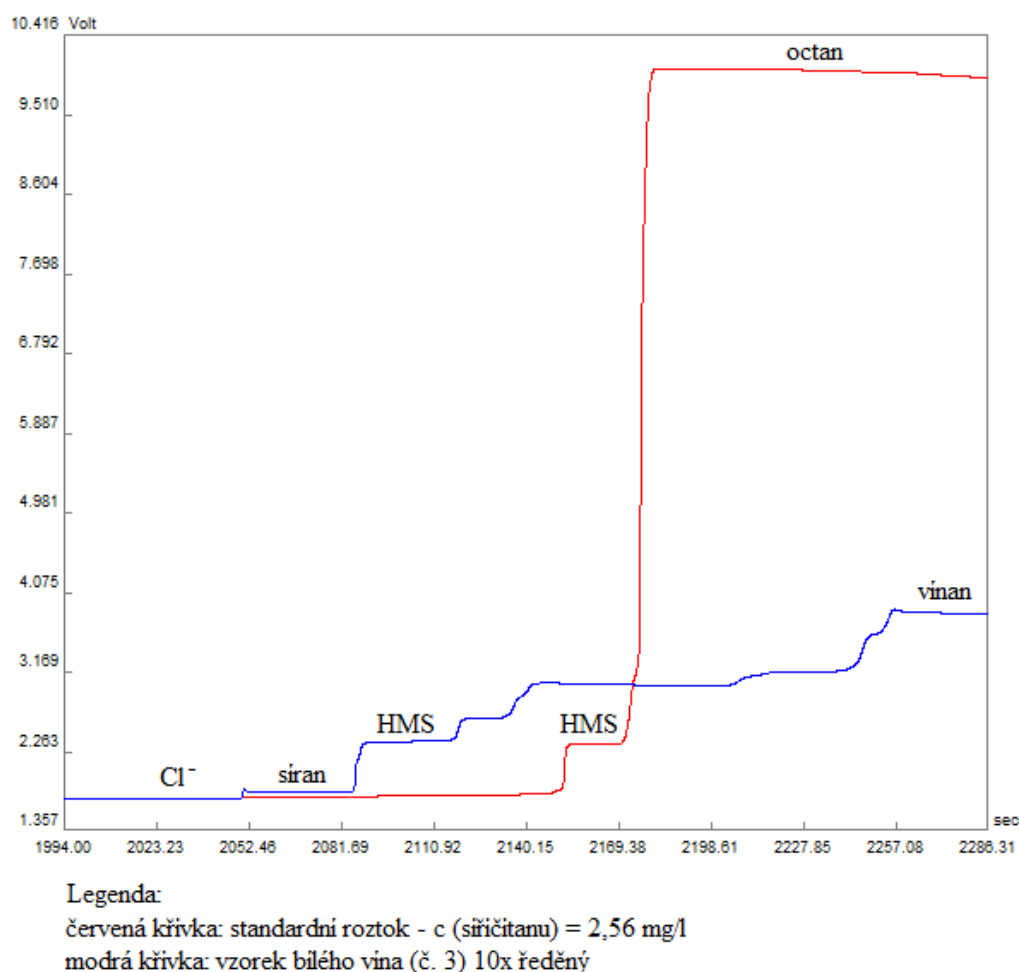
Celkové siřičitany jsou omezořány legislativou a neměly by překračovat zákonem stanovenou mez. V Tabulce 6 jsou uvedeny limity podle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 606/2009 (viz příloha 1) pro jednotlivé vzorky a zda vzorky tento limit splňují. V případě těchto deseti vzorků byla mez překročena pouze u jednoho, a to u vzorku č. 5 (Hibernal 2018, bílé, sladké), kdy byl limit 250 mg/l překročen o 5,32 mg/l celkových siřičitanů. U všech ostatních vín byly hodnoty pod limitní mezí. Nejméně celkových siřičitanů obsahoval vzorek č. 4 (Frankovka klaret 2017, bílé, polosladké), 33,07 mg/l. Bílá vína (vzorek č. 1–5) s výjimkou vzorku č. 5 se pohybují v hodnotách do 100 mg/l celkových siřičitanů. Oproti tomu všechna růřová a červená vína mají obsah celkových siřičitanů vyšší než 100 mg/l. Opětovným porovnáním vzorku č. 7 a 8 lze zjistit, že vyšší koncentrace celkových siřičitanů, cca o 11 mg/l, byla tentokrát nalezena u vzorku mladšího ročníku. V tomto vzorku se tedy vyskytovalo více vázaných siřičitanů, což mohlo být způsobeno vyšší mírou síření oproti vzorku č. 7, nebo mohlo dojít k přeměně volného siřičitanu na siřičitan vázaný v průběhu skladování vína.

### 3.2 Izotachoforéza

Izotachoforetické stanovení bylo provedeno, aby bylo možné jeho porovnání s jodometrickou metodou.

Stanovení je zalořeno na separaci látek podle odlišné mobility iontů v elektrickém poli. Siřičitanové ionty tvoří velmi stálý komplex s hydroxymethylsulfonátem (HMS). Tento

