

Inž. Jana Pintar,\*  
Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

**PAPIRKROMATOGRAFSKA ISTRAŽIVANJA ANTOCIJANA U CRNIM  
VINIMA VITIS VINIFERE I HIBRIDA VINORODNOG BAZENA  
SVETUZAREVO—KRUŠEVAC—ALEKSANDROVAC**

Posljednjih godina mnogo se proširilo istraživanje bojenih materija u crnim vinima i njihovo identificiranje zahvaljujući kromatografskim analitičkim postupcima. Kod dokazivanja prisutnosti crnih hibrida u vinu *Vitis vinifera*, sa sigurnošću se primjenjuju papirkromatografske metode, koje baziraju na utvrđivanju prisutnosti antocijana-diglukozida. Diglukozidi pod utjecajem ultravioletne svjetlosti daju ružičastu do crvenkastonarančastu fluorescenciju.

Studije P. Ribereau — Gayona (1954) o antocijanima sa jedno i dvodimenzionalnim papirkromatografskim postupcima i s elektroforezom osnova su za sva istraživanja metodike dokazivanja hibrida u vinu *Vitis vinifera*. Njegova bitna konstatacija je, da su bojene materije vina *Vitis vinifera* samo monoglukozidi antocijanozida, dok se u hibridnom vinu nalaze pored monoglukozida i diglukozidi uz veće učešće diglukozida.

U novije doba su autori Biol, Michel, Foulonneau (1962) utvrdili, da neke sorte *Vitis vinifera* sadrže peonidol, 3,5 diglukozid, dok malvidola 3,5 diglukozida u čistim sortama *Vitis vinifera* nema. On se nalazi samo kod hibrida. Prema Bieberu (1963) kod vina sorte »Gamé« naišli su na tragove malvina. Zamorani i Pifferi (1964) su kod kvalitativnog i kvantitativnog istraživanja antocijana u vinu sorte »merlot« ustanovili tragove diglukozida malvina.

I u pogledu upotrebljivosti i osjetljivosti različitih metoda za dokazivanje hibrida, autori su također različitog mišljenja. Harvalia (1961) navodi, da su kod nekih grčkih vina *Vitis vinifera*, radeći po njemačkoj zvaničnoj metodi D-S-B (1961) pronašli diglukozid malvina, zbog čega preporučuje za suha vina korištenje ascendentne metode s rastvaračem n-butanol-2n HCl. Garglio (1962) navodi, da su različiti istraživači ustanovili po metodi D-S-B neodređene fluorescentne mrlje slične malvinu, koje mogu dovesti do pogrešnog zaključivanja. On preporučuje metodu Harvalie. Weger (1963) daje vrlo pozitivnu ocjenu o njemačkoj zvaničnoj metodi zbog lijepe separacije monoglukozida od diglukozida kao i jake osjetljivosti. Međutim, kod intenzivno obojenih vina je utvrdio, da se monoglukozidi dovoljno ne separiraju. Na Rf vrijednosti malvina ostaje slaba tamnoružičasta fluorescencija koja ponekad liči na fluorescentne tragove malvina.

Brojni autori — Rentschler, Tanner i Brunner (1961), Cappelleri (1963), Sudario — Barbero (1963) objavili su svoje nove ili modificirane kromatografske postupke za dokazivanje hibrida, koje još nismo provjerili.

Pitanje utvrđivanja prisutnosti hibrida u crnom vinu i ružicama sorte »prokupac« postalo je vrlo aktuelno u vezi s izvozom ovog vrlo traženog vina u zapadne zemlje. Kod kontrolnih analiza ustanovili smo neobjašnjenu pri-

\* Najljepše zahvaljujemo drugu Ivanu Rožancu za izvanrednu tehničku suradnju.

sutnost jače ili slabije crvenonarančaste fluorescencije diglukozida malvina u vinu »prokupac«. Proizvođači toga vina su tvrdili, da je vino sortno čisto, tj. da potječe od plemenite vinove loze »prokupac«. Postojala je, dakle, sumnja da ta sorta sadrži određenu količinu malvidin diglukozida. Osim pronalaženja rješenja ovog problema, željeli smo u našim istraživanjima doći i do vlastitih rezultata o opravdanosti prigovora nekih autora na suvišnu osjetljivost njemačke zvanične metode.

