

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Analýza vybraných parametrů a skupin látek ve víně

Bc. Šárka Oplíštilová

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Šárka Oplíštilová**
Osobní číslo: **C16617**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Analýza vybraných parametrů a skupin látek ve víně**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. V teoretické části diplomové práce se zabývejte charakteristikou vína, zaměřte se zejména na jeho chemické složení. Popište nejvýznamnější skupiny látek přítomných ve víně včetně možností jejich stanovení. Podle nejnovější literatury nastiňte, kam se ubírají současné trendy v analýze vína.
2. Na základě rešerše navrhněte parametry a skupiny látek, které by bylo možné v experimentální části stanovovat. Vyberte významné a důležité parametry a ukazatele kvality vína a optimalizujte postupy a podmínky metod, kterými je budete stanovovat. Analyzujte bílá i červená vína a výsledky vzájemně porovnejte.
3. Všechny získané výsledky řádným způsobem zpracujte a komentujte. Dosažené výsledky diskutujte a porovnejte s doposud publikovanou literaturou.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Blanka Švecová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

11. května 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. 5. 2018

Bc. Šárka Oplíštilová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Blance Švecové, PhD. za ochotu a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým přátelům za podporu v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá stanovením několika vybraných parametrů a skupin látek ve vínech z České republiky. V teoretické části práce je popsáno chemické složení vína, stanovení jednotlivých látek a aktuální trendy v analýze vína. Její součástí je také popis kapalinové a plynové chromatografie. V experimentální části je popsána analýza 12 vín. Konkrétně se jedná o stanovení kyseliny vinné a celkové kyselosti vína alkalimetrickou titrací, jodometrické stanovení redukujících cukrů, spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity metodami s ABTS a DPPH radikály a celkového obsahu fenolických látek, dále stanovení fenolických látek, organických kyselin a anthokyanů pomocí kapalinové chromatografie a také stanovení několika vybraných těkavých látek pomocí plynové chromatografie.

Klíčová slova: víno, antioxidační aktivita, fenolické látky, organické kyseliny, anthokyany

TITLE: Analysis of selected parameters and groups of compounds in wine

ANNOTATION

This thesis deals with the determination of several selected parameters and groups of compounds in wines from Czech Republic. Chemical composition of wine, determination of selected groups of compounds and actual trends in analysis of wine are described in the theoretical part. It also includes a description of liquid and gas chromatography. The analysis of 12 wines is described in the experimental part. This part involves the determination of tartaric acid and total acidity of the wine by alcalimetric titration, iodometric determination of reducing sugars, spectrophotometric determination of antioxidant activity by methods with ABTS and DPPH radicals and the total content of phenolic compounds, determination of phenolic compounds, organic acids and anthocyanins by liquid chromatography as well as determination of several selected volatiles compounds by gas chromatography.

Keywords: wine, antioxidant activity, phenolics compounds, organic acids, anthocyanins

Seznam zkratek

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AQC	6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát
C18	Oktadekan
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)
GAE	Ekvivalentní množství kyseliny galové (Gallic Acid Equivalent)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (Gas Chromatography - Flame-Ionization Detector)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Gas Chromatography - Mass Spectrometry)
GF-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s grafitovou pecí (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HS-SPME	Mikroextrakce tuhou fází z headspace prostoru (Headspace Solid Phase Microextraction)
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry)
LOD/ LOQ	Mez detekce/stanovitelnosti (Limit of Detection/Quantification)
MF	Mobilní fáze
NIR	Blízká infračervená oblast (Near Infrared)
NMR	Nukleární magnetická resonance
OPA	<i>O</i> -ftalaldehyd
PTFE	Polytetrafluorethylen
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction)
TEAC	Ekvivalentní množství Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TPC	Celkový obsah fenolických látek (Total Phenolics Compounds)

Obsah

Úvod	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Víno	10
1.1.1 Vinná réva.....	10
1.1.2 Výroba vína.....	11
1.1.3 Vinařství v České republice	12
1.2 Chemické složení vína	13
1.2.1 Alkoholy	14
1.2.2 Cukry	15
1.2.3 Organické kyseliny.....	16
1.2.4 Minerální látky	16
1.2.5 Fenolické látky.....	17
1.2.6 Aromatické látky	20
1.2.7 Dusíkaté látky	21
1.3 Analýza vína.....	22
1.3.1 Hodnocení zralosti hroznů	22
1.3.2 Hodnocení kvality vína.....	23
1.4 Chromatografické techniky.....	27
1.4.1 Kapalinová chromatografie.....	27
1.4.2 Plynová chromatografie.....	28
1.5 Trendy v analýze vína.....	29
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
2.1 Přístroje a zařízení	31
2.1.1 Kapalinový chromatograf s DAD detektorem	31
2.1.2 Kapalinový chromatograf s UV detektorem.....	31
2.1.3 Plynový chromatograf s FID detektorem	31
2.1.4 Další zařízení	31
2.2 Chemikálie a standardní látky	32
2.2.1 Chemikálie pro HPLC	32
2.2.2 Standardní látky pro HPLC a GC.....	32
2.2.3 Chemikálie pro ostatní stanovení	33
2.3 Analyzované vzorky	34

2.4 Pracovní postupy	35
2.4.1 Stanovení pomocí klasických analytických metod	35
2.4.2 Stanovení antioxidační aktivity	36
2.4.3 Stanovení celkového obsahu fenolických látek	37
2.4.4 Chromatografická analýza	38
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	41
3.1 Výsledky klasických analytických metod.....	41
3.1.1 Výsledky stanovení pH, celkové kyselosti vín a kyseliny vinné	41
3.1.2 Výsledky stanovení redukcí cukrů	42
3.2 Výsledky stanovení antioxidační aktivity	43
3.3 Výsledky stanovení celkového obsahu fenolických látek	46
3.4 Porovnání metod pro stanovení celkového obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity	47
3.5 Výsledky chromatografických analýz	48
3.5.1 Výsledky stanovení fenolických látek.....	48
3.5.2 Výsledky stanovení organických kyselin	54
3.5.3 Výsledky stanovení anthokyanů	58
3.5.4 Výsledky stanovení těkavých látek	61
4 Závěr	65
Seznam použité literatury	66
Seznam příloh	75

Úvod

Víno patří mezi oblíbené alkoholické nápoje. Typicky vzniká kvašením plodu révy vinné (*Vitis vinifera*). Z chemického hlediska se jedná o složitou směs mnoha látek. Jeho hlavními složkami jsou voda a ethanol. Nedílnou součástí jsou také cukry, organické kyseliny, glycerol, fenolické a minerální látky a mnoho dalších, které se společně podílejí na barvě a chuti vína.

Sledování zastoupení jednotlivých látek ve víně má význam především pro vinaře. Pro ně je důležitá analýza již před sklizní hroznů stejně jako v průběhu výroby vína či u finálního výrobku. Tyto poznatky jsou důležité pro kontrolu procesů výroby vína a také pro posouzení kvality. Analýza vína je důležitá také z hlediska autenticity.

Z pohledu konzumentů je zajímavé zejména sledování množství fenolických látek a s nimi spojené antioxidační aktivity. Ve víně se vyskytuje resveratrol, katechin, epikatechin, řada fenolických kyselin a mnoho dalších látek, které působí jako antioxidanty. To jsou látky působící proti volným radikálům, které jsou zodpovědné za vznik chronických onemocnění. Na druhé straně je však nutné pomýšlet také na negativní toxikologický vliv ethanolu.

K analýze vína se využívá mnoha tradičních titračních či spektrofotometrických metod. V dnešní době už je zcela běžné použití kapalinové chromatografie ve spojení se spektrofotometrickou detekcí nebo plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Trendem poslední doby je používání rychlých nedestruktivních metod bez složité úpravy vzorku.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Víno

Víno je tradiční alkoholický nápoj s velkým komerčním významem, získávaný fermentací hroznového moštu [1].

Víno provází lidstvo již od pradávna. Nejstarší důkaz o vinařství pochází z jižního Kavkazu z období 6 000 let př. n. l. Odtud se vinné hrozny začaly rozšiřovat do Mezopotámie, Palestiny a Egypta, až si postupně podmanily celé Středomoří. Naproti tomu v Severní Americe má vinařství relativně mladou historii. Španělští misionáři zde začali zřizovat vinice teprve před 250 lety. Od dob svého uvedení bylo víno přijato v mnoha kulturách a společnostech, stalo se součástí kulturních a náboženských událostí, ale především je vhodným doplňkem dobrého jídla, nebo jen nápojem, který lze sdílet s přáteli [2-3].

