

Inž. Jana Pintar

Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

DOKAZIVANJE CRNIH HIBRIDA U VINU — NITRITNOM METODOM

Kao jedinu sigurnu metodu za diferencijaciju plemenitih i hibridnih crnih vina primjenjivani su posljednjih godina papirhromatografski postupci. U obojenim tvarima hibridnog vina, osim monoglukozida se nalaze i diglukozidi antocijana, koji pod uticajem ultraviolettne svjetlosti po papirhromatografskim postupcima, daju ružičastu do crvenkastonarančastu fluorescenciju.

Veliki doprinos istraživanjima antocijana dao je Ribereau-Gayon P. u svojim brojnim radovima na tom području. Poslije njega i mnogi drugi autori su objavili različite papirhromatografske metode — ascendentne, descendentne, kružne, jedno ili dvodimenzionalne itd., primjenjujući u svojim postupcima različite manje ili više efikasne rastvarače i tehniku. Zajednička je karakteristika ovih hromatografskih metoda dugotrajnost postupka, a neki od njih su dosta komplicirani i skupi.

Autori Dorier P. i Verelle L. (1) tražili su način da izbjegnu papirnu hromatografiju u cilju što bržeg diferenciranja hibridnih vina od vina *Vitis vinifera*. Izradili su potpuno novu vrlo brzu, jednostavnu i osjetljivu metodu, koja kao osnov ima djelovanje natrijevog nitrita u reakcijskoj sredini etanol-amonijska. Kod ovog nitritnog postupka izaziva se neka oksidaciona akcija na antocijane, a tada monoglukozidi ispadaju u vidu smeđe, netopljive flokulacije, a diglukozidi kao produkt oksidacije, pokazuju se pod UV svjetlom u jako zelenoj fluorescenciji.

Kako je za praksu uvijek privlačna svaka jednostavna i brza metoda, nitritni postupak su mnogi istraživači ubrzo provjeravali na crnim vinima svoje zemlje. Garoglio P. G. (2) je u vrlo kratkom vremenu objavio povoljnu ocjenu te nove metode.

Uspoređujući nitritnu metodu s papirhromatografskom, autori Gentillini L. i Cappelleri G. (3) su utvrdili da je spajanje tih dviju metoda nestalno. Utvrdili su da je jaka citronska fluorescencija, doduše, siguran dokaz za prisutnost hibrida, ali nije isključeno da je hibrid prisutan ako ove fluorescencije nema. U hibridnim vinima starim dvije godine nitritna metoda pokazuje slabiju intenzivnost fluorescencije.

U izvještaju komisije OIV se, međutim, kaže da je Rasquilho Raposo M. (4) utvrdio da je nitritna metoda vrlo osjetljiva zato što je zabilježio slabiju fluorescenciju i u vinima *Vitis vinifera*.

Bieber H. (6) također utvrđuje da su nitritnom metodom dobiveni odlični rezultati. Vina *Vitis vinifera* pokazuju vrlo rijetku minimalnu zelenkastu fluorescenciju. U svom najnovijem radu iz tog područja, opisao je postupak pomoću kojeg je moguće zelenu fluorescenciju oksidiranog malvina, dobivenu metodom Doriera i Verella, mjeriti fluorimetrički. Tako je ta metoda postala i kvantitativna.

Tabela 1 — Fluorescentni pokazatelji ispitivanih crnih sorti vina
Vitis vinifera

Fluorescence indexes of the investigated red wines
of the Vitis vinifera varieties

Red. br. No	Sorta — Provinjencija Variety — Origin	Godina Year	Boja Color	Dorier i Verelle	Metode Methods	
					fluorescencija fluorescence	D — P — S diglukozida diglucoside malvin
1/3	Prokupac — Aleksandrovac — Borje	1963.	tamnoplavkasta	nema (2)	nema (1)	
2/1	Prokupac — Krnjevo	1963.	tamnoplavkasta	"	"	
3/5	Prokupac — Subotica — Žleginje	1963.	tamnoplavkasta	"	"	
4/7	Prokupac — Subotica — Stružnjak	1963.	plavkasta sa zelenkastim odsajajem	(— +) slabi tragovi (3)	"	
5/9	Prokupac (varijacije) Subotica — Žleginje	1963.	plavkasta sa zelenkastim odsajajem	(— +) slabi tragovi	+ tragovi	
6/14	Prokupac — Rataje	1963.	tamnoplavkasta	nema	nema	
7/11	Nepoznata crna sorta degenerativnog Habitusa Svetozarevo — Šokovačko vinogr.	1963.	plavkasta sa zelenim odsajajem	+ (— +) jači tragovi (5)	+ (— +) jači tragovi	
8/23	Gamé — Rataje	1963.	plavkasta sa zelenim odsajajem	+ tragovi (4)	+ (— +) jači tragovi	
9/21	Gamé — Trstenik	1963.	tamnoljubičastoplavkasta	nema	(— +) slabi tragovi	
10/22	Gamé — Svetozarevo	1963.	plavkasta sa zelenim odsajajem	+ tragovi	nema	
11/24	Zaćinak — Aleksandrovac	1963.	tamnoljubičastoplavkasta	nema	+ tragovi	
12/20	Plavi burgundac — Trstenik	1963.	tamnoljubičastoplavkasta	nema	nema	