#### METODIKA RADA

Uzorke grožđa<sup>1</sup> smo uzimali sami za vrijeme berbe (od 28. septembra 1963. god.) iz vinograda i privatne i društvene svojine u rajonu koji obuhvaća Varvarin, Suboticu kod Kruševca, Aleksandrovac, Rataje, Trstenik i Svetozarevo. Uzorci »plavog burgundca«, »merlota« i »gamea« uzeti su sa društvenih imanja. Ponegdje smo pronašli različite, za nas nepoznate, varijacije »prokupca«. U Subotici kod Kruševca i u Aleksandrovcu naišli smo na rodnu lozu francuskog hibrida Couderc 503 (»sitna otela«). Svaki trs je nosio po nekoliko malih grozdića (od 5—10) karakterističnih sitnih bobica. Te grozdiće smo spojili u jedan uzorak.

U Svetozarevu (siokovačko vinogorje) smo uzeli uzorak nepoznate crne sorte *Vitis vinifera* (degenerativnog habitusa) s karakterističnim crvenkastim i djelomično deformiranim listićima oštrih zubaca a velikim i rijetkim grozdićima i manjim bobicama.

Uzorke smo odmah muljali i ruljali, a kljuk smještali u dvolitrene boce. Na boce smo zbog preventive stavili vrelnu piljke s vodom.

Kljuk je djelomično već provrio putem, a djelomično u laboratorijskom podrumu. Poslije 10 dana svaki uzorak smo posebno cijedili i ostavili da vino potpuno provrije.

Kad se vino poslije tihog vrenja iščistilo (u decembru 1963. god.) počeli smo s analizama bojenih materija po slijedećim metodama:

1. njemačka zvanična metoda: Diemair—Sengewald—Bieber (u daljem tekstu oznaka D-S-B, 1961)
2. modificirana njemačka zvanična metoda: Diemair—Postel—Sengewald (u daljem tekstu oznaka D-P-S, 1963)
3. francuska zvanična metoda: Jaulmes—Ney (1960)
4. rastvarač n butanol-2n HCl po ascendentnoj metodi: Harvalia (1961).

Obzirom na prigovore stručnjaka raznih zemalja, da je njemačka zvanična metoda iz 1961. god. preosjetljiva, spomenuti autori su modificirali tu metodu tako, da su smanjili koncentraciju bojenih materija vina od deset na pet puta i tačno precizirali upotrebu i jačinu standarda malvina. Kako se ove dvije metodike njemačke zvanične metode razlikuju samo u navedenim tačkama, dajemo u daljem tekstu samo modificiranu metodu D-P-S 1963. u skraćenom obliku s nekim našim primjedbama.

<sup>1</sup> Posebno zahvaljujemo poduzeću »Slovenija vino« Ljubljana za njihovu znatnu finansijsku pomoć kod ovog istraživanja i vinogradarima koji su nam s mnogo susretljivosti i razumijevanja izlazili u susret kod uzimanja uzoraka.

# PAPIRKROMATOGRAFSKI DOKAZ CRVENIH BOJENIH MATERIJA HIBRIDA

(cirkularna papirna kromatografija)

## I. Reagensi

### 1. Malvin klorid, čisti<sup>2</sup>

Ekstinkcija po propisu pripremljene 0,0025% otopine malvinklorida treba da bude između 0,58 i 0,59, mjereno u 0,5 cm kiveti kod 520 um prema destiliranoj vodi.

2,5 mg čistog kristaliziranog malvin klorida<sup>3</sup> izvažemo na mikrovagi i potpuno rastvorimo u 10 ml čistog metanola. Otopinu prelijemo u 100 ml odmjernu tikvicu i dopunimo je sa 0,5 n HCl do oznake.

Čisti kristalizirani malvin klorid je upotrebljiv više godina, ako ga čuvamo u tamnoj dobro zatvorenoj prostoriji.

U rastvorenom stanju upotrebljivost malvin klorida je ograničena.

2. »Ponceau 6 R, naročito čist« = »živežna namirnica, crveno 1«. 3. n-butanol za kromatografiju; 4. 96% glacijalna octena kiselina za kromatografiju; 5. aceton, čisti DAB 6; 6. metanol, čisti; 7. 10% otopina olovnog (II) acetata p.a.; 8. 0,5 n solna kiselina; 9. 2 n solna kiselina.