Víno lze klasifikovat z mnoha různých hledisek. Podle barvy se rozlišují vína červená, bílá a růžová. Dále lze víno definovat na základě sladkosti, obsahu alkoholu a oxidu uhličitého, podle odrůdy hroznů, fermentace a procesu dozrávání nebo zeměpisného původu [1]. Jedním z hledisek dělení může být také dělení na víno „odrůdové“ nebo „směsné“. Rozdílem je, že odrůdové víno je vyrobeno z jediné odrůdy hroznů, respektive dle zákona musí obsahovat minimálně 75 – 85 % uvedené odrůdy, zatímco směsné víno tvoří několik odrůd hroznů stejného ročníku. Kvalitou nejsou směsná vína horší než odrůdová, dokonce tomu může být naopak. Vinohradnictví, které používá směs odrůd, může být výhodnější a jednodušší, neboť charakteristiky různých odrůd se mohou vhodně doplňovat [4].

1.1.1 Vinná réva

Hrozny révy vinné, jakožto základní suroviny pro výrobu vína, se skládají z třapiny a bobulí. Bobulí tvoří slupka, dužnina a semena. Třapina je zdřevnatělá rostlinná struktura, která obsahuje velké množství polyfenolů. Slupka aromatických hroznů, jako je například Muškát, se vyznačuje přítomností polyfenolů (antokyany a katechiny) a aromatických sloučenin (terpeny). Pro dužninu jsou typické organické kyseliny (vinná, jablečná či citronová), cukry a v malém množství aromatické sloučeniny a polyfenoly [4].

Hrozny obsahují velké množství rozmanitých sloučenin a na jejich zastoupení má velký vliv půda, na které jsou pěstovány. Fyzikální a chemické vlastnosti půdy

ovlivňují růst révy i absorpci živin. Živiny jsou snadněji absorbovány z půd mírně alkalického až neutrálního pH. Koncentrace vápníku a draslíku spolu s půdními mikroorganismy mohou ovlivňovat obsah cukru a taninu ve vinných hroznech. Podobně půdy bohaté na fosfor a vápník podporují akumulaci cukru, tvorbu aromátů a antokyaninů. Také množství složek v rámci stejné odrůdy je ovlivněno vegetačním obdobím, ekologickými a klimatickými podmínkami, chorobami rostlin, typem půdy, zeměpisnou polohou i zralostí. V suchém podnebí má na růst vinné révy, velikost bobulí i výnos velký vliv zavlažování [5-6].

1.1.2 Výroba vína

Výroba vína, neboli vinifikace, zahrnuje proces od výběru hroznů vinné révy až po plnění lahví finálním produktem.

Hrozny se z vinic na severní polokouli sklízí od poloviny října do začátku listopadu, sklizeň na jižní polokouli probíhá od poloviny února do začátku března. Hrozny vinné révy, používané pro výrobu vína, musí být zdravé, bez napadení plísněmi či bakteriemi a výroba vína by měla být provedena co nejdříve od doby sklizně, aby se zabránilo vzniku vad u zdravých hroznů.

Prvním krokem výroby vína je drcení hroznů a výroba moštu. Během této činnosti se třapina oddělí od bobulí a po rozdrcení samotných bobulí vzniká rmut. Poté se přidávají kulturní kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, oxid siřičitý a živiny.

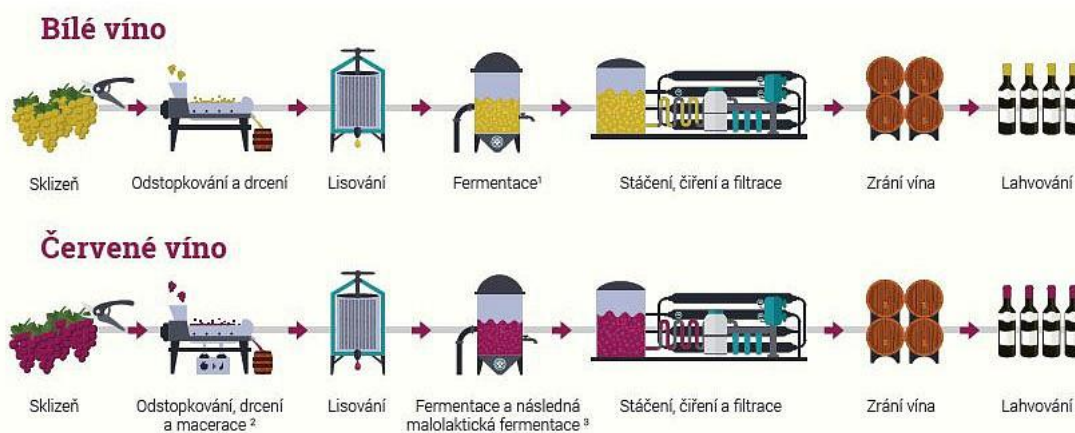
Oxid siřičitý má dvě funkce. Jednak inhibici přirozené mikroflóry moštu, čímž usnadní aktivitu přidaných kulturních kvasinek, dále inhibici oxidačních enzymů, které by způsobily změnu barvy až zhnědnutí.

Po 8 – 10 hodinách od inokulace kvasinkami začíná primární alkoholové kvašení, které trvá 8 – 10 dní. Během této doby kvasinky využívají cukry v moštu, množí se a vytvářejí oxid uhličitý a alkohol. Teplota během fermentace ovlivňuje chuť konečného produktu i samotnou rychlost procesu. Pro červená vína se používají fermentační teploty 25 – 28 °C, zatímco u bílých vín jen 20 – 25 °C. Během alkoholového kvašení vznikají i vedlejší produkty jako je glycerol, kyselina octová, vyšší alkoholy a acetaldehyd. Přítomnost těchto látek se podílí na výsledné kvalitě vína.

Rmut používaný pro výrobu červeného vína obsahuje slupky i semena a během alkoholového kvašení víno získává svou barvu a také tanin. Bílé víno kvasí

bezprostředně po oddělení moštu od slupek a semen. Rozdílný postup výroby bílého a červeného vína znázorňuje obrázek 1.

Po celkovém využití cukru může dojít k malolaktické neboli jablečno-mléčné fermentaci, což je proces používaný hlavně pro vína červená. Specifické kmeny bakterie *Oenococcus oeni* převedou kyselinu jablečnou na jemnější kyselinu mléčnou a dojde tak ke snížení titrační kyselosti a ke zvýšení pH. Tato fermentace může být provedena pouze tehdy, je-li pH vyšší než 3,2 a teplota vyšší než 20 °C. Malolaktická fermentace se provádí po dobu 2 – 4 týdnů, poté je víno převedeno do jiných nádrží pro finální zpracování vína, konkrétně čerění, filtraci a zrání [4,7-8].



Obrázek 1: Schéma výroby bílého a červeného vína; Převzato z: [7]

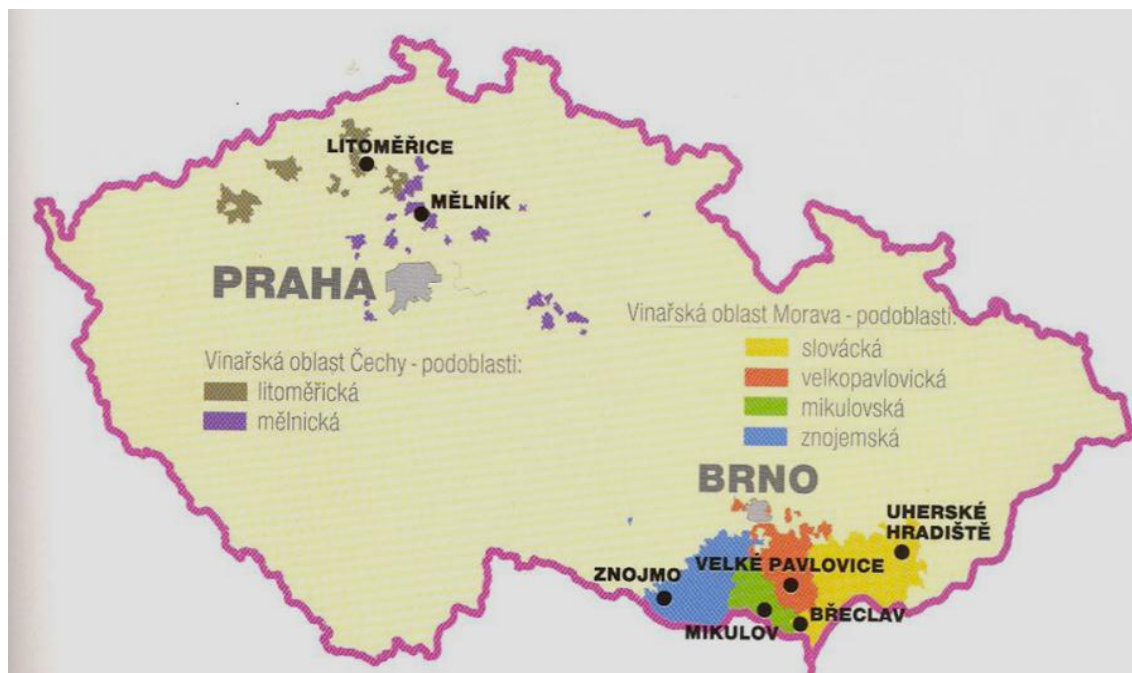
1.1.3 Vinařství v České republice

Sazenice révy vinné se na území Moravy dostaly v dobách římské kolonizace. Pěstování vinné révy i výroba vína se tak staly nedílnou součástí běžného života na našem území.