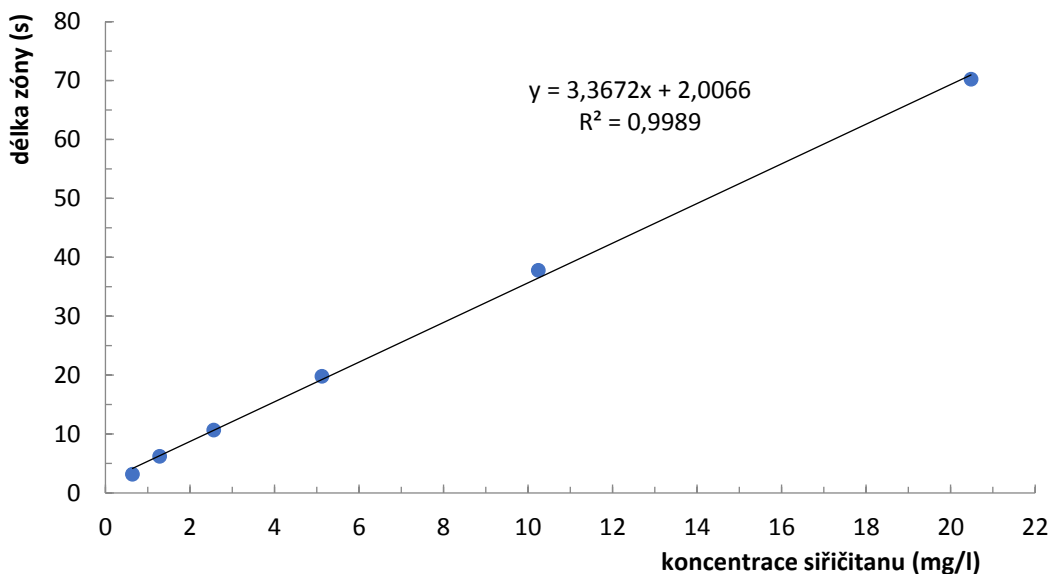
komplex je detekován pomocí vodivostního detektoru. Z výsledného záznamu v podobě izotachoforeogramu (Obrázek 9) lze určit množství siřičitanů odečtením délky zóny HMS a dosazením do rovnice kalibrační závislosti.



Obrázek 9: Ukázkový izotachoforeogram pro jeden standardní roztok a vzorek č. 3

### 3.2.1 Kalibrační závislost délky zóny na koncentraci siřičitanů

Ze zásobního roztoku disiřičitanu sodného s koncentrací siřičitanů 512 mg/l byly připraveny kalibrační body v rozsahu 0,64–20,48 mg/l. po proměření všech bodů byly zjištěny délky zón hydroxymethylsulfonátu (HMS) a byla sestavena kalibrační závislost (viz Obrázek 10). Každé měření bylo provedeno dvakrát. Do kalibrační závislosti byly použity průměrné hodnoty délek zón. Hodnoty obou měření jsou uvedeny v příloze 3. Linearita kalibrační závislosti byla pro měřený koncentrační rozsah velice dobrá, s koeficientem determinace,  $R^2$ , 0,9989.



Obrázek 10: Kalibrační závislost délky zóny na koncentraci siřičitanů

### 3.2.2 Obsah volného SO<sub>2</sub> ve vzorcích

Obsah volných siřičitanů se určil pomocí kalibrační přímky. Po proměření připravených vzorků vín byly zjištěny délky zón HMS. Dosazením do rovnice kalibrační závislosti byly vypočteny koncentrace volných siřičitanů ve vzorcích v mg/l. Měření všech vzorků bylo provedeno dvakrát a k výpočtu byly použity průměrné hodnoty. Veškeré hodnoty jsou uvedeny v příloze 4.

Tabulka 7: Výsledný obsah volného SO<sub>2</sub> ve vzorcích stanovený izotachoforeticky

Vzorky	Obsah volného SO <sub>2</sub> [mg/l]
1	23,1
2	83,1
3	59,0
4	10,6
5	209,8
6	182,3
7	123,1
8	110,5
9	97,4
10	111,9

V tabulce 7 je uveden obsah volných siřičitanů ve vzorcích vín. Koncentrace se pohybovaly ve velmi širokém rozmezí. Nejméně volných siřičitanů obsahoval vzorek č. 4

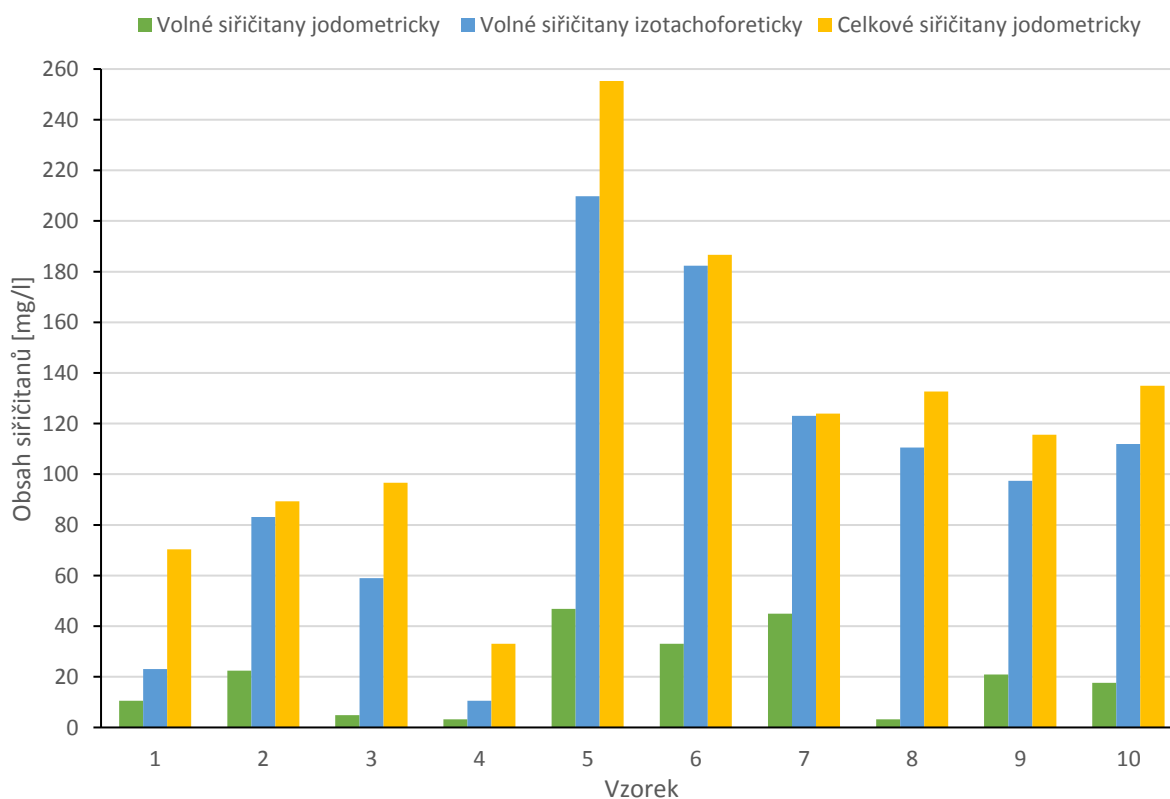
(Frankovka klaret 2017, bílé, polosladké) s obsahem volných siřičitanů 10,6 mg/l a vzorek č. 1 (Veltlínské zelené 2018, bílé, polosuché), který obsahoval 23,1 mg/l volných siřičitanů. Nejvíce volných siřičitanů obsahoval vzorek č. 5 (Hibernal 2018, bílé, sladké), kdy obsah volných siřičitanů byl 209,8 mg/l a vzorek č. 6 (Modrý Portugal 2018, růžové polosuché) s obsahem 182,3 mg/l volných siřičitanů. Stejně jako u celkových siřičitanů stanovených jodometricky mají bílá vína nižší obsah volných siřičitanů než vína červená a růžová. Výjimkou zůstává vzorek č. 5.