## II. Aparatura

Dvije jednako velike staklene posude (Petri), unutrašnjeg promjera 23,5 cm, visine 3 cm; jedna Petrijeva posuda za primitak rastvarača, oko 8,5 cm promjera i 1,5 cm visine.

## III. Kromatografski papir

Schleicher & Schüll 2043 b Mg1.<sup>4</sup> Normalni arak (58x60 cm) rasjekli smo na 4 jednaka dijela. U sredini kromatografskog papira takve veličine napravili smo rupicu od 4,5 mm promjera koja može primiti oko 4 cm visoki stijenj za dovođenje rastvarača.

Stijenj je pripremljen od trake istog papira veličine 4 x 7,5 cm, koju savijemo.

## IV. Rastvarač

n-butanol-glacijalna octena kiselina — voda 6:2:3. (V : V : V). Rastvarač je upotrebljiv oko 8 dana.

## V. Otopina malvin klorida za uspoređivanje

Opisanu 0,0025% otopinu malvin klorida možemo upotrebljavati kao standardnu otopinu, ako propisno izmjerena ekstinkcija nije manja od 0,54. Za svakodnevnu upotrebu možemo pripremiti manju količinu standardne otopine bez mjerenja slijedećim postupkom: u epruveti rastvorimo nekoliko kristalića

<sup>2</sup> Malvin klorid, koji smo upotrebljavali, proizvod je firme »Fluka« A. G. Buchs SG; vjerujemo da odgovara svim zahtjevima koje autori traže. Zahtjevi su opisani u literaturi.

<sup>3</sup> Za naše uvjete smo pripremili 0,0025% otopinu malvin klorida na taj način, da smo odvagali oko 1,5 mg malvin klorida u 25 ml odmjernu tikvicu i dodali odgovarajuću količinu metanola i solne kiseline. Do ekstinkcije 0,59, mjerene na fotometru »Unican« kod 520 um, razrjeđivali smo solnom kiselinom samo 5 ml ove otopine po prikazanoj formuli. Ostatak nam je kasnije služio za daljnja razrjeđivanja po potrebi.

<sup>4</sup> Kod nekih uspoređivanja smo upotrebljavali papir Whatman 1 kod kojeg je postupak brži za oko 90 minuta.

čistog malvin klorida (oko ¼ mg) u nekoliko kapi čistog metanola. Dodavanjem 0,5 n solne kiseline svodi se koncentracija malvin klorida na oko 40 mg/l. Preporučuje se dodavanje solne kiseline u kapima biretom.

Da li koncentracija otopine malvin klorida iznosi oko 40 mg/l najbolje ćemo ocijeniti ako je usporedimo sa 0,0050% vodenom otopinom boje Ponceau 6 R<sup>5</sup>, koju imamo u drugoj epruveti istog promjera. Kad smo postigli jednaku boju izmjerimo ekstinkciju otopine malvin klorida u provjerenom fotometru kod 520 um uz upotrebu 0,5 cm kivete prema vodi. Iz ekstinkcijske vrijednosti E, koju smo utvrdili na taj način, izračunamo pomoću navedene formule koliko je ml 0,5 n solne kiseline potrebno dodati na 1 ml ove otopine, da bi došli do 0,0025% standardne otopine malvin klorida:

$$\text{ml } 0,5 \text{ n HCl} = \frac{E - 0,58}{0,58}$$

#### VI. Postupak

Kad 25 ml vina ili groždanog soka, koji smo stavili u čašu za centrifugiranje veličine 50 ml, dodamo 5 ml 10% vodene otopine olovnog (II) acetata, promiješamo staklenim štapićem i centrifugiramo oko 3—5 min. kod 3000 o/min. Dobivenu čistu tekućinu prebacimo u čašu za centrifugiranje iste veličine. Ostatku postepeno dodamo 5 ml vode (u dijelovima) centrifugiramo na isti način i opet gornji sloj tekućine prelijemo u drugu čašu. Toj tekućini dodamo toliko 25 postotne otopine amonijaka p. a. (oko 10 kapi) dok ne reagira uočljivo alkalično. Zatim tekućinu ponovo promiješamo i centrifugiramo. Gornji sloj tekućine, koja je praktički bezbojna, odbacimo. Talog pomiješamo sa 10 ml čistog metanola i centrifugiramo. Nakon odbacivanja metanola talog pomiješamo sa 10 ml čistog acetona i još jednom centrifugiramo. Aceton odbacimo i ostatak sušimo u vakuum eksikatoru<sup>6</sup> oko 1 sat, da bi se aceton potpuno osušio. Ostatak staklenim štapićem trljamo do suhog praha. Ovome dodamo 2 ml 2 n solne kiseline i miješamo staklenim štapićem dok ne nestanu svi tamno obojeni dijelovi. Po dodavanju 3 ml 50% čistog metanola sadržaj dobro promiješamo i ponovo centrifugiramo. Gornji sloj čiste otopine damo u mali cilindar sa brušenim čepom.