V České republice se nacházejí dva významné regiony pěstování révy vinné. Nazývají se vinařská oblast Morava a vinařská oblast Čechy. Vinařská oblast je charakterizována značně podobnou odrůdovou skladbou. Pod vinařskou oblast spadají vinařské podoblasti, které se vyznačují podobnou tradicí pěstování vinné révy společně s kulturními tradicemi, jsou si blízké i odrůdovou skladbou a charakteristickými vlastnostmi vína. Vinařskou oblast Morava tvoří čtyři vinařské podoblasti – Znojemská, Velkopavlovická, Mikulovská a Slovácká. Vinařská oblast Čechy se skládá ze dvou vinařských oblastí – Mělnické a Litoměřické. Mapa znázorňující rozložení vinařských podoblastí je na obrázku 2. Nejmenším regionálním

útvarem je vinařská obec. Takto je nazývána obec, v jejímž katastru je pěstována vinná réva na registrované vinici nebo viniční trati.

Celková plocha vinic v České republice zabírá více než 18 000 ha. Z pěstovaných odrůd bílého vína u nás převládá Müller Thurgau, Veltlínské zelené, Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský či Sauvignon. Mezi modrými odrůdami dominuje Svatovavřínecké, Frankovka, Zweigeltrebe, Rulandské modré a Modrý portugal [9-11].



Obrázek 2: Mapa vinařských oblastí a podoblastí v České republice; Převzato z: [12]

1.2 Chemické složení vína

Víno je složitá matrice, obsahující několik set sloučenin, přítomných v různých koncentracích. Zastoupení jednotlivých sloučenin závisí zejména na složení hroznů a následně na výrobě vína. Mezi dominantní složky patří voda, ethanol, glycerol, cukry, organické kyseliny a minerální látky. V nižších koncentracích lze nalézt i jiné alifatické a aromatické alkoholy, dále aminokyseliny a fenolické sloučeniny.

Poznatky o složení vína jsou důležité z mnoha důvodů. Analýza fenolických sloučenin má velký význam vzhledem k organoleptickým vlastnostem vína. Přítomné antokyany jsou zodpovědné za barvu červeného vína, kondenzované třísloviny za svíravost. Fenolické sloučeniny mají navíc antibakteriální a antioxidační účinky. Odrůda vinné révy, zeměpisný původ a rok výroby ovlivňují chuť vína i zastoupení aminokyselin a antokyanů [6,13-14].

1.2.1 Alkoholy

Jak v lékařství a biotechnologii, tak i v potravinářském průmyslu má analýza ethanolu velký význam kvůli jeho toxikologickým a psychologickým účinkům. Zejména ve vinařském průmyslu je významné souvislé sledování ethanolu a glukózy. Tyto parametry společně určují nejen kvalitu a zvláštní chuť vína, ale zejména v případě potřeby umožňují rychlý zásah do fermentačního procesu. Tato možnost dokáže předejít pozdějším ekonomickým ztrátám [15].

Na obsah **ethanolu** ve víně má největší vliv množství cukru v hroznech. S rostoucím obsahem cukru stoupá množství ethanolu vzniklého během alkoholového kvašení za přítomnosti kvasinek. Problém s obsahem ethanolu nastává u speciálních vín, která jsou sklížena delší dobu po dozrání, nebo se nechávají sesychat a tím dochází ke zvýšení cukernatosti [2].

Přítomnost ethanolu je nezbytná pro pozvednutí smyslových vlastností různých složek vína. Jeho nadměrné množství však může vyvolat vjem označovaný jako „horkost“ a může maskovat celkovou vůni a chuť vína. Trendem poslední doby se tak stala výroba vín s nižším obsahem alkoholu. Obsah alkoholu klasického stolního vína se obvykle pohybuje v rozmezí 9 – 15 objemových procent, ovšem naprostá většina vín obsahuje jen 11,5 – 13,5 % obj. ethanolu [2,16].

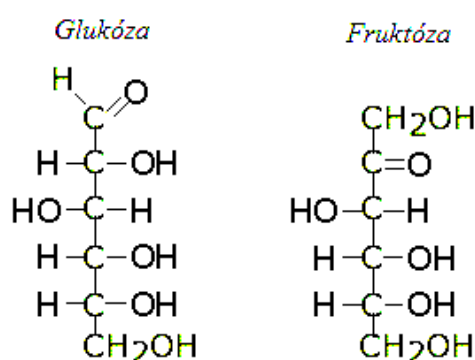
Glycerol je jedním z vedlejších produktů alkoholového kvašení. Je to bezbarvá, netěkavá sloučenina bez zápachu s vysoce viskózní povahou. Podílí se na plnosti chuti vína, ovlivňuje také jeho sladkost. V suchých a polosladkých vínech se nachází 5 - 14 g/l glycerolu. Červená vína mívají vyšší koncentrace glycerolu než vína bílá.

Vyšší alkoholy, známé také pod názvem přiboudliny, jsou sekundární metabolity kvasinek a mohou mít pozitivní i negativní dopady na chuť a aroma vína. Optimální hladiny vyšších alkoholů dodávají vínu příjemný ovocný nádech, zatímco nadměrné koncentrace mohou mít za následek nepříjemný ostrý zápach. Vyšší alkoholy lze rozdělit na aromatické a alifatické. Alifatické alkoholy zahrnují např. propanol, isoamylalkohol, isobutanol a amylalkohol. Z aromatických alkoholů se ve víně nalézají např. 2-fenylethylalkohol a 2-(4-hydroxyfenyl)ethanol [16].

1.2.2 Cukry

Cukry se řadí mezi esenciální složky vína nezbytné pro alkoholové kvašení. Množství fermentovaného cukru určuje hladinu alkoholu ve víně a také množství zbytkového cukru.

Hlavními fermentovanými cukry v hroznové šťávě jsou glukóza a fruktóza. Tyto monosacharidy mají stejný empirický vzorec, $C_6H_{12}O_6$, ale odlišnou strukturu, která významně určuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Rozdílná struktura glukózy a fruktózy je znázorněna na obrázku 3. Hroznové mošty obvykle obsahují stejné množství glukózy i fruktózy. Celkově to může být 160 – 300 g/l.



Obrázek 3: Struktura glukózy a fruktózy; Převzato z: [17]

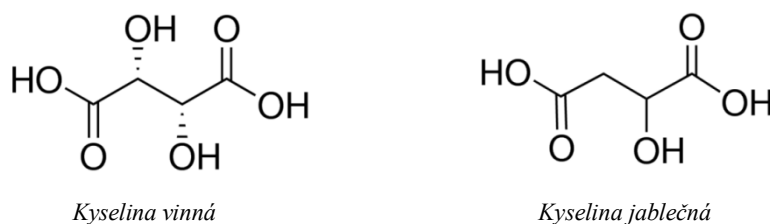
Oba monosacharidy jsou kvasinkami fermentovány za vzniku ethanolu, oxidu uhličitého, glycerolu a dalších sloučenin. Kvasinky však vykazují o něco větší preferenci ke glukóze než k fruktóze a tím se podstatně liší spotřeba obou cukrů během fermentačního procesu. Důsledkem je převaha fruktózy v posledních fázích fermentace, kdy jsou kvasinky vystavovány stresovým podmínkám z důvodu vysokého obsahu alkoholu a nedostatku dusíku. Kromě toho je fruktóza přibližně dvakrát sladší než glukóza, což způsobuje nežádoucí pocity sladkosti u suchých vín. Z těchto důvodů jsou pro vinařský průmysl zajímavé kvasinky s vyšší schopností fermentace fruktózy [18-19].

Koncentrace zbytkového cukru je měřítkem množství pevných cukrů v daném objemu vína po skončení fermentace a jakéhokoli přídavku cukru při výrobě vína sladkého. Množství zbytkového cukru se vyjadřuje v gramech cukru na litr vína nebo v procentech hmotnosti na objem [19]. Dle obsahu zbytkového cukru po dokončení fermentace jsou vína klasifikována do čtyř skupin. Jsou to vína suchá, která obsahují méně než 4 g/l cukru; vína polosuchá s obsahem 4 – 12 g/l cukru; polosladká vína

s koncentrací 12 – 45 g/l cukru a sladká vína, obsahující dokonce více než 45 g/l cukru [20].