### 3.3 Porovnání

Jedním z cílů práce bylo porovnání jodometrické a izotachoforetické metody stanovení volných siřičitanů ve víně. Výhodou jodometrického stanovení je jeho rychlost a možnost stanovení volných i celkových siřičitanů v jednom podílu.

Izotachoforetická metoda má výhodu v tom, že je to metoda automatizovaná a nedochází tolik k odchylkám ve výsledcích důvodem lidského faktoru. Je vhodná i pro stanovení velmi nízkých koncentrací. Nevýhodou však je časová náročnost.

Výsledky obsahu volných siřičitanů se od sebe značně liší a nelze tedy určit, do jaké míry jsou si tyto dvě metody schopny konkurovat co se přesnosti výsledků týče (Obrázek 11).



Obrázek 11: Grafické znázornění obsahu siřičitanů z obou metod

Obsah volných siřičitanů ve víně stanovený izotachoforeticky se pohyboval v rozmezí 10,6–209,8 mg/l a jodometricky v rozmezí 3,21–46,89 mg/l. Obsah celkových siřičitanů ve víně stanovený jodometricky se pohyboval v rozmezí 33,07–255,32 mg/l. Mezi provedením metod byl časový odstup asi 3 měsíce. Mohlo dojít ke znehodnocení vzorků i přesto, že byly skladovány při teplotě do 5 °C a s omezeným přístupem vzduchu i světla. Je možné, že došlo k uvolnění vázaných siřičitanů. Z tohoto důvodu jsou výsledky izotachoforetického stanovení volných siřičitanů podobné spíše výsledkům celkových siřičitanů stanovených jodometricky (viz Obrázek 11). Další možností by mohla být interakce použitých chemikálií, v průběhu izotachoforetického měření a přípravy vzorků, s vázanými siřičitany ve víně.

Aby bylo možné usoudit, která z metod se více přiblížila realitě, bylo provedeno porovnání s výsledky z akreditované laboratoře. V diplomové práci Bc. Petra Dufka bylo provedeno stanovení siřičitanů ve víně v akreditované vinařské laboratoři a v laboratoři ústavu vinohradnictví a vinařství Mendelovy univerzity v Brně. V obou laboratořích se výsledky stanovení volných i celkových siřičitanů shodovaly. Obsah volných siřičitanů ve víně se pohyboval v rozmezí 8–33 mg/l. Celkové siřičitany byly ve víně obsaženy v koncentracích 51–103 mg/l [44]. Výsledky stanovení siřičitanů ve víně z diplomové práce Bc. Petra Dufka se více podobají výsledkům jodometrického stanovení než výsledkům izotachoforetického stanovení. To znamená, že hodnoty jodometrického stanovení se více blíží koncentracím siřičitanů, které se ve víně běžně vyskytují.

## 4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení siřičitanů ve víně dvěma metodami a seznámení se s oxidem siřičitým a siřičitany v potravinářství obecně.

Teoretická část se věnovala výrobě vína a významu oxidu siřičitého v potravinářství, pro jeho antioxidační a konzervační vlastnosti. Současně byly popsány možné náhrady siřičitanů v potravinách, z důvodu jejich nepříznivých vlastností na lidský organismus. V další kapitole jsou uvedeny možné metody stanovení siřičitanů v potravinách.

V experimentální části bylo provedeno stanovení siřičitanů ve víně jodometrickou a izotachoforetickou metodou. Jodometricky bylo provedeno stanovení volných a celkových siřičitanů, izotachoforeticky se stanovily pouze siřičitany volné. Získané výsledky se od sebe velmi lišily. Izotachoforetické stanovení se provádělo po delší době od otevření vín a z tohoto důvodu se domnívám, že se výsledky jodometrického stanovení blíží více reálným hodnotám.

Nejvyšší obsah siřičitanů jak volných, tak celkových obsahoval vzorek č. 5 (Hibernal 2018, bílé, sladké). U sladkých vín se síření provádí ve větší míře, ale v tomto případě již byla překročena zákonem stanovená mez. Nejméně volných i celkových siřičitanů obsahoval vzorek č. 4 (Frankovka klaret 2017, bílé, polosladké). Bílá vína s výjimkou vzorku č. 5 obsahovala méně volných i celkových siřičitanů než červená a růžová vína. Mělo by to však být naopak, protože červená vína obsahují fenolické látky, které působí antioxidačně stejně jako siřičitany. Tato vlastnost by se tedy měla brát v potaz a výše dávky při síření by poté mohla být nižší.