0,02 ml tako pripremljene otopine (koja odgovara 0,1 ml polazne otopine) nanesimo mikropipetom na kromatografski papir u razmaku 2 cm od središta lista na kojem je već označena početna tačka. Kod nanošenja otopine moramo paziti, da se ona na markiranoj početnoj tački ne proširi više od 4 mm, tako da promjer startne mrlje nije širi od 8 mm. Istovremeno nanosimo i 0,02 ml standardne otopine na isti način. Ukupno nanosimo 4 otopine (3 otopine koje istražujemo i standardnu otopinu). Vrijeme kretanja navedenog rastvarača traje oko 5 sati. Rastvarač ne treba sasvim doseći rub staklene posude. Različite temperature u radnoj prostoriji mogu dati nešto više ili niže razlike. R<sub>f</sub> vrijednost malvin klorida iznosi 0,4 do 0,45 od startne tačke. Kromatogram sušimo u hladnoj uzdušnoj struji i posmatramo pod UV svjetiljkom (366 um) koja se treba uključiti najmanje 10 minuta ranije. Osim

<sup>5</sup> 0,0050% otopina Ponceau je u tamnoj boci kod normalne sobne temperature u potrebljiva više mjeseci. Ekstinkcija otopine crvenog Ponceau iznosi 0,50, mjerena pod istim uvjetima kao standardna otopina malvin klorida.

<sup>6</sup> Sušenje u običnom eksikatoru traje duže, oko 3 sata.

toga, važno je da list kromatograma stoji neko vrijeme pod svjetiljkom. Malvin poznajemo po blještavo-ciglastocrvenoj do narančastocrvenoj fluorescentnoj zoni, sa Rf vrijednošću standardne otopine. Prisutnost crvenog hibridnog vina je utvrđena, ako je fluorescencija toliko jaka kao kod standardne otopine ili ako je jača od njene.

Kako je francuska zvanična metoda J-N. 1961. — rastvarač Britton-Robinson — u praksi istraživanja bojenih materija crnih hibridnih vina više poznata i jednostavnija za izvođenje, nećemo ju opisivati. Naš rad se ni u čemu nije bitno razlikovao od načina rada koji je opisan u literaturi.

Kod metode Harvalia upotrebljava se isti rastvarač kao kod cirkularne metode po Bieberu: n-butanol-2n HCl u omjeru 1 : 1. Jednake volumne dijelove naznačenih reagensa promiješamo u lijevku za izmućkavanje i odjeljivanje, a kao rastvarač upotrebljavamo samo gornju organsku fazu (upotrebljivost oko 15 dana). Postupak i razvitak operacije sličan je kao u francuskoj metodi.

Koristeći sve tri opisane metodike analizirali smo 29 uzoraka vina *Vitis vinifere* i dva uzorka hibrida, a od toga 12 uzoraka »prokupca« (među njima i 4 varijacije) 3 uzorka »plavog burgunca«, 3 uzorka »gamea«, a ostale sorte vidljive su iz tabele br. 1.

## REZULTATI ISPITIVANJA

Fluorescentni pokazatelji istraživanih uzoraka vina *Vitis vinifere* prikazani su u tabeli 1. Posmatrajući te podatke uočavamo, da kod ispitivanja po francuskoj zvaničnoj metodi nijedan od istraživanih uzoraka plemenite vinove loze nije pokazivao crvenkasto-narančastu fluorescenciju. Kod svih uzoraka »prokupca« bila je zapažena slaba violetna fluorescentna mrlja na Rf vrijednosti diglukozida.

Kod ispitivanja po njemačkoj zvaničnoj metodi D-S-B 1961, tri uzorka »prokupca« pokazuju tragove violetnarančaste fluorescencije na Rf vrijednosti diglukozida, dok uzorak nepoznate crne sorte degenerativnog habitusa iz Svetozareva daje isti intenzitet fluorescencije kao standard malvina. Isti intenzitet fluorescencije smo pronašli kod jednog uzorka »gamea« (Rataje).