13/18 Merlot — Rataje	1963.	tamnoplavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	(— +) slabi tragovi crvenkaste fluoresc.
14/6 Merlot — Dobrovo	1964.	tamnoplavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
15/12 Merlot — Neblo	1964.	tamnoplavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
16/10 Merlot — Črni kal	1965.	tamnoplavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
17/8 Merlot — Dobrovo	1965.	tamnoljubičastoplavkasta	nema	
18/6 Merlot — Biljenski griči	1966.	tamnoljubičastoplavkasta	nema	
19/27 Kraški teran — Šepulje	1966.	tamnoljubičastoplavkasta	nema	
20/26 Kraški teran — Šepulje (rdeči peceļj)	1966.	tamnoplavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
21/21 " " (rdeči peceļj)	1961.	tamnoplavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
22/54 " " —	1965.	tamnoljubičasto plava	nema	
23/31 Žametovka — Vinomer	1965.	tamnoplavkasta	nema	
24/20 Žametovka — Gadova peč	1964.	tamnoplavkasta	nema	
25/18 Žametovka — Gadova peč	1965.	plavkasta	nema	
26/17 Šentlovrenka — Sremič	1965.	plavkasta	nema	
27/19 Portugalka — Dolenjska	1964.	plavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
26/16 Modra frankinja — Gadova peč	1965.	plavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
29/1 Modra frankinja — Novo mesto	1966.	plavkasta sa zelen- kastim odsjajem	(— +) slabi tragovi	
30/30 Plavac — Pelješac	1966.	kastim odsjajem	nema	
31/35 Refoško — Koper	1966.	Tamnoljubičastoplava	nema	
32/68 Cabernet — Koper	1966.	Tamnoljubičastoplava	nema	

(1) Nema crvenkastorančanaste fluorescencije

No red orange fluorescence

(2) Nema citronskezelene fluorescencije

No green fluorescence

(3) Jedva zametljiva zelenkasta fluorescencija

Slightly green fluorescence

(4) tragovi — traces

(5) jači tragovi — stranges traces

Nakon vlastitih (7, 8) istraživanja o vrijednosti pojedinih papirhromatografskih metoda za dokazivanje diglukozida u vinu, novi nitritni postupak nam je zaista dobro došao, jer smo bili zaključili da svi postupci, opisani u naprijed navedenim radovima, imaju dosta negativnih strana. Želeći da dođemo do realnih rezultata o vrijednosti i osjetljivosti novog postupka, provjerili smo crna sortna vina iz različitih vinorodnih područja. Privlačnost nitritnog postupka bila je sve veća, zato što nije potrebno nikakvo čišćenje ni koncentriranje obojenih tvari i što je upotrebljiv za suha, slatka i desertna vina.

METODIKA RADA I REZULTATI ISPITIVANJA

Ispitivanja smo izvršili na potpuno prirodnim uzorcima vina *Vitis vinifera* i hibrida starih od 6 mjeseci do četiri godine. Uzorke smo uzimali sami iz različitih vinorodnih područja zemlje, a vinifikaciju smo obavljali u podrumu laboratorija. Kod uzoraka prirodnih vina starijih godišta, antocijane smo već ranije istraživali po različitim papirhromatografskim postupcima, pa su nam ti prijašnji rezultati koristili za uspoređivanje.