Porovnáním výsledků s hodnotami siřičitanů ve víně stanovenými v akreditované laboratoři bylo zjištěno, že výsledky jodometrického stanovení se více přibližují reálným koncentracím siřičitanů ve víně.



## 5 Seznam použité literatury

- [1] Kadlec Pavel, Melzoch Karel a Voldřich Michal a kol. *Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing s.r.o., 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [2] Rozdělení vín. *Vína z Moravy vína z Čech* [online]. Vinařský fond, © 2005-2018 [cit. 2019-05-18]. Dostupné z: <https://www.wineofczechrepublic.cz/nase-vina/rozdeleni-vin/ticha.html>
- [3] *Vínovníci* [online]. Sommelierský Servis. [cit. 2019-05-20]. Dostupné z: <https://www.vinovnici.cz/clanek/30-vyroba-vina-krok-za-krokem>
- [4] Pelikán Miloš, Míša Drahomír a Dudáš František. *Technologie kvasného průmyslu*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1996. ISBN 80-7157-240-3.
- [5] Drdák Milan, Studnický Július, Mórová Eva a Karovičová Jolana. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- [6] Malík Fedor. *Ze života vína*. Pardubice: Filip Trend Publishing, 2003. ISBN 80-862-8227-9.
- [7] Sulfur dioxide. *The Merck Index Online* [online]. The Royal Society of Chemistry, 2019 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m10371/sulfur%20dioxide?q=unauthorize>
- [8] Sulfur dioxide. *Toxnet* [online]. 8600 Rockville Pike: U.S. National Library of Medicine. [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://toxnet.nlm.nih.gov>
- [9] Bird David. *Understanding wine technology*. 3rd ed. UK: DBQA Publishing, 2010. ISBN 978-0-9535802-2-4.
- [10] *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 7th, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, s. 695-704. ISBN 978-3-527-32943-4.
- [11] Eagleson Mary. *Concise encyclopedia chemistry*. English language ed. New York: de Gruyter, 1993. ISBN 978-0-89925-457-9.
- [12] Syrový Vít. *Tajemství výrobců potravin*. 4. rozš. vyd. Praha: V. Syrový, 2007. ISBN 978-80-903137-9-8.
- [13] Klescht Vladimír, Hrnčíříková Iva a Mandelová Lucie. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006. ISBN 80-251-1292-6.
- [14] Saltmarsh Mike. *Essential guide to food additives*. 4th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. ISBN 978-1-84973-560-5.
- [15] Caballero Benjamin, Trugo Luiz C. a Finglas Paul M. *Encyclopedia of food science and nutrition: Volume eight*. 2nd ed. Oxford: Elsevier Science Ltd., 2003, s. 4773-4784. ISBN 0-12-227063-0.

- [16] Caballero Benjamin, Trugo Luiz C. a Finglas Paul M. *Encyclopedia of food science and nutrition: Volume one*. 2nd ed. Oxford: Elsevier Science Ltd., 2003, s. 261-281. ISBN 0-12-227056-8.
- [17] Watson David H. *Food Chemical Safety: Volume 2 - Additives*. Velká Británie: Woodhead Publishing, 2001, s. 145-170. ISBN 978-1-85573-563-7.
- [18] Lawley Richard, Curtis Laurie a Davis Judy. *The food safety hazard guidebook*. 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012, s. 417-469. ISBN 978-1-84973-381-6.
- [19] *Nariadení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011*. Úřední věstník Evropské unie, 2011. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32011R1169>
- [20] Galanakis Charis M. *Polyphenols: properties, recovery, and applications*. Duxford, United Kingdom: Elsevier, 2018, s. 325-362. ISBN 978-0-12-813572-3.
- [21] Lisanti Maria T., Blaiotta Giuseppe, Nioi Claudia a Moio Luigi. Alternative Methods to SO<sub>2</sub> for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, 18(2), 455-479. DOI: 10.1111/1541-4337.12422.
- [22] Zeuthen Peter a Bøgh-Sørensen Leif. *Food preservation techniques*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003, s. 5-102. ISBN 978-1-85573-530-9.
- [23] Lysozym. *Biological Magnetic Resonance Data Bank* [online]. The Board of Regents of the University of Wisconsin System, 2017 [cit. 2019-06-08]. Dostupné z: <http://www.bmrb.wisc.edu/featuredSys/Lysozyme/>
- [24] Jongen Wim. *Fruit and Vegetable Processing: Improving Quality*. Velká Británie: Woodhead Publishing, 2002, s. 288-309. ISBN 978-1-85573-664-1.
- [25] Baines David a Seal Richard. *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*. Velká Británie: Woodhead Publishing, 2012, s. 358-416. ISBN 978-1-84569-811-9.
- [26] *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2013, 106(9). Dostupné z: [https://issuu.com/vinarsky\\_obzor/docs/vo\\_9\\_2013\\_web](https://issuu.com/vinarsky_obzor/docs/vo_9_2013_web)
- [27] Comuzzo Piergiorgio a Zironi Roberto. Biotechnological Strategies for Controlling Wine Oxidation. *Food Engineering Reviews*. 2013, 5(4), 217-229. DOI: 10.1007/s12393-013-9071-6.
- [28] Izquierdo-Cañas Pedro M., García-Romero Esteban, Huertas-Nebreda Belén a Gómez-Alonso Sergio. Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*. 2012, 23(1), 73-81. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.06.014.
- [29] *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2009, 102(11). Dostupné z: [https://issuu.com/vinarsky\\_obzor/docs/vo\\_11-09](https://issuu.com/vinarsky_obzor/docs/vo_11-09)
- [30] Fic Vlastimil. *Víno: analýza, technologie, gastronomie*. Český Těšín: 2 THETA, 2015. ISBN 978-80-86380-77-3.