Mogućnost pojavljivanja fluorescencije kod te sorte opisuje i Bieber (1963). Tragove fluorescencije diglukozid malvina ustanovili smo i kod uzorka »plavog burgunca«, »gamea« iz Trstenika, »začinka« i »merlota«. Kod »merlota« je zapažena mrlja s fluorescencijom crvenkaste boje, koja međutim nije oštro ograničena, kao što uvijek biva kad posmatramo mrlje na Rf vrijednosti diglukozida. Zamorani i Piferi (1964) su kod »merlota« pronašli po bidimenzionalnoj metodi tragove fluorescencije malvina.

Ispitivanja po modificiranoj njemačkoj zvaničnoj metodi D-P-S 1963 kod koje se bojene materije koncentriraju samo 5 puta, pokazuju se uočljivi tragovi fluorescencije diglukozida kod jednog uzorka varijacije »prokupca« i kod uzorka nepoznate crne sorte degenerativnog habitusa. Tragovi fluorescencije su vidljivi i kod dva uzorka sorte »gamea« i kod uzorka »začinka«. Intenzitet te fluorescencije je osjetljivo manji od preciziranog standarda malvina.

Po metodi Harvalia nađeni su tragovi fluorescencije samo kod uzorka »Game« iz Rataje. Jaka osjetljivost i jednostavnost postupka prednosti su tog postupka kod suhih vina, ali je teško uspoređivanje postotaka hibrida u vinu prema standardu malvina po m. D-P-S.

Tabela 1.

Fluorescentni pokazatelji ispitivanih crnih vina sorata *Vitis vinifera*  
 Fluorescence indexes of the investigated red wines of the *Vitis vinifera* varieties

Red. broj No	Sorta — Provinjencija (selo ili zaselak) Variety — Origin	M e t o d e Methods			
		Franc. zvanična French official	Njemačka zvanična German official		m. Harvalia
			D-S-B 1961.	D-P-S 1963.	
		fluorescencija malvina fluorescence diglucoside malvin			
		Rf 0,32	Rf 0,42		Rf 0,04
1.	Prokupac — Krnjevo	nema + <sup>1</sup>	nema	nema	nema
2.	Prokupac — Varvarin	"	"	"	"
3.	Prokupac — Aleksandro- vac (Borje)	"	"	"	"
4.	Prokupac (varijacija) Aleksandrovac (Borje)	"	"	"	"
5.	Prokupac (varijacija »osipač« — Subotica (Žleginjje)	"	"	"	"
6.	Prokupac — Subotica k. Kr. (Velika njiva)	"	"	"	"
7.	Prokupac — Subotica (Palep, Stružnjak)	"	+ tragovi <sup>2</sup>	"	"
8.	Prokupac — Subotica (Varina)	"	nema	"	"
9.	Prokupac (varijacija) — Subotica (Žleginjje)	"	++ jači <sup>3</sup> tragovi	+ tragovi	"
10.	Prokupac (var. »osipač«) — Subotica k. Kr.	"	nema	nema	"
11.	Prokupac — Rataje	"	"	"	"
12.	Prokupac — Trstenik (pl. Gačić)	"	"	"	"
13.	Prokupac — Svetozarevo (siokovačko vinogorje)	"	"	"	"
14.	Nepoznata crna sorta — degenerativnog habitusa — Svetozarevo siokovačko vinogorje)	"	+++ fluor. <sup>4</sup> nalik na st. malvina	+ (- +) tra- govi (jači)	"

+ Nema crvenkastonarančaste fluorescencije, a kod svih prokupaca zapažena je violet fluorescencija u tragovima.  
 No red-orange fluorescence; with the Prokupac variety violet fluorescence in traces has been formd.