Nitritna metoda za brzo određivanje diglukozid malvina po Dorieru i Verellu opisana je ovako:

Način rada

Reagensi

1. n/l solna otopina
2. 1% otopina natrijevog nitrita u vodi (NaNO_2)
3. amonijak-alkohol: 10 ml konc. NH_3 ($d = 0,910$), etilalkohol (96%) na 200 ml

Postupak: 1,0 ml crnog vina ili mošta zakiselimo sa 1 kapi n HCl, promiješamo, zatim dodajemo 1 ml 1% NaNO_2 , ponovo promiješamo i tačno nakon 2 minute dodamo 10 ml otopine amonijak-alkohola pa opet promiješamo. Nakon pet minuta otopinu filtriramo u drugu epruvetu.

Za ružičasta vina uzmemo 2—5 ml vina, dodajemo 2—5 kapi n HCl i uvijek samo 1 ml 1% NaNO_2 . Poslije dvije minute dopunimo sa 12 ml otopine amonijak-alkohola.

Za detekciju fluorescencije upotrebljavali smo ultravioletnu lampu tipa »Solimed B. H.« sa filtrom 366 m μ . Poslije deset minuta po uključivanju lampe, epruvete s očišćenom tekućinom podvrgavali smo osvetljavanju ultravioletnim zracima. Boju tečnosti i citronsko-zelenu fluorescenciju mogli smo najbolje ocijeniti ako smo epruvetu držali u kosom položaju na tamnoj podlozi.

Autori Gentilini, Cappelleri (3) tvrde da je pigment stabilan i da su zbog toga uzorci crnog vina i hibrida upotrebljivi za istraživanje i poslije nekoliko godina. Međutim, Bieber (6) smatra da se skladištenjem vina sadržaj malvina znatno promijeni.

Na tabelama br. 1 i br. 2 se vidi da smo analizirali ukupno 32 uzorka vina *Vitis vinifera* i 6 uzoraka hibrida, od čega smo upotrebili 13 starih uzoraka iz 1963. godine. Sve smo te uzorke već bili analizirali ranije (8) primjenjujući modificiranu njemačku zvaničnu metodu. Sada ih prikazujemo radi komparacije.

Tabela 2 — Istraženi uzorci hibrida
Examination of hybrid samples

Broj No	Sorta — Provenienca Variety — origin	Godina Year	Metoda Dorier i Verelle fluorescencija diglukozida fluorescence diglucoside malvin
1/27	Izabela-Vinomer	1961	jasno citronsko zelena (1)**
2/14	Otelo-Smederevo	1963	vrlo jaka citronsko zelena (2) ****
3/37	Otelo-Hudoklin	1961	vrlo jaka citronsko zelena ****
4/17	Couderc 503-Subotica	1963	vanredno jaka citronsko zelena (3) *****
5/a	Klinton-Kapela	1963	vrlo jaka citronsko zelena *****
6/b	Klinton-Dolenjska	1966	vrlo jaka citronsko zelena *****

- (1) Jasno citronsko zelena — Bright lemon green
(2) Vrlo jaka citronsko zelena — Very strong lemon green
(3) Vanredno jaka citronsko zelena — Brilliant lemon green

Kako smo izabrali samo one uzorke, koji su nam kod komparacije najbolje poslužili kao dokaz osjetljivosti metodike, iz dobivenih rezultata smo utvrdili da se osim prokupca pod br. 4, i Gamea br. 10 rezultati slažu, zato što smo ustanovili da je intenzitet fluorescencije u tragovima malo slabiji od onog koji je prije utvrđen. Jedva primjetljivi, zeleni odsjaj boje nađen je još kod četiri uzorka sorte »merlot«. Treba primijetiti da su i Zamorani i Piferi (9) kod svojih bidimenzionalnih papirhromatografskih istraživanja također ustanovili tragove diglukozida malvina baš kod ove sorte vina. Interesantnu crvenu fluorescenciju davao je »merlot« i kod naših istraživanja po njemačkoj zvaničnoj metodi.

Isti, jedva primetljiv zelenkasti odsjaj pronašli smo i kod dva uzorka »modre frankinje«, jednog uzorka »portugalke« i dva uzorka »kraškog terana«. Jedan uzorak starog »Gamea«, koji je i prilikom ranijih ispitivanja davao jače tragove, pokazao je i sada po toj metodi malo jači zeleni odsjaj, a drugi je tek sada daveo znakove minimalnog sadržaja malvina. Kod pojedinačnih uzoraka komparirali smo boju koja je bila u različitim nijansama. Istovremeno smo ih uspoređivali s vinom koje je sadržavalo 2⁰/₀, 3⁰/₀ i 4⁰/₀ hibrida »klinton« br. 5. Zeleni odsjaj fluorescencije bio je kod svih prirodnih uzoraka niži od vina u kome je bilo 2⁰/₀ hibrida. Briljantno zelenu fluorescenciju daju neki hibridi i to br. 4, 5, i 6 (vidi tabelu br. 2). Poslije dužeg stajanja zelena se fluorescencija postepeno mijenja u modrikastu, pa, iako je jakost fluorescencije stabilna, preporučujemo da se detekcija izvrši još istog dana.