1.2.3 Organické kyseliny

Víno obsahuje velké množství organických kyselin. Z organických netěkavých kyselin převládají kyseliny vinná a jablečná (obrázek 4), které tvoří až 90 % titrační kyselosti hroznové šťávy. V menším množství jsou ve víně zastoupeny také kyseliny citronová, mléčná, jantarová a ketokyseliny. Součástí vína jsou také těkavé kyseliny, charakteristické krátkým uhlíkovým řetězcem. Obsah těkavých kyselin ve víně se obvykle pohybuje v rozmezí 500 – 1000 mg/l. Toto množství odpovídá 10 – 15 % z celkového obsahu kyselin. Největší zastoupení, obvykle 90 % všech těkavých kyselin, zaujímá kyselina octová. Další dvě významné kyseliny jsou kyseliny propionová a hexanová, které jsou produkovány v důsledku metabolismu mastných kyselin kvasinkami a bakteriemi [16].



Obrázek 4: Struktura kyseliny vinné a jablečné; Převzato z: [21]

Titrační kyselost a hodnota pH jsou dány typem a koncentrací kyselin. Při určitých klimatických podmínkách může vzniknout nerovnováha kyselin. Stejný problém může být způsoben vznikem kyselých sloučenin v hroznech a jejich následnou fyzikální nebo mikrobiální modifikací během procesu výroby vína. Kyselost vína je tedy nutné sledovat a upravovat. Úpravu kyselosti vína lze provést přidáním kyseliny vinné, někdy i kyseliny jablečné a citronové, vždy v závislosti na právních předpisech země [16].

1.2.4 Minerální látky

Znalost obsahu některých minerálních látek ve víně je důležitá z několika hledisek. Sleduje se z důvodu vlivu těchto látek na zdraví člověka, kvůli možným toxikologickým rizikům, za účelem dodržení zákonných limitů a také pro jejich dopad na stabilitu vína. Minerální profil vín byl také zamýšlen jako možný „otisk prstu“, který

by mohl být použit pro charakterizaci vín podle jejich zeměpisného původu. Minerály jsou totiž nejvhodnějšími složkami pro selektivitu podle zeměpisného původu, protože přinášejí přímý vztah ke složení půdy, na které byla vinná réva pěstována.

Obsah minerálů je ovlivněn několika faktory. Přírodní zdroj hraje hlavní roli v celkovém příspěvku kovů ve víně a odráží geochemii půdy. Koncentrace minerálů je charakteristická a je ovlivněna zralostí hroznů, odrůdou hroznů, typem půdy a klimatickými podmínkami během růstu hroznů. Obsah kovů sekundárního původu je spojen s vnějším znečištěním révy během růstu nebo s různými fázemi výroby od sklizně až po lahvování a sklepení. Kontaminace hroznů během jejich růstu může pocházet z půdy nebo ze znečištění životního prostředí. Mezi antropogenní zdroje kontaminace patří aplikace pesticidů, fungicidů a hnojiv během vegetačního období hroznů. Tyto postupy vedou ke zvýšení množství prvků jako je arsen, kadmium, měď, mangan, olovo a zinek. Během výrobního procesu může dojít ke kontaminaci během dlouhodobého kontaktu vína s materiály, z nichž jsou vyráběny různé díly strojů, potrubí či sudů. Důsledkem bývá zvýšení obsahu hliníku, kadmia, chromu, mědi, železa nebo zinku [22].

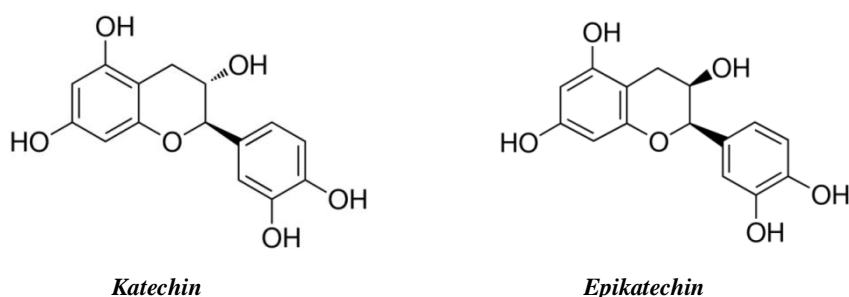
1.2.5 Fenolické látky

Zastoupení fenolických látek je důležitým aspektem vysoce kvalitních vín. Jedná se o rozmanitou skupinu sekundárních metabolitů rostlin, které se vyskytují jak v hroznech, tak ve víně.

Fenolické látky ve víně se obvykle dělí na dvě velké skupiny, flavonoidy a fenolické kyseliny. Flavonoidy tvoří více jak 85 % celkových fenolických složek červeného vína. Nejběžnějšími flavonoidy vína jsou flavonoly (kvercetin, kaempferol, myricetin), flavan-3-oly (katechin, epikatechin, taniny) a antokyany (kyanidin, malvidin, petunidin, peonidin). Mezi fenolické kyseliny patří deriváty kyseliny skořicové a kyseliny benzoové. Další menší skupinu fenolických látek představují stilbeny a glykosidy stilbenu, jejichž nejznámějším zástupcem je *trans*-resveratrol. Fenolické sloučeniny jsou zodpovědné za svíravost a hořkost a jsou nezbytné pro barevnou stabilitu vína. Fenolický profil vína je ovlivňován různými vinařskými postupy a technikami, ale zejména odrůdou vinné révy a oblastí, kde se pěstuje. Červené víno obvykle obsahuje více jak 500 mg flavonoidů v 1 litru vína, bílé víno obsahuje flavonoidů méně [1,3,6,23-25].

Kromě chuťových vjemů a barvy se fenolické sloučeniny vína vyznačují silnou antioxidační aktivitou. Jejich antioxidační účinek je dokonce silnější než vitaminů C a E. Jako pozitivum zmiňovaných antioxidantů je vyzdvižováno hlavně snížení rizika vzniku aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění [26].

Katechin a **epikatechin** jsou nejběžnější optické izomery nalézající se v přírodě. Katechin je pravotočivý a epikatechin jeho levotočivý izomer. Struktura těchto izomerů je vidět na obrázku 5. V červeném víně jsou převládajícími flavanoly [27].

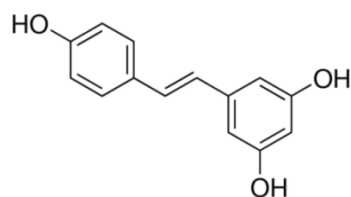


Obrázek 5: Struktura katechinu a epikatechinu; Převzato z: [21]

Mnoho studií se zabývá přínosem konzumace červeného vína ve spojení s obsahem katechinu. Vyzdvižován je jeho silný antioxidační účinek na lidský organismus. Podílí se na blokování nekontrolovaného růstu buněčných linií rakoviny prostaty a prsu. Katechin je pro zdraví velice přínosný, ačkoli se při procesu vinifikace do vína extrahuje pouze jeho část z celkového obsahu v hroznech.

Pro své blahodárné účinky je sledován také epikatechin, který má ochranný účinek na erytrocyty, zabraňuje lipidové peroxidaci a inhibuje agregaci krevních destiček [27].

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben), je fenolická sloučenina ze skupiny stilbenů, znázorněná na obrázku 6. Vyskytuje se jak ve slupce hroznů, tak v semenech. Pro vinnou révu i další rostliny slouží jako fytoalexin, látka sloužící k obraně proti fungicidním infekcím. Koncentrace *trans*-resveratrolu v červeném víně, která je jeho dominantní formou, se pohybuje v rozmezí hodnot 0,1 – 5 mg/l.



Obrázek 6: Struktura resveratrolu; Převzato z: [21]

Bylo prokázáno, že resveratrol reguluje metabolismus lipidů a inhibuje oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou a agregaci krevních destiček. Může poskytovat ochranu proti kardiovaskulárnímu onemocnění, má protizánětlivé a protinádorové účinky. Proto patří mezi nejlépe studované fenolické látky ve víně [1,28-30].

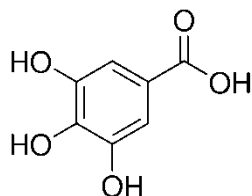
Taniny lze klasifikovat jako monomerní, oligomerní a polymerní flavan-3-oly neboli kondenzované třísloviny. Vyskytují se ve slupce a semenech hroznů a podílejí se na kvalitě vína. Přispívají k sensorickým aspektům, jako je barva, hořkost, svíravost a struktura vína. Vhodným přidáním enologického taninu před procesem fermentace lze pozitivně přispět ke stabilizaci barvy a zachování aroma během stárnutí červeného vína.

Taniny lze rozdělit do dvou skupin na kondenzované taniny, tzv. proanthokyanidiny, pocházející z hroznů a hydrolyzovatelné třísloviny, přítomné v dubu. Hydrolyzovatelné taniny pocházející z dubových sudů mají vyšší antioxidační aktivitu než některé taniny extrahované ze slupky nebo semen hroznů. Nadměrné přidávání exogenních enologických taninů však může mít za následek dramatický pokles celkového obsahu fenolických látek po alkoholovém kvašení a negativně ovlivnit pocit v ústech a strukturu vína [1,31].