<sup>1</sup> nema, ang. none

<sup>2</sup> tragovi — traces

<sup>3</sup> jači tragovi — stranger traces

<sup>4</sup> fluorescencija nalik na st. malvina — fluor. silar to stand. malvin

(Nastavak tabele 1)

Red. broj No	Sorta — Provinjenca (selo ili zaselak) Variety — Origin	M e t o d e M e t h o d s			
		Franc. zvanična French official	Njemačka zvanična German official		m. Harvalia
			D-S-B 1961.	D-P-S 1963.	
fluorescencija diglukozida malvina fluorescence diglucoside malvin					
		Rf 0,32	Rf 0,42	Rf 0,04	
15.	Prokupac — Svetozarevo (rasadnik)	„	+ tragovi	nema „	
16.	Plavi portugizac — Aleksandrovac (poljopr. škola)	„	nema	„ „	
17.	Plavi burgundac — Rataje	„	„	„ „	
18.	Plavi burgundac — Trstenik (pl. Gačić)	„	+ tragovi	„ „	
19.	Plavi burgundac — Svetozarevo (rasadnik)	„	nema	„ „	
20.	Merlot — Rataje (Svračak)	„	+ tragovi crvenkaste fl <sup>5</sup>	„ „	
21.	Gamé — Trstenik (pl. Gačić)	„	+ tragovi	+ (- +) tra- govi (slabi) <sup>6</sup> „	
22.	Gamé — Svetozarevo (rasadnik)	„	nema	nema „	
23.	Gamé — Rataje (2 god. nasad)	„	+++ fluor. nalik na st. malvina	+ (- +) tra- govi (jači) + tragovi slabi	
24.	Začinak — Aleksandro- vac (Borje)	„	++ jači tragovi	+ tragovi nema	
25.	Nepoznata stara sorta — Subotica (Živkovića)	„	nema	nema „	
26.	»Mekiš« domaći naziv sorte — Subotica	„	„	„ „	
27.	Alikan Buše — Aleksan- drovac (Polj. škola)	„	„	„ „	
28.	Muškat Hamburg — Svetozarevo	„	„	„ „	
29.	Plovdina — Varvarin	„	„	„ „	

<sup>5</sup> tragovi crvenkaste fluor.  
reddish fluor. traces<sup>6</sup> tragovi (slabi) — traces  
(slight)

Osim uzoraka plemenite vinove loze ispitali smo i dva uzorka nađenih hibrida (tab. 2). Kod uzorka rodnog hibrida Couderc 503 (domaći naziv »sitna otela«) zapazili smo vanredno jak intenzitet tamnocrvene fluorescencije diglukozida malvina. U želji da utvrdimo koliko je procentualno potrebno dodati ovog intenzivnog hibrida u vino »prokupac«, da bi se prema standardu malvina vino moglo smatrati za hibridno pozitivno, izveli smo pokuse s najmanjim dozama dodatog hibrida.

Tabela 2

Istraženi uzorci nađenih hibrida  
Examination of hybrid samples found

Rastvarači Solutions	Fluorescentni pokazatelji uzoraka Fluorescence indexes of samples	
	Couderc 503 (»sitna otela«) iz Subotice i Aleksandrovcia	Otela iz Smedereva
	diglukozid malvidina dyglucoside malvidin	
Britton-Robinson Francuski zvanični metod (J., N.) French official method	vanredno jaka tamno- ciglastocrvena fluorescencija <sup>1</sup> Rf 0,43	vrlo intenzivna ciglastocrvena fluorescencija <sup>2</sup> Rf 0,33
n-butanol-octena-voda Njemačka zvanična metoda (D-P-S) 1963) German official method	" Rf 0,30	" Rf 0,42
n-butanol-2n HCl metod Harvalia method Harvalia	" Rf 0,06	" Rf 0,04

Prema rezultatima, koji su dobiveni metodom D-P-S 1963. već možemo, ako vinu »prokupac« dodamo oko 0,3% ovog vrlo intenzivnog hibrida, zaključiti da postoji pozitivna reakcija na hibride.

Na osnovu tih rezultata mogli bismo dati i odgovor na problem postavljen u tom radu o uzroku pojavljivanja hibridne fluorescencije u vinima »prokupac«. Odstranjivanjem ovih rijetkih ostataka hibridne rodne loze nestale bi i smetnje oko pojavljivanja fluorescencije diglukozida malvina u vinu sorte »prokupac«.

U tabeli 3 prikazane su Rf vrijednosti antocijana i fluorescencija izračunatih u prosjeku posebno za svaki od tri analitička postupka.

\* Ova fluorescencija je kod svih opisanih metoda jako proširena na kromatogramu.  
This fluorescence is with all methods wide-spread on the chromatogram.

<sup>1</sup> Extremely dark brick-red fluorescence.

<sup>2</sup> Very intense brick-red fluorescence.



Tabela 3.