- [31] Boulton Roger B., Singleton Vernon L., Bisson Linda F. a Kunkee Ralph E. *Principles and practices of winemaking*. New York: Springer, 1996. ISBN 04-120-6411-1.
- [32] Zagatto Elias A. G., Oliveira Cláudio C., Townshend Alan a Woersfold Paul J. *Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection*. Waltham, Mass.: Elsevier, 2012. ISBN 01-238-5924-7.
- [33] Kocourek Vladimír a Hajšlová Jana. *Metody stanovení cizorodých látek v potravinách: laboratorní příručka*. Praha: Středisko potravinářských informací, 1992. ISBN 80-851-2035-6.
- [34] Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives. *EFSA Journal*. 2016, 14(4). DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4438.
- [35] Monro Tanya M., Moore Rachel L., Nguyen Mai-Chi, Ebendorff-Heidepriem Heike, Skouroumounis George K., Elsey Gordon M. a Taylor Dennis K. Sensing Free Sulfur Dioxide in Wine. *Sensors*. 2012, 12(8), 10759-10773. DOI: 10.3390/s120810759.
- [36] Wood Roger, Foster Lucy, Damant Andrew a Key Pauline. *Analytical methods for food additives*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. ISBN 978-1-85573-722-8.
- [37] Kašička Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. 1997, 91(5), 320-329.
- [38] Černohorský Jan. *Izotachoforetické stanovení siřičitanů ve víně*. Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Martin Bartoš, CSc.
- [39] *Nařízení Komise (EHS) č. 2676/90. Úřední věstník Evropské unie*, 1990. Dostupné také z: <https://publications.europa.eu/cs/publication-detail/-/publication/6528497d-1ece-4355-ab08-c73b3242f7ee/language-cs>
- [40] Sulfur dioxide: Method OIV-MA-AS323-04B. *International Organisation of Vine and Wine*. Dostupné z: <http://www.oiv.int/public/medias/2582/oiv-ma-as323-04b.pdf>
- [41] Lemmon J.P. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. 2nd ed. New York: GE Corporate R&D Center, 2001. ISBN 978-0-08-043152-9.
- [42] Koch Matthias, Köppen Robert, Siegel David, Witt Angelika a Nehls Irene. Determination of Total Sulfite in Wine by Ion Chromatography after In-Sample Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58(17), 9463-9467. DOI: 10.1021/jf102086x.
- [43] Schneider Marion, Türke Alexander, Fischer Wolf-Joachim a Kilmartin Paul A. Determination of the wine preservative sulphur dioxide with cyclic voltammetry using inkjet printed electrodes. *Food Chemistry*. 2014, 159, 428-432. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.049.
- [44] Dufek Petr. *Stanovení oxidu siřičitého ve víně standardními i alternativními metodami*. Lednice, 2014. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Ing. Michal Kumšta.

## 6 Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1 – Mezní hodnoty pro obsah oxidu siřičitého ve vínu .....	53
Příloha 2 – Spotřeby odměrného roztoku jodu při jodometrické titraci.....	57
Příloha 3 – Výsledky izotachoforetického měření kalibrační závislosti .....	59
Příloha 4 – Výsledky izotachoforetického měření vzorků.....	59

▼B

## PŘÍLOHA I B

## MEZNÍ HODNOTY PRO OBSAH OXIDU SIŘIČITÉHO VE VÍNU

## A. OBSAH OXIDU SIŘIČITÉHO VE VÍNU

1. Celkový obsah oxidu siřičitého ve vínu, s výjimkou šumivého a likérového vína, nesmí v okamžiku uvedení do oběhu za účelem přímé lidské spotřeby překročit tyto hodnoty:
  - a) 150 miligramů na litr u červeného vína;
  - b) 200 miligramů na litr pro bílé a růžové víno.
2. Odchylně od bodu 1 písm. a) a b) se zvyšuje horní mez obsahu oxidu siřičitého ve vínech, které obsahují nejméně 5 gramů cukru vyjádřeného jako součet glukosy a fruktosy na litr, na:
  - a) 200 miligramů na litr u červeného vína a
  - b) 250 miligramů na litr u bílého a růžového vína;
  - c) 300 miligramů na litr pro:
    - vína, pro která lze používat podle předpisů Společenství výraz „Spätlese“;
    - bílá vína, pro která lze používat tato chráněná označení původu: Bordeaux supérieur, Graves de Vayres, Côtes de Bordeaux-Saint-Macaire, Premières Côtes de Bordeaux, Côtes de Bergerac, Haut Montravel, Côtes de Montravel, Gaillac, Rosette a Savennières;
    - bílá vína, pro která lze používat chráněná označení původu Allela, Navarra, Penedès, Tarragona a Valencia a vína, pro která lze používat chráněná označení původu pocházející z Comunidad Autónoma del País Vasco, a označená výrazem „vendimia tardía“;
    - sladká vína, pro která lze používat chráněná označení původu „Binisalem-Mallorca“;
    - vína pocházející ze Spojeného království vyrobená v souladu s britskými právními předpisy, pokud je obsah cukru vyšší než 45 g/l;
    - vína pocházející z Maďarska s chráněným označením původu „Tokaji“ a nesoucí v souladu s maďarskými právními předpisy označení „Tokaji édes szamorodni“ nebo „Tokaji száraz szamorodni“;
    - vína, pro která lze používat tato chráněná označení původu: Loazzolo, Alto Adige a Trentino označená výrazem nebo jedním z výrazů „passito“ nebo „vendemmia tardiva“;
    - vína, pro která lze používat toto chráněné označení původu: „Colli orientali del Friuli“, k němuž je připojen údaj „Picolit“;
    - vína, pro která lze používat chráněná označení původu „Moscato di Pantelleria naturale“ a „Moscato di Pantelleria“;
    - vína pocházející z České republiky, pro která lze používat výraz „pozdní sběr“;
    - vína pocházející ze Slovenska, pro která lze používat chráněné označení původu a označená výrazem „neskorý zber“ a slovenská vína Tokaj, pro která lze použít chráněné označení původu „Tokajské samorodné suché“ nebo „Tokajské samorodné sladké“;
    - vína pocházející ze Slovinska, pro která lze používat chráněné označení původu a označená výrazem „vrhunsko vino ZGP – pozna trgativ“;