Po osjetljivosti, opisana nitritna metoda može se, doduše, smatrati jednaka njemačkoj zvaničnoj metodi, ali ju u pogledu brzine i praktičnosti izvođenja daleko premašuje. Preporučujemo zato da ju kontrolni laboratoriji usvoje kao upotrebljiviju i brzu metodu. Francuska zvanična metoda (5), koja predstavlja za praktičan rad, doduše, dosta prikladan papirhromatografski postupak, koji se pokazao u našim uvjetima rada nedovoljno osjetljiv. Do toga zaključka došli smo već u ranijim istraživanjima (8), a to je potvrdila i komparacija odre-

denih postotaka hibrida u kojoj su sudjelovali drugi enološki laboratoriji. Utvrdivanje vrijednosti dozvoljenog postotka hibrida dosta je problematično. Zato bi trebalo provjeriti postupak za kvantitativno određivanje malvina u vinima fluorimetričkim mjerenjima u opisanom nitritnom postupku Bieberu.

Dok se kontrolni laboratoriji u zemlji ne osposobe za takva mjerenja, bilo bi veoma korisno bar da se dogovore koja se granična vrijednost određenog hibrida još tolerira u vinu. Možda bi trebalo, da vino s toleriranim postotkom hibrida, što bi služilo kao standard, priprema jedan laboratorij za potrebe svih laboratorija u zemlji.

ZAKLJUČAK

Nitritnom metodom Dorier i Verella ispitivali smo 32 uzorka prirodnih vina s različitih vinorodnih područja na eventualnu prisutnost diglukozida malvina. Zabilježili smo minimalno zelenu fluorescenciju kod pojedinačnih uzoraka vina sorte »Gamé«, »merlot«, »modre frankinje« i »kraškog terana«. Metoda je u praksi od velike vrijednosti zbog izvanredne brzine, jednostavnosti i osjetljivosti.

SUMMARY

By the nitrite method (Dorier and Verella) 32 samples of genuine wines from different wine growing regions have been examined on the potential presence of the malvidin dyglucoside. A slightly green fluorescence has been observed with the individual wines samples of the varieties Gamé, Merlot, Blue Frankish, and the Carst Teran. This method is of great value for the practice because of its speediness, simplicity and sensitivity.

LITERATURA

1. DORIER P. et VERELLE L.: Nouvelle methode de recherche des diglucosides anthocyaniques dans les vins. Ann. des Fraudes et de l'Exp. Chim., No 669 Jan.-Febr. str. 1-10 (1966)
2. GAROGLIO P. G.: Progressi tecnici nell'enologia: Rivista Agricoltura, n. 9- settembre (1965)
3. GENTILINI L.; Cappelleri G.: A proposito della sofisticazione con vini di I. P. Rivista di Vitico e di Enol. conegliano. N. 11-nov. (1966).
4. RASQUILNO RAPOSO M.: — Buletin de L' O. I. V., 427, str. 1051, 1966.
5. Methodes officieles d'analyses des vins et des mouts. Journal officiel Nr. 63-154, 1963.
6. BIEBER H.: Die fluorimetrische Bestimmung von Malvin in Traubenmost und Wein. Deutsche Lebens.-Rundschau, No 2, febr. str. 44-46, (1967)
7. TERCELJ D. i PINTAR J.: Diferencijacija plemenitih i hibridnih crnih vina s teritorija SR Slovenije pomoću papirne hromatografije — Arhiv za poljopr. nauke sv. 57, str. (142-157), 1964.
8. PINTAR J.: Papirhromatografska istraživanja antocijana u crnim vinima V. V. i hibrida vinorodnog bazena Svetozarevo—Kruševac—Aleksandrovac. „Agronomski glasnik“ br. 6 (1964), str. 401-411.
9. ZAMORANI A., PIFFERI P. G.: Contributto alla conoscenza della sostanza colorante dei vini Rivista di Vitic. e di Enol., Conegliano, n. 2, str. 85, 1964.