## Rf-vrijednosti antocijana

Rf values of anthocyan

Papir	Bojene materije	Ascendentna metoda Ascendent method	m. Harvalia	Kružna kromato- grafija Circular chroma- tography
Paper	Colored matter	Francuska zvan. met. French official meth.		Njemačka zvan. met. German official meth.
Schleicher, Schüll 2043 b Mgl <sup>1</sup>	monoglukozi monoglucosides	iznad start linije (do oko 3 cm) Above the start line (up to 3 cm approx.)	0,14 (± 3)	0,50 (± 0,06)
	diglukozi dyglucosides	0,30 (± 0,05)	0,04 (± 3)	0,41 (± 0,06)
	žutonarančasta fluorescencija <sup>2</sup> Yellow-orange fluorescence	0,42 (± 0,05)	—	0,55 (± 0,05)

Kod uspoređivanja osjetljivosti pojedinih metoda i rastvarača, koje smo upotrebljavali u istraživanju, ustanovili smo da Britton-Robinson puno zaostaje za rastvaračima ostalih dviju metoda. Tek kod 4% hibridnog vina »klintona« u vinu »prokupac« zapazili smo jedva vidljivu fluorescentnu mrlju diglukozi malvina po francuskoj zvaničnoj metodi.

## ZAKLJUČAK

Kod crnih vina sorte *Vitis vinifera* koje su proširene u vinorodnom području Svetozarevo—Kruševac—Aleksandrovac, vršili smo papirkromatografska istraživanja bojenih materija po francuskoj metodi Jaulmes-Ney, po njemačkoj metodi Diemair—Postel—Sengewald 1963. Diemair—Sengewald—Bieber 1961. i po metodi Harvalia.

Dvadeset i devet uzoraka vina vlastite vinifikacije ispitivali smo na eventualnu prisutnost diglukozi malvina. Analizirajući uzroke njemačkom zvaničnom metodom D-P-S 1963. pronašli smo kod jednog uzorka varijacije »prokupac«, kod uzorka nepoznate crne sorte degenerativnog habitusa, kod

<sup>1</sup> Kromatografski papir Whatman 1 pokazuje vrlo slične Rf vrijednosti.

The chromatographie paper Whatman 1 shows very similar Rf values.

<sup>2</sup> Ponekad je fluorescencija crvenkasta (kod »merlota«) ili pak zelenkaste do violet, nijanse kod »prokupac«. Kod francuske zvanične metode javlja se mjesto ove žutonarančaste fluorescencije svijetlosmeđa mrlja koja ne fluorescira.

Fluorescence is sometimes reddish (with »Merlot«) or of greenish to violet hue (With »Prokupac«). With the French official method, instead of the yellow-orange fluorescence a light brown stain appears without fluorescence.

dva uzorka »gamea« i uzorka »začinak« tragove narančastovioletne fluorescencije. Kod svih tih uzoraka daje metoda D-S-B 1961. ili jake tragove fluorescencije ili pak fluorescenciju koja dosiže jačinu standarda malvina.

Kod uzimanja uzoraka pronašli smo u vinogradima i dvije rodne loze francuskog hibrida Couderc 503 (domaći naziv »sitna otela«). Prilikom ispitivanja toga uzorka zapažena je tako intenzivna fluorescencija diglukozida malvina da već dodatak oko 0,3% vina ovog intenzivnog hibrida u vino »prokupac« daje pozitivnu hibridnu reakciju jednaku standardu malvina. Odstranjivanjem ovih rijetkih ostataka rodne hibridne loze nestale bi i smetnje oko pojavljivanja fluorescencije diglukozida malvina u vinu sorte »prokupac«.

Uspoređivanjem navedenih metoda dolazimo do zaključka, da je metoda D-P-S 1963. osjetljiva, sigurna a dugotrajna metoda Harvalia (za suha vina) je osjetljiva, efektivan rad dosta brži ali tačnost utvrđivanja toleriranog postotka eventualno prisutnog hibrida je manja, dok je francuska metoda Jaulmes-Ney nedovoljno osjetljiva ali prednost joj je u jednostavnosti postupka.