**▼B**

- bílá vína s těmito chráněnými zeměpisnými označeními, jejichž celkový obsah alkoholu je vyšší než 15 % objemových a obsah cukru je vyšší než 45 g/l:
  - Vin de pays de Franche-Comté,
  - Vin de pays des coteaux de l'Auxois,
  - Vin de pays de Saône-et-Loire,
  - Vin de pays des coteaux de l'Ardèche,
  - Vin de pays des collines rhodaniennes,
  - Vin de pays du comté Tolosan,
  - Vin de pays des côtes de Gascogne,
  - Vin de pays du Gers,
  - Vin de pays du Lot,
  - Vin de pays des côtes du Tarn,
  - Vin de pays de la Corrèze,
  - Vin de pays de l'Île de Beauté,
  - Vin de pays d'Oc,
  - Vin de pays des côtes de Thau,
  - Vin de pays des coteaux de Murviel,
  - Vin de pays du Val de Loire,
  - Vin de pays de Méditerranée,
  - Vin de pays des comtés rhodaniens,
  - Vin de pays des côtes de Thongue,
  - Vin de pays de la Côte Vermeille,

**▼M2**

- Vin de pays de l'Agenais,
- Vin de pays des terroirs landais,
- Vin de pays des Landes,
- Vin de pays d'Allobrogie,
- Vin de pays du Var,

**▼B**

- sladká vína pocházející z Řecka, jejichž celkový obsah alkoholu je alespoň 15 % objemových a obsah cukru je alespoň 45 g/l, pro která lze používat tato chráněná zeměpisná označení:
  - Τοπικός Οίνος Τυρνάβου (Regional wine of Tyrnavos)
  - Αχαϊκός Τοπικός Οίνος (Regional wine of Ahaia)
  - Λακωνικός Τοπικός Οίνος (Regional wine of Lakonia)
  - Τοπικός Οίνος Φλώρινας (Regional wine of Florina)
  - Τοπικός Οίνος Κυκλάδων (Regional wine of Cyclades)
  - Τοπικός Οίνος Αργολίδας (Regional wine of Argolida)
  - Τοπικός Οίνος Πιερίας (Regional wine of Pieria)
  - Αγιορείτικος Τοπικός Οίνος (Regional wine of Mount Athos-Regional wine of Holy Mountain);
- sladká vína pocházející z Kypru, jejichž skutečný obsah alkoholu je nejvýše 15 % objemových a obsah cukru je alespoň 45 g/l, pro která lze používat chráněné označení původu Κουμανδάρια (Kommandaria):
- sladká vína pocházející z Kypru, získaná z přežalých nebo zaschlých hroznů, jejichž celkový obsah alkoholu je alespoň 15 % objemových a obsah cukru je alespoň 45 g/l, pro která lze používat tato chráněná zeměpisná označení:
  - Τοπικός Οίνος Λεμεσός (Regional wine of Lemesos)

**▼B**

- Τοπικός Οίνος Πάφος (Regional wine of Pafos)
- Τοπικός Οίνος Λάρνακα (Regional wine of Larnaka)
- Τοπικός Οίνος Λευκωσία (Regional wine of Lefkosia);

**▼M2**

- vína pocházející z Malty, jejichž celkový obsah alkoholu je nejméně 13,5 % obj. a obsah cukru je nejméně 45 g/l, pro která lze používat chráněné označení původu „Malta“ a „Gozo“;

**▼B**

d) 350 miligramů na litr pro:

- vína, pro která lze používat podle předpisů Společenství výraz „Auslese“,
- rumunská bílá vína, pro která lze používat tato chráněná označení původu: Murfatlar, Cotnari, Târnave, Pietroasa, Valea Călugărească;
- vína pocházející z České republiky, pro která lze používat výraz „výběr z hroznů“;
- vína pocházející ze Slovenska, pro která lze používat chráněné označení původu a označená výrazem „výber z hrozna“ a slovenská vína Tokaj, pro která lze použít chráněné označení původu „Tokajský másľáč“ nebo „Tokajský fordítáč“;
- vína pocházející ze Slovinska, pro která lze používat chráněné označení původu a označená výrazem „vrhunsko vino ZGP – izbor“;

**▼M2**

- vína, pro která lze používat tradiční označení „Késői szüretelésű bor“;

**▼B**

e) 400 miligramů na litr pro:

- vína, pro která lze používat podle předpisů Společenství výrazy „Beerenauslese“, „Ausbruch“, „Ausbruchwein“, „Trockenbeerenauslese“, „Strohwein“, „Schilfwein“ a „Eiswein“;
- bílá vína, pro která lze používat tato chráněná označení původu: Sauternes, Barsac, Cadillac, Cérons, Loupiac, Sainte-Croix-du-Mont, Monbazillac, Bonnezeaux, Quarts de Chaume, Coteaux du Layon, Coteaux de l'Aubance, Graves Supérieures, Sainte-Foy Bordeaux, Saussignac, Jurançon, pokud za ním nenásleduje výraz „sec“, Anjou-Coteaux de la Loire, Coteaux du Layon, po němž následuje název obce původu Chaume, Coteaux de Saumur, Pacherenc du Vic Bilh, pokud však po něm nenásleduje výraz „sec“, Alsace a Alsace grand cru, pokud po něm nenásleduje výraz „vendanges tardives“ nebo „sélection de grains nobles“;
- sladká vína z přezrálých hroznů a sladká vína ze zaschlých hroznů pocházející z Řecka, která mají obsah zbytkového cukru vyjádřený jako cukr alespoň 45 g/l, pro která lze používat tato chráněná označení původu: Σάμος (Samos), Ρόδος (Rhodos), Πατρα (Patras), Ρίο Πατρών (Rio Patron), Κεφαλονία (Kefalonie), Λήμνος (Limnos), Σητεία (Sitia), Σαντορίνη (Santorin), Νεμέα (Nemea), Δαφνές (Dafnis), a sladká vína z přezrálých hroznů a sladká vína ze zaschlých hroznů, pro která lze používat tato chráněná zeměpisná označení: Σιάτιστας (Siatista), Καστοριάς (Kastoria), Κυκλάδων (Kyklády), Μονεμβάσιος (Monemvasia), Αγιορείτικος (Hora Athos – Svatá hora);
- vína pocházející z České republiky, pro která lze používat výraz „výběr z bobulí“, „výběr z cibéb“, „ledové víno“ nebo „slámové víno“;
- vína pocházející ze Slovenska, pro která lze používat chráněné označení původu a označená výrazy „bobuľový výber“, „hroziakový výber“, „cibébový výber“, „ľadové víno“ nebo „slamové víno“, a slovenská vína Tokaj, pro která lze používat chráněná označení původu „Tokajský výber“, „Tokajská esencia“, „Tokajská výberová esencia“;

**▼B**

- vína pocházející z Maďarska, pro která lze používat chráněné označení původu a nesoucí v souladu s maďarskými právními předpisy označení „Tokaji mászlás“, „Tokaji fordítás“, „Tokaji aszúszecencia“, „Tokaji eszencia“, „Tokaji aszú“ nebo „Töppedt szőlőből készült bor“;
- vína, pro která lze používat chráněné označení původu „Albana di Romagna“, označená výrazem „passito“;
- lucemburská vína, pro která lze používat chráněné označení původu, a označená výrazy „vendanges tardives“, „vin de glace“ nebo „vin de paille“;

**▼M3**

- ina pocházející z Portugalska a mající nárok na chráněné označení původu nebo chráněné zeměpisné označení a na výraz „colheita tardia“;

**▼B**

- vína pocházející ze Slovinska, pro která lze používat chráněné označení původu, a označená výrazy: „vrhunsko vino ZGP – jagodni izbor“ nebo „vrhunsko vino ZGP – ledeno vino“ nebo „vrhunsko vino ZGP – suhi jagodni izbor“;
  - bílá vína pocházející z Kanady, pro která lze používat výraz „Icewine“;
3. Seznamy vín s chráněným označením původu nebo chráněným zeměpisným označením, které jsou uvedeny v bodu 2 písm. c) a d) mohou být změněny, jestliže se změní podmínky výroby dotyčných vín nebo jejich zeměpisné označení či označení původu. Členské státy poskytnou předem všechny nezbytné technické informace týkající se dotyčných vín, včetně jejich specifikací a množství vyrobených za rok.
  4. Jestliže je to nutné z důvodu povětrnostních podmínek, může Komise postupem podle čl. 113 odst. 2 nařízení (ES) č. 479/2008 rozhodnout, že v určitých vinařských zónách Společenství mohou dotčené členské státy povolit zvýšení celkového obsahu oxidu siřičitého nižšího než 300 miligramů na litr uvedeného v tomto bodu nejvýše o 50 miligramů na litr pro vína vyrobená na jejich území. Seznam případů, ve kterých mohou členské státy toto zvýšení povolit, je uveden v dodatku 1.
  5. Členské státy mohou na vína vyrobená na jejich území použít přísnější předpisy.

**B. OBSAH OXIDU SIŘIČITÉHO V LIKÉROVÝCH VÍNECH**

Celkový obsah oxidu siřičitého v likérovém vínu, nesmí v okamžiku uvedení do oběhu za účelem přímé lidské spotřeby překročit tyto hodnoty:

150 miligramů na litr, pokud je obsah cukru nižší než 5 gramů na litr;

200 miligramů na litr, pokud je obsah cukru alespoň 5 gramů na litr;

**C. OBSAH OXIDU SIŘIČITÉHO V ŠUMIVÝCH VÍNECH**

1. Celkový obsah oxidu siřičitého v šumivém vínu, nesmí v okamžiku uvedení do oběhu za účelem přímé lidské spotřeby překročit tyto hodnoty:
  - a) 185 miligramů na litr u všech kategorií jakostního šumivého vína a
  - b) 235 miligramů na litr u všech ostatních šumivých vín.
2. Jestliže je to je to nutné z důvodů povětrnostních podmínek v určitých vinařských zónách Společenství, mohou dotčené členské státy povolit u šumivých vín uvedených v odstavci 1 písm. a) a b) vyrobených na svém území zvýšení celkového obsahu oxidu siřičitého nejvýše o 40 miligramů na litr, pokud vína, u nichž bylo povoleno uvedené zvýšení, nebudou z dotyčných členských států vyvezena.