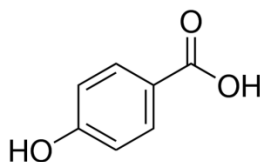
Fenolické kyseliny jsou důležité neflavonoidní sloučeniny přítomné v hroznech i ve víně. Zároveň patří k nejdůležitějším kvalitativním parametrům vína. Přispívají k vlastnostem jako je svíravost a hořkost. Fenolické kyseliny jsou sekundární rostlinné metabolity. Jedná se o hydroxylované deriváty kyselin benzoové a skořicové. Oba druhy derivátů mají svůj biosyntetický původ v aromatické aminokyselině L-fenylalaninu [32-33].

Nejběžnějšími deriváty kyseliny benzoové ve víně jsou kyselina galová, gentisová, *p*-hydroxybenzoová, protokatechuová, syringová, salicylová a vanilová. Tyto kyseliny se ve víně nacházejí především ve volné formě. V nejvyšších koncentracích lze nalézt kyselinu galovou. Ta nepochází pouze ze samotného hroznů, ale je také tvořena během hydrolýzy kondenzovaných taninů [34]. Mezi deriváty kyseliny skořicové patří např. kyselina kávová, chlorogenová, ferulová a *p*-kumarová. Některé významné kyseliny jsou zobrazeny na obrázku 7.

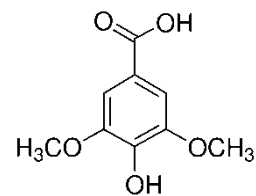
Obsah fenolických kyselin ve víně ovlivňuje nejen aromatickou rovnováhu, ale také chemickou stabilitu, pH a tedy i kvalitu vína. Proto je stanovení fenolických kyselin ve víně důležitá pro kontrolu kvality, stejně tak se stává nutností během procesu výroby vína [33].



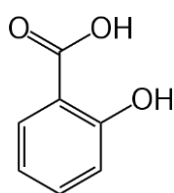
Kyselina galová



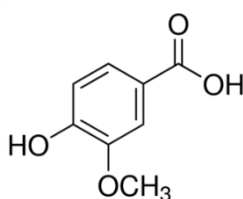
Kyselina p-hydroxybenzoová



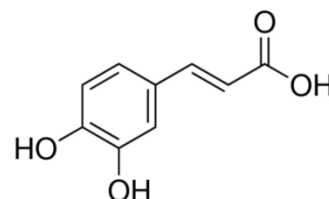
Kyselina syringová



Kyselina salicylová



Kyselina vanilová



Kyselina kávová

Obrázek 7: Struktura kyseliny galové, p-hydroxybenzoové, syringové, salicylové, vanilové a kávové; Převzato z: [21]

1.2.6 Aromatické látky

Aromatické látky ve víně jsou důležité zejména proto, že přispívají ke kvalitě výsledného produktu. Kombinací různých aromatických sloučenin, jako jsou alkoholy, estery, organické kyseliny, aldehydy, ketony či terpeny, vzniká charakter vína a odlišnost mezi jednotlivými druhy vína [35].

Rozmanitost aromatických sloučenin ve víně je obrovská a jejich koncentrace se pohybuje v rozmezí od několika ng/l po hodnoty v mg/l. Dominantní vliv na vůni vína mají vyšší alkoholy, kyseliny a estery. Tyto látky jsou důležité také pro ostatní smyslové vlastnosti a kvalitu vína. Nicméně ne všechny tyto sloučeniny přispívají k výslednému aromatu ve stejné míře. Příspěvek konkrétní sloučeniny souvisí s prahovým vnímáním vůně či zápachu, definovaným jako nejnižší koncentrace, která může být detekována čichem. Poměr mezi koncentrací a prahovou hodnotou aromatické látky umožňuje odhadnout přínos určité sloučeniny na aroma vína. Vedle aromatických sloučenin pocházejících z hroznů dochází také k jejich tvorbě během fermentace a stárnutí. Pro vinaře je proto nezbytné sledování aromatických látek již během fermentačního procesu [36-37].

Estery, důležité aromatické sloučeniny vína, se často vyskytují ve stopových množstvích. Celková koncentrace všech esterů obvykle nepřekračuje koncentraci 100 mg/l. Jsou důležité pro chuťový profil a mají často synergický účinek. Jelikož je většina esterů přítomna v koncentracích kolem jejich prahové hodnoty, mohou mít i drobné změny jejich koncentrace dramatický vliv na chuť vína.

Estery obecně vznikají reakcí alkoholu a kyseliny. Estery vína lze rozdělit do dvou skupin. Jednak ty, které vznikají enzymaticky, dále ty, které se tvoří během stárnutí vína chemickou esterifikací mezi alkoholem a kyselinami při nízkém pH. Enzymatická syntéza esterů je katalyzována esterázami a lipázami, které jsou produkovány mikroorganismy nebo alkoholovými acetyltransferázami. Mezi enzymaticky vytvořené estery patří ethylacetát, ethylbutanoát, ethylhexanoát či ethyloktanoát.

Díky svému složitému charakteru je víno vystaveno nepřetržitým změnám ve složení a to nejen během skladování, ale dokonce i po otevření lahve. Příčinou může být hydrolyza a esterifikace nebo oxidace esterů v souvislosti s hydroxylovými radikály [38].

1.2.7 Dusíkaté látky

Mezi důležité dusíkaté látky vína patří aminokyseliny a amoniové ionty. Jsou to esenciální růstové faktory pro správnou realizaci a růst kvasinek a bakterií během alkoholové a malolaktické fermentace. Dusík obsažený v aminokyselinách představuje 30 – 40 % celkového množství dusíku ve víně. Aminokyseliny přítomné v hroznovém moštu jsou využity jako živiny pro růst kvasinek a bakterií, jelikož slouží jako zdroj dusíku během fermentace. Množství aminokyselin závisí na odrůdě hroznů, regionu, roce sklizně a různých vinařských technologiích.

Biogenní aminy jsou též obsaženy v hroznovém moštu, některé navíc vznikají dekarboxylací svých prekurzorových aminokyselin v důsledku působení kvasinek během alkoholového kvašení, bakterií mléčného kvašení během malolaktické fermentace nebo jiných kontaminujících mikroorganismů. Polyaminy jako je agmatin, spermin a spermidin jsou pro zdraví člověka prospěšné, podílejí se na růstu a proliferaci buněk. Mohou být užitečné pro pacienty po operaci, při hojení ran a pro růst a vývoj novorozeneckého trávicího systému. Jiné aminy, konkrétně histamin, tyramin, 2-fenylethylamin, putrescin nebo kadaverin, mají na zdraví člověka negativní vliv. Pro citlivé jedince mohou být původcem nevolnosti, bolesti hlavy či dýchacích potíží.

Z tohoto důvodu některé země stanovily zákonné nebo doporučené limity koncentrací histaminu ve víně [39-41].

1.3 Analýza vína

Víno je složitou maticí mnoha látek. Sledování chemického složení hroznů a vín je zapotřebí k určení zralosti hroznů, ke kontrole procesů zpracování a stárnutí vína a také k analýze autenticity vína. Znalost obsahu jednotlivých látek je také zapotřebí pro výrobu vín s konstantní kvalitou [42].

1.3.1 Hodnocení zralosti hroznů

Významná je pečlivá kontrola kvality hroznů během dozrávání, zejména v pozdějších fázích, a při sklizni, neboť složení hroznů při sklizni je hlavním přispěvatelem pro budoucí kvalitu vína. Dozrávání hroznů je vinaři pečlivě monitorováno. Zakládá se na měření jednoduchých parametrů jako je cukernatost hroznů, hodnota pH, titrační kyselost, vizuální kontrola a kontrola chuti ovoce.

Nejdůležitějším a nejsnáze měřitelným parametrem je cukernatost. Lze ji měřit přímo na vinici pomocí ručního nebo stolního refraktometru, případně po vylisování moštu s použitím moštoměru. Cukernatost hroznů se měří ve stupních normalizovaného moštoměru (°NM). Tato stupnice udává množství cukru v kg na 100 litrů moštu. Hodnota cukernatosti, kterou lze upravit přidavkem řepného cukru nebo zahuštěného moštu, představuje potenciální obsah alkoholu ve víně.

K hodnocení zralosti se dále používá zjišťování obsahu kyselin, neboť odrážejí metabolickou aktivitu bobulí. Alkalimetrickou titrací se stanovuje celková kyselost. S obsahem kyselin, zejména poměrem kyseliny vinné a jablečné, souvisí také hodnota pH. Ta se v průběhu zrání hroznů mění v rozsahu 2,5 – 3,5 a měří se pomocí pH-metru. Hodnoty pH nad 4 mají negativní vliv na kvalitu hroznů z pohledu mikrobiální kontaminace či nestability barvy červených vín. Optimální hodnota pH moštů je nezbytná pro kvalitní průběh kvašení a rozvoj pozitivní mikroflóry, tuto hodnotu je možné upravit přidavkem kyseliny vinné.