PAPER CHROMATOGRAPHIC INVESTIGATION OF ANTOCYAN IN RED  
VITIS VINIFERA WINES AND HYBRIDS OF THE WINE GROWING  
REGION SVETOZAREVO—KRUSEVAC—ALEKSANDROVAC

by

*Jana Pintar,*

Agricultural Institute of Slovenia, Ljubljana

SUMMARY

With the red wines of the *Vitis vinifera* variety, that are widely grown in the region Svetozarevo—Kruševac—Aleksandrovac, paper chromatographical investigations of antocyan were carried out by the French Jaulmes-Ney method, the German Diemair—Sengewald—Bieber 1961. method, the Diemair—Postel—Sengewald 1963, and the method Harvalia.

Twenty-nine wine samples of our laboratory vinification were investigated on the potential presence of the malvidin dyglucoside. When analyzing by the German official D-P-S 1963 method, traces of an orange-violet fluorescence have been found with one sample of the »Prokupac« variation, one sample of an unknown black variety of a degenerative habitus, and also with two samples of the »Game« and one sample of the »Začinak« variety. With all these samples the D-S-B 1961 method has given either intense traces of fluorescence or a fluorescence reaching the intensity of the malvidin standard.

At sampling grape vines, two productive hybrid vines of the French hybrid Couderc 503 (called locally »sitna otela«) have been found in the vineyards. When a sample of the two vines was investigated, malvidin dyglucoside fluorescence of such intensity has been observed that an addition of approximately 0,3% of this intensive hybrid's wine to the »Prokupac« produced a positive hybrid reaction similar to that of the malvidin standard. By elimination of these rare remainders of productive hybrid vines any trouble with the malvidin dyglucoside fluorescence in the »Prokupac« wine would also disappear.

By comparison of the above methods the following conclusions can be made: The D-P-S 1963 method is sensitive and reliable, but rather lengthy. The Harvalia method (for dry wines) is sensitive, effective work fast enough, though the accuracy in determining the tolerated % of the possibly present hybrid is less reliable. The French Jaulmes-Ney method is less sensitive but has the advantage of a simple procedure.

#### L I T E R A T U R A

1. Biber H.: Probleme des Nachweises von roten Hybridenfarbstoffen das Weinblatt. Neustadt, No 33/34, 832—836, 1963.
2. Biol, Michel, Foulonneau: La Chromatographie des matieres colorantes des vins rouges. Repercussions pratiques. Vignes et Vins, n. 113 oct. 1962.
3. Cappelleri G.: Nuovo metodo per svelare la presenza di ibridi produttori nei vini. Rivista di Viticoltura e di enologia, Conegliano n. 2, 43—48, 1963.
4. Diemair, Postel, Sengewald: Untersuchungen über Anthocyane, insbesondere über das Malvin. Zeitschrift für Lebens mittel-Untersuchung und Forschung 4, n. 3, 173—189, 1963, Bundesgesundh-Blatt. No. 8, S. 125 (1963).
5. Diemair, Sengewald, Bieber metod: Nachweis von roten Hybridenwein und- most. Bundesgesundheitsblatt, Nr. 2, 26—27, 1961.
6. Garoglio P. G.: Nuovi metodi proposti per la ricerca di sostanze coloranti derivati da ibridi produttori ed altre attualita enochimiche. Rivista di Viticoltura e di enologia, Conegliano n. 6, 187—199, 1962.
7. Harvalia A.: Détection des vins des hybrides rouges par chromatographie sur papier; Chimica Chronika, 26 A, 180, 1961.
8. Jaulmes, Ney: Recherche des vins d'hybrides rouges par chromatographie de ia matiere colorante. Annales des Falsifications et de l'Expertise Chim. n. 616, str. 180, 1960.
9. Rentschler H, Tanner H., Brunner M.: Mitteilungen Lebensmitt. Untersuch. Hyg. 52, 312 (1961).
10. Ribereau-Gayon P.: Etude de la matiere colorante des raisins, rouges: application a la différenciation des cépages et des vins. Annales des Falsifications et des Fraudes 1954 — N. 551—552.
11. Sudario ,Barberi: La ricerca cromatografica del vino di ibridi produttori nei vini da Vitis vinifera. Rivista di Viticoltura e di enologie, Conegliano n. 9, 336—340, 1963.
12. Weger B.: Le zone »simil-dimalvosidiche« nella ricerca chromatographica dei colorante derivati da ibridi produttori diretti. Rivista d Viticoltura e di enologia, Conegliano n. 10, 383—385, 1963.
13. Zamorani, Pifferi: Contributo alla conoscenza della sostanza colorante dei vini. Rivista di Viticoltura e di enologia, Conegliano 2, 1964.