Příloha 2 – Spotřeby odměrného roztoku jodu při jodometrické titraci

Tabulka 8: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 1

<b>Veltlínské zelené 2018</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	0,30	1,60	0,30
<b>2.</b>	0,30	1,70	0,10
<b>3.</b>	0,40	1,70	0,20
<b>Průměr</b>	<b>0,33</b>	<b>1,66</b>	<b>0,20</b>

Tabulka 9: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 2

<b>Neuburg 2018</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	0,70	2,00	0,10
<b>2.</b>	0,70	2,00	0,15
<b>3.</b>	0,70	1,90	0,10
<b>Průměr</b>	<b>0,70</b>	<b>1,96</b>	<b>0,12</b>

Tabulka 10: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 3

<b>Müller Thurgau 2018</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	0,15	2,30	0,60
<b>2.</b>	0,20	2,30	0,50
<b>3.</b>	0,10	2,50	0,40
<b>Průměr</b>	<b>0,15</b>	<b>2,36</b>	<b>0,50</b>

Tabulka 11: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 4

<b>Frankovka klaret 2017</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	0,10	0,70	0,25
<b>2.</b>	0,10	0,80	0,20
<b>3.</b>	0,10	0,80	0,20
<b>Průměr</b>	<b>0,10</b>	<b>0,76</b>	<b>0,22</b>

Tabulka 12: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 5

<b>Hibernal 2018</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	1,40	5,50	0,90
<b>2.</b>	1,50	5,40	1,20
<b>3.</b>	1,50	5,40	1,10
<b>Průměr</b>	<b>1,46</b>	<b>5,43</b>	<b>1,06</b>

Tabulka 13: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 6

<b>Modrý portugál 2018</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	1,00	4,10	0,65
<b>2.</b>	1,10	4,20	0,60
<b>3.</b>	1,00	4,25	0,55
<b>Průměr</b>	<b>1,03</b>	<b>4,18</b>	<b>0,60</b>

Tabulka 14: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 7

<b>Dornfelder 2018</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	1,35	2,25	0,15
<b>2.</b>	1,40	2,40	0,15
<b>3.</b>	1,45	2,35	0,10
<b>Průměr</b>	<b>1,40</b>	<b>2,33</b>	<b>0,13</b>

Tabulka 15: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 8

<b>Dornfelder 2017</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	0,10	2,20	1,80
<b>2.</b>	0,10	2,20	1,95
<b>3.</b>	0,10	2,30	1,65
<b>Průměr</b>	<b>0,10</b>	<b>2,23</b>	<b>1,80</b>

Tabulka 16: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 9

<b>Modrý portugál 2017</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	0,25	1,00	0,25
<b>2.</b>	0,25	0,90	0,25
<b>3.</b>	0,30	0,90	0,25
<b>Průměr</b>	<b>0,26</b>	<b>0,93</b>	<b>0,25</b>

Tabulka 17: Spotřeba odměrného roztoku jodu u vzorku č. 10

<b>Dornfelder 2017 červené</b>	<b>V<sub>1</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>2</sub> [ml]</b>	<b>V<sub>3</sub> [ml]</b>
<b>1.</b>	0,20	1,20	0,30
<b>2.</b>	0,20	1,25	0,10
<b>3.</b>	0,30	1,25	0,20
<b>Průměr</b>	<b>0,22</b>	<b>1,23</b>	<b>0,20</b>

Příloha 3 – Výsledky izotachoforetického měření kalibrační závislosti

Tabulka 18: Délky zón HMS standardních roztoků kalibrační řady

Koncentrace [mg/l]	Délka zóny 1. měření [s]	Délka zóny 2. měření [s]	Délka zóny průměr [s]	Směrodatná odchylka [s]	RSD [%]
0,64	3,31	3,01	3,16	0,21	6,71
1,28	6,44	6,00	6,22	0,31	5,00
2,56	10,65	10,65	10,65	0,00	0,00
5,12	19,99	19,56	19,78	0,30	1,54
10,24	38,05	37,50	37,78	0,39	1,03
20,48	71,20	69,25	70,23	1,38	1,96

Příloha 4 – Výsledky izotachoforetického měření vzorků

Tabulka 19: Délky zón HMS vzorků

Vzorky	Délka zóny 1. měření [s]	Délka zóny 2. měření [s]	Délka zóny průměr [s]	Směrodatná odchylka [s]	RSD [%]
Vzorek č. 1	9,59	9,96	9,78	0,26	2,7
Vzorek č. 2	30,95	29,00	29,98	1,38	4,6
Vzorek č. 3	21,85	21,90	21,88	0,04	0,2
Vzorek č. 4	5,65	5,50	5,58	0,11	1,9
Vzorek č. 5	72,35	72,95	72,65	0,42	0,6
Vzorek č. 6	63,45	63,35	63,40	0,07	0,1
Vzorek č. 7	42,15	44,75	43,45	1,84	4,2
Vzorek č. 8	39,22	39,18	39,20	0,03	0,1
Vzorek č. 9	35,05	34,52	34,78	0,37	1,1
Vzorek č. 10	39,70	39,65	39,68	0,04	0,1

Tabulka 20: Výsledný obsah volného SO<sub>2</sub> ve vzorcích stanovený izotachoforeticky z obou izotachoforetických měření

Vzorky	Obsah SO <sub>2</sub> 1. měření [mg/l]	Obsah SO <sub>2</sub> 2. měření [mg/l]	Obsah SO <sub>2</sub> průměr [mg/l]	Směrodatná odchylka [mg/l]	RSD [%]
Vzorek č. 1	22,52	23,62	23,1	0,8	3,4
Vzorek č. 2	85,96	80,17	83,1	4,1	4,9
Vzorek č. 3	58,94	59,09	59,0	0,1	0,2
Vzorek č. 4	10,82	10,38	10,6	0,3	3,0
Vzorek č. 5	208,92	210,70	209,8	1,3	0,6
Vzorek č. 6	182,49	182,19	182,3	0,2	0,1
Vzorek č. 7	119,23	126,95	123,1	5,5	4,4
Vzorek č. 8	110,53	110,41	110,5	0,1	0,1
Vzorek č. 9	98,14	96,57	97,4	1,1	1,1
Vzorek č. 10	111,95	111,80	111,9	0,1	0,1