Senzorické hodnocení hroznů se skládá z hodnocení bobulí na hroznu a detailního rozboru bobule, zahrnujícího pohled na slupku, dužinu i semena [20,43].

1.3.2 Hodnocení kvality vína

Kvalita vína se obecně hodnotí pomocí fyzikálně-chemických a sensorických vlastností. Běžně používané fyzikálně-chemické laboratorní testy pro charakterizaci vína zahrnují stanovení hustoty, obsahu alkoholu nebo hodnoty pH vína, zatímco sensorické testy se opírají především o dovednosti lidského vnímání. Z pohledu jakosti vína je nejdůležitější právě smyslové, neboli sensorické, hodnocení vína vyškoleným degustátorem. Základními aspekty sensorického hodnocení vína jsou vůně, vzhled a chuť. Specifickým znakem je tzv. flavour, které vzniká spojením chuťových a čichových vjemů z vína [44-45].

Stanovení alkoholu

Obsah alkoholu se vyjadřuje v objemových procentech (% obj.). Je to jeden z nejstarších parametrů, pro který byly vyvinuty kvantitativní analytické metody a dodnes se běžně stanovuje v laboratořích i potravinářských podnicích po celém světě, neboť označování alkoholických nápojů se stalo povinným v celé Evropské unii.

Původní referenční metodou pro stanovení obsahu alkoholu v lihovinách a vínu bylo pyknometrické stanovení hustoty. Tomuto stanovení předchází krok destilace, protože cukry a jiné rozpuštěné látky by vedly k falešným výsledkům, jelikož pro převedení hustoty na obsah alkoholu se používají tabulky, které jsou sestaveny pro směs čisté vody a alkoholu. Další zavedenou metodou byla elektronická denzitometrie, která se zakládala na elektromagneticky indukované oscilaci skleněné trubice tvaru U. Postupem modernizace byly zavedeny elektronické hustoměry.

Nejvhodnější metodou pro stanovení ethanolu v alkoholických nápojích je v současnosti plynová chromatografie. Dále se hodně používá infračervená spektroskopie (FTIR nebo NIR), která umožňuje stanovení alkoholu za méně než 2 minuty, a to bez složité přípravy vzorku, zejména pak destilace. Populární se stala také Ramanova spektroskopie, která přináší výhody rychlé a přesné analýzy, zejména pak stanovení množství ethanolu i methanolu [46-47].

Stanovení cukrů

Sledování obsahu cukrů je důležité zejména během výroby vína kvůli kontrole průběhu fermentačního procesu. Vývoj obsah cukru se dále sleduje během stárnutí vín. Základní metodou pro stanovení cukrů je redoxní (jodometrická) titrace. Možné je také použití kapalinové chromatografie, elektroforetických metod, průtokové injekční

analýzy nebo spektrofotometrických metod. Jako referenční metoda se používá FTIR analýza. Spektroskopie v blízké infračervené oblasti umožňuje sledovat homogenitu směsi nebo stanovit ukončení procesu kvašení. Je proto používána v řadě průmyslových odvětví, včetně vinařství [48-49].

Stanovení kyselin

Monitorování kyselin ve víně má zásadní význam pro kvalitu a řízení výroby ve vinařském průmyslu. Organické kyseliny hrají hlavní roli v mikrobiologické a fyzikálně-chemické stabilitě, podílejí se také na smyslových vlastnostech vína.

Nejběžnější je stanovení titrovatelných kyselin. Evropská standardní metoda je založena na potenciometrické titraci roztokem 0,1 M hydroxidu sodného do konečné hodnoty pH 7. U bílého vína lze jako alternativu použít bromthymolovou modř jako indikátor. Nicméně tato metoda je relativně nepřesná, jelikož koncový bod acidobazické titrace je pro každé víno odlišný. Skutečný koncový bod závisí na složení a koncentraci kyselin ve víně. Jelikož přítomné kyseliny jsou relativně slabé, skutečný konec titrace se obvykle pohybuje mezi pH 7,8 – 8,3.

Pro stanovení organických kyselin bylo vyvinuto také mnoho instrumentálních analytických metod. Nejrozšířenější technikou je HPLC, nejčastěji v systému s obrácenými fázemi nebo s využitím iontoměníčů a UV detekcí při 210 nm. Také se používá kapilární elektroforéza s přímou i nepřímou detekcí, která se vyznačuje rychlostí analýzy, jednoduchou přípravou vzorku či malou spotřebou vzorku a rozpouštědel. Využit lze také plynovou chromatografií nebo enzymatickou průtokovou injekční analýzu. Pro rychlý a hrubý odhad je možné použití komerčních kitů, které jsou založeny na papírové či tenkovrstvé chromatografii nebo na enzymatických metodách. Tyto kity slouží pro stanovení kyselin jablečné, citronové, octové, mléčné a jantarové [50-52].

Stanovení oxidu siřičitého

Mezi parametry podílející se na kvalitě vína patří také obsah oxidu siřičitého. Jeho používání ve vinařství je dáno jeho antibakteriálními a antioxidačními účinky či schopností eliminace nepříjemných pachů. Oxid siřičitý působí selektivně proti divokým kvasinkám, které pocházejí z hroznů nebo ze zařízení ve vinařství. Přidává se ve formě soli (disiřičitanu draselného), který se ionizuje v kyselém prostředí a uvolňuje plynný oxid siřičitý. Antiseptické a antioxidační účinky má pouze volný SO₂, jeho vyšší

koncentrace má však negativní vliv na zdraví konzumentů i na kvalitu vína, zejména na chuť.

Obsah oxidu siřičitého se stanovuje jako volný nebo celkový (volný + vázaný). Volná frakce (molekuly SO_2 a HSO_3^-) vypovídá o redukčních účincích a antimikrobiální stabilitě, celkové množství je nutné znát z bezpečnostních a právních důvodů. V závislosti na zemi a druhu vína se zákonné limity oxidu siřičitého pohybují v rozmezí 160 – 350 mg/l.

Ke stanovení se obvykle využívá jodometrické titrace po předchozím přidání NaOH k uvolnění vázaného SO_2 . Vedle klasické titrační metody, která je zdlohouhá a není dostatečně přesná a selektivní, byla snaha o zavedení i jiných metod stanovení. Kromě průtokových metod lze také použít stanovení pomocí GC-MS či ICP-MS [53-55].

Stanovení minerálních látek

Analýza minerálních látek ve víně se provádí za účelem stanovení zákonných limitů pro účely autenticity, monitorování stopových kontaminantů, monitorování obsahu některých solí kovů (vápníku, draslíku) a jako indikátor možných změn barvy a oxidace. Množství přítomných minerálů závisí na umístění vinic, dostupnosti prvků v půdě, podmínkách zpracování vína a na fermentačních postupech.

Ze spektroskopických metod je teoreticky možné použít blízkou infračervenou spektroskopii, která nabízí výhody rychlé analýzy s minimální přípravou vzorku, knihovna spekter by však musela obsahovat informace obrovského množství odrůd. Pro stanovení stopových množství se používají atomová absorpční spektrometrie s grafitovou pecí (GF-AAS) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). ICP-MS je nejcitlivější multielementární technika, která ale vyžaduje mineralizaci vzorku nebo použití elektrotermálního odpařování či laserové ablace. Naproti tomu GF-AAS je metodou jednoho prvku v daném okamžiku, ale umožňuje přímou analýzu pevných vzorků bez předchozích úprav [56-58].

Stanovení dusíkatých látek

Analýza aminokyselin a biogenních aminů je obtížná vzhledem k jejich rozdílným strukturám a nepřítomnosti specifického chromoforu. Proto se běžně derivatizují za účelem zlepšení detekčních limitů a pro odstranění interferencí matrice. Tyto látky se obvykle analyzují pomocí HPLC s využitím předkolonové

nebo postkolonové derivatizace. Často se využívá derivatizace pomocí fluorescenčních činidel (např. OPA, AQC), možná je také tvorba derivátů ninhydrinu, které absorbují ve viditelné oblasti. Ke stanovení těkavých derivátů aminokyselin lze použít plynovou chromatografii ve spojení s plamenově-ionizačním nebo hmotnostním detektorem (GC-FID, GC-MS) [39,59].

Stanovení aromatických látek

Co se týče analytického stanovení, nejčastěji využívanou technikou v laboratořích je HS-SPME (mikroextrakce tuhou fází z headspace prostoru) ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí. Kvantifikaci všech složek lze získat komplexní aromatický profil vína [60].

Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity

Obrovským zájmem je v poslední době sledování obsahu fenolických látek v potravinách. Důvodem je jejich působení proti volným radikálům, které jsou nežádoucí zejména kvůli jejich negativnímu vlivu na lidský organismus.

Fenolické látky jsou vedle cukrů a kyselin řazeny ke sloučeninám sloužícím k posouzení kvality hroznů, fermentačních moštů i finálních vín. Nejběžnějšími nástroji používanými pro analýzu fenolických látek ve vinařství jsou spektrofotometry. Externí laboratoře a velká vinařství často používají kapalinovou chromatografii a infračervenou spektroskopii.

Jednoduchou a rychlou metodou stanovení celkového obsahu fenolických látek je spektrofotometrická metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem, které tvoří směs fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny. Výsledky celkového obsahu fenolických látek se vyjadřují jako ekvivalent kyseliny galové [61-62].

Antioxidační aktivita fenolických látek je způsobena řadou mechanismů, nejčastěji se jedná o vychytávání volných radikálů nebo o reakci s přechodnými kovy. Mezi významné antioxidanty patří vitamíny C, E nebo karotenoidy, velký význam je v poslední době přikládán polyfenolickým sloučeninám, jejichž zdroji jsou např. zelenina, ovoce, čaje, léčivé rostliny a také víno.

Antioxidační aktivitu lze stanovovat pro jednotlivé frakce, tedy pro jednotlivé izolované látky vůči daným volným radikálům, nebo pro vzorek jako takový, obsahující směs různých antioxidantů, které své působení navzájem mohou ovlivňovat. Z tohoto pohledu byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita.

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity se využívají různé metody. V současné době je populární použití metod s radikály **DPPH**, **ABTS** či **galvinoxylem**, jejichž reakce s antioxidanty se sledují spektrofotometricky [63-67].

1.4 Chromatografické techniky

Následující dvě kapitoly jsou věnovány kapalinové a plynové chromatografii, které byly využity k analýzám vzorků vín v této diplomové práci.

1.4.1 Kapalinová chromatografie

Nejčastěji používanou technikou kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Separace sledovaných sloučenin, rozpustných v konkrétním rozpouštědle, se provádí za použití kapalné mobilní fáze a pevných stacionárních fází umístěných v kolonách.

Kapalinový chromatograf se skládá z čerpadel, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení-počítače.

Mobilní fáze může být tvořena mnoha kombinacemi rozpouštědel. Typicky je to voda s nějakou příměsí v kombinaci s organickou složkou. Čerpadlo přivádí do separačního systému mobilní fázi s konstantním, přesným a reprodukovatelným průtokem. Při HPLC se používají dva různé typy elučních režimů – izokratická a gradientová eluce. Izokratický režim eluce používá mobilní fázi konstantního složení po celou dobu analýzy. Naproti tomu při gradientové eluci se složení mobilní fáze mění podle předem nastaveného programu.

Z hlediska polaritý mobilní a stacionární fáze dělíme kapalinovou chromatografii na systém s normálními nebo obrácenými fázemi. Je-li stacionární fáze polárnější než mobilní fáze, hovoříme o tzv. systému s normálními fázemi. Pokud je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní, dělení probíhá v systému s obrácenými fázemi. V systému s obrácenými fázemi se retenční čas sloučeniny zvyšuje se snižující se polaritou dané látky. Klíčem k účinnému dělení je stanovení vhodného poměru mezi polární a nepolární částí mobilní fáze. Cílem je, aby se všechny sloučeniny eluovaly v co možná nejkratší době a zároveň umožňovaly rozlišení jednotlivých vrcholů pík.

K dávkování vzorku je přístroj vybaven šesticestným ventilem nebo automatickým dávkovačem. Do šesticestného ventilu se vzorek zavádí

za atmosférického tlaku speciální stříkačkou. Naplněná smyčka s konstantním objemem se po nadávkování otočí do polohy tak, aby jí začala protékat mobilní fáze a vzorek byl unášen na kolonu. Automatický dávkovač umožňuje volbu objemu dávkovaného vzorku a také vylučuje chybu lidského faktoru.

Kolona pro HPLC je obvykle tvořena trubicí z nerezové oceli o délce 50 – 250 mm a průměru 1 - 4,6 mm. Nejběžnější náplní kolony je oxid křemičitý modifikovaný skupinami C18. Stacionární fázi v koloně může tvořit také kapalina, vázaná na pevný nosič. Složky vzorku se rozdělují na základě jejich odlišných interakcí se stacionární fází. Mechanismy odpovědné za distribuci dělených látek mezi fázemi zahrnují povrchovou absorpci, iontovou výměnu, relativní rozpustnost a vlivy stericke.

Detektor pro HPLC, umístěný za kolonou, musí zaznamenat přítomnost různých složek vzorku, ale nesmí detekovat rozpouštědlo. To je důvod, proč neexistuje univerzální detektor, který by mohl být použit pro jakékoliv separace. Ideální detektor pro HPLC by měl mít vysokou citlivost, univerzální nebo specifickou odezvu, široký lineární dynamický rozsah a stabilní odezvu s teplotou a průtokem mobilní fáze. Nejčastěji používané detektory ve spojení s HPLC jsou spektrofotometrické, fluorescenční, hmotnostní a elektrochemické detektory. Relativně nové je spojení HPLC s NMR detektorem. To umožňuje identifikaci a kvantifikaci čistých složek vzorku ihned po jejich separaci pomocí HPLC.

Výstupem analýzy je chromatogram, který znázorňuje jednotlivé píky separovaných složek vzorku. Doba mezi dávkováním vzorku a jeho elucí z kolony se označuje jako retenční čas. Ten umožňuje identifikaci dané látky. Ke kvantifikaci slouží plocha píku [68-71].

1.4.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je separační technika schopná rozdělovat složité směsi látek v závislosti na rozdílech v bodě varu a polaritě. Využívá inertní plynnou mobilní fázi a kapalnou nebo pevnou stacionární fázi. Požadavkem na vzorek je udržení určitého stupně stability při teplotě potřebné pro převedení látky do plynného stavu a žádná reakce se složkami stacionární nebo mobilní fáze.

Plynová chromatografie se dělí do dvou podtříd podle druhu stacionární fáze. Jednou z nich je GSC (chromatografie plyn – pevná fáze), kdy je stacionární fáze tvořena pevnou látkou. Tento typ plynové chromatografie je vhodný pro separaci

trvalých plynů a uhlovodíků s nízkým bodem varu. Druhou podtřídou plynové chromatografie je GLC (chromatografie plyn – kapalina).

Plynový chromatograf je složen z přívodu nosného plynu z centrálního rozvodu nebo z tlakové lahve s příslušnými tlakovými regulátory a průtokoměry, dávkovacího systému, separační kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Dávkování, kolona a detektor jsou umístěny v termostatu, neboť musí být temperovány na určité teploty.

Nosným plynem je obvykle stálý plyn s nízkou nebo zanedbatelnou adsorpční kapacitou. Běžně je to dusík, hélium, vodík nebo argon. Povaha nosného plynu může ovlivnit separační charakteristiky systému a může změnit citlivost detekce. Nutností je také stabilní a reprodukovatelný průtok nosného plynu.

Kolony používané v plynové chromatografii mohou být náplňové nebo kapilární. Náplňovou kolonu tvoří kovová nebo skleněná trubice v délce 0,5 – 4 m, naplněná malými částicemi, které jsou často potaženy tenkou vrstvou polymeru s vysokou molekulovou hmotností. Stacionární fáze může být také kapalina definovaných vlastností. Kapilární kolona je dlouhá 10 – 100 m, zhotovená nejčastěji z taveného křemene s velmi malým vnitřním průměrem v rozmezí 0,2 – 0,5 mm. Vnitřní povrch kapilární kolony pokrývá tenká vrstva stacionární fáze. Chromatografická kolona je buď udržována při konstantní teplotě, tehdy hovoříme o režimu izotermické separace, nebo můžeme teplotu na koloně měnit podle nastaveného teplotního programu, kdy využíváme tzv. teplotní gradient.

K detekci analytů lze použít několik detektorů. Běžně využívané jsou: plamenově-ionizační detektor, detektor elektronového záchytu, detektor tepelně-vodivostní nebo hmotnostní. Výstupem analýzy je chromatogram, znázorňující intenzitu signálu v závislosti na čase [68,72-73].

1.5 Trendy v analýze vína

Epidemiologické studie naznačují, že dostatečný přísun antioxidantů by mohl pomoci v boji proti účinkům reaktivních druhů kyslíku a tím snížit rizikové faktory pro chronická onemocnění. Velký význam vína je tedy přikládán vysokému obsahu polyfenolů, které vykazují významné antioxidační vlastnosti. Řada studií se proto dnes zabývá stanovením antioxidačních vlastností vín zejména s ohledem na obsah polyfenolů. Pro hodnocení antioxidační aktivity se používají spektrofotometrické i chromatografické metody. Novým způsobem je použití elektrochemických biosenzorů,

které ve srovnání s jinými metodami nevyžadují specifické reagenty. Výhodou je také přenosnost zařízení, která umožňuje kontroly prováděné přímo v prostorách vinařství. Také vinařský průmysl vyžaduje spolehlivé metody kvantifikace fenolických sloučenin v průběhu výroby vína. Pro tyto účely se zdá být vhodná infračervená spektroskopie, která je nedestruktivní, snadno proveditelná a hlavně rychlá [74-75].

Pro vinaře je ideální získat i další relevantní informace o složení vína v průběhu fermentace, aby mohli případným zásahem upravit výsledný produkt. Pro stanovení organických kyselin (jablečná, citronová, octová, mléčná a jantarová) slouží komerční kity. Ty však umožňují pouze hrubý odhad množství analytu, proto je ve snaze také zde nalézt využití biosenzorů na bázi laktát oxidázy, sarkosin oxidázy či směsi fumarázy a sarkosin oxidázy [50].

Obrovský zájem v analýze vína, stejně jako u mnoha jiných potravin, je o sledování množství reziduí pesticidů. Seznam povolených pesticidů a jejich maximální limity reziduí (MRL) se v jednotlivých zemích liší. V Evropské unii limity reziduí pesticidů ve víně regulovány nejsou, nicméně je obecně uznáváno doporučení Mezinárodní organizace pro révu vinnou a víno, která stanovuje pro hrozny určené k vinifikaci 10% MRL pesticidů. Pro kontrolu reziduí ve víně se nejčastěji využívá spojení kapalinové nebo plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, často s předchozím krokem přípravy vzorku v podobě extrakce či mikroextrakce na tuhé fázi (SPE, SPME) nebo metodou QuEChERS [76-78].

Ani výslednou chuť a vůni vína nelze odvodit pouze z jeho chemického složení. Pro kontrolu jakosti vína je nezbytná ochutnávka speciálně vyškoleným sensorickým panelem, tedy skupinou hodnotitelů. Předmětem zkoumání se stává umělý analytický panel, který by nahradil roli člověka. Nezbytnou podmínkou takového zařízení je detekce velkého spektra sloučenin a poskytnutí komplexní informace o vzorku. Návrhem jsou tzv. elektronické jazyky nebo elektronické nosy. Jestli někdy zcela nahradí lidský faktor, to je však otázkou budoucnosti [79].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Kapalinový chromatograf s DAD detektorem

Fenolické látky ve vzorcích vína byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu 1290 Infinity od výrobce Agilent (Palo Alto, CA, USA), skládající se z vysokotlaké binární pumpy, termostatu, degaseru, autosampleru a DAD detektoru. K separaci látek byla použita kolona Ascentis express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μm) od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR).

2.1.2 Kapalinový chromatograf s UV detektorem

Pro analýzu organických kyselin a anthokyanů ve víně byl použit kapalinový chromatograf od firmy TSP (Thermo Separation Products, nyní Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Přístroj se skládal z degaseru DG 3014 (Ecom, Praha, ČR), pump Spectra System P 2000, autosampleru Spectra Series AS 100 a detektoru Spectra System UV 3000. Látky byly separovány na koloně Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm) od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA).

2.1.3 Plynový chromatograf s FID detektorem

Ke stanovení těkavých látek ve víně byl použit plynový chromatograf vyrobený firmou Shimadzu (Kyoto, Japonsko), vybavený FID detektorem a kapilární kolonou Supelcowax 10 (15 m x 0,32 mm; 0,5 μm film PEG) od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Dále byly použity tlaková lahev s vodíkem (Linde Gas, Praha, ČR) a vzduch a dusík z centrálního rozvodu.

2.1.4 Další zařízení

- Analytické váhy ABT 220-4M (Kern&Sohn, Balingen, Německo)
- Laboratorní váhy Kern 440-33N (Kern&Sohn, Balingen, Německo)
- Spektrometr Hélios γ (Thermo Spectronic, Corston, UK)
- Digitální pH metr Schott GC 842 (Schott Glas, Mainz, Německo)
- Automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- Mikrostříkačka Hamilton 200 μl (Hamilton Co., Reno, Nevada, USA)
- Filtrační zařízení na mobilní fázi (Duran, Wertheim, Německo)

- Membránové filtry mobilní fáze (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Stříkačkové filtry PTFE 0,45 µm (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Elektrický vařič (ETA, Praha, ČR)
- Magnetické míchadlo (IKA, Staufen, Německo)
- Běžné laboratorní nádobí

2.2 Chemikálie a standardní látky

2.2.1 Chemikálie pro HPLC

- Acetonitril (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Kyselina octová (99,8%, Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina sírová (≥96%, Penta, Chrudim, ČR)
- Octan amonný (≥99%, Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Redestilovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)

2.2.2 Standardní látky pro HPLC a GC

- **Fenolické látky:** katechin (≥98%; M_R : 290,27 g/mol), kyselina galová (≥99%; M_R : 170,12 g/mol), kyselina kávová (≥98%; M_R : 180,16 g/mol), kyselina ferulová (≥99%; M_R : 194,18 g/mol), kyselina *p*-kumarová (≥98%; M_R : 164,16 g/mol), protokatechaldehyd (≥97%; M_R : 138,12 g/mol), vše od Sigma-Aldrich, Praha, ČR.
- **Organické kyseliny:** kyselina vinná (≥99%; M_R : 150,09 g/mol), kyselina jablečná (≥99,5%; M_R : 134,09 g/mol), kyselina mléčná (≥85%; M_R : 90,08 g/mol), kyselina citronová (≥99,5%; M_R : 192,12 g/mol), kyselina jantarová (≥99,5%; M_R : 118,09 g/mol), vše od Sigma-Aldrich, Praha, ČR a kyselina octová (≥99%; M_R : 60,05 g/mol) od Penta, Chrudim, ČR.
- **Anthokyany:** delfinidin-3-*o*-glukosid (≥95%; M_R : 500,9 g/mol), kyanidin-3-*o*-glukosid (≥96%; M_R : 484,82 g/mol), malvidin-3-*o*-glukosid (≥95%; M_R : 528,87 g/mol), vše od Extrasynthese, Lyon, Francie.
- **Těkavé látky:** ethyllaktát (≥98%; M_R : 118,13 g/mol), kyselina hexanová (≥98%; M_R : 116,16 g/mol), methanol (≥99,9%; M_R : 32,04 g/mol), pentanol (≥99%; M_R : 88,15 g/mol), vše od Sigma-Aldrich, Praha, ČR; ethylacetát (≥99,7%; M_R : 88,11 g/mol), isoamylalkohol (≥99%; M_R : 88,15 g/mol), *n*-propylalkohol

($\geq 99,9\%$; M_R : 60,09 g/mol), ethanol ($\geq 96\%$; M_R : 46,07 g/mol), vše od Lach-Ner, Neratovice, ČR; hexanol ($\geq 99\%$; M_R : 102,16 g/mol), isobutanol ($\geq 99,5\%$; M_R : 74,12 g/mol), vše od Reachim, Moskva, Rusko a *n*-butanol ($\geq 99\%$; M_R : 74,12 g/mol) od Penta, Chrudim, ČR.

2.2.3 Chemikálie pro ostatní stanovení

- Syntetický radikál DPPH[•] (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Syntetický radikál ABTS^{•+}, tablety 10 mg, (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Činidlo dle Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (Fluka, Buchs, Švýcarsko; M_R : 250,29 g/mol)
- Kyselina galová ($\geq 99\%$; Sigma-Aldrich, Praha, ČR; M_R : 170,12 g/mol)
- Peroxodisíran draselný ($\geq 99\%$; Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Uhličitan sodný (J. T. Baker, Deventer, Nizozemsko)
- Kyselina sírová ($\geq 96\%$, Penta, Chrudim, ČR)
- Methanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Destilovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)
- Hydroxid sodný, chlorid draselný, fenolftalein, Carrezovo čířidlo I, Carrezovo čířidlo II, Fehlingovo činidlo I, Fehlingovo činidlo II, jodid sodný, thiosíran sodný, škrobový maz (roztoky připraveny na Univerzitě Pardubice)

2.3 Analyzované vzorky

Bylo analyzováno 12 vzorků lahvových vín, 6 bílých a 6 červených, zastupujících vinařskou oblast Čechy (podoblasti Mělnickou a Litoměřickou) a vinařskou oblast Morava (podoblasti Znojemskou, Velkopopovickou, Mikulovskou i Slováckou). Všechny vzorky byly otevřeny bezprostředně před analýzou a poté byly uchovávány v lednici při 4 °C do doby provedení všech stanovení. Seznam vzorků je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam vzorků analyzovaných vín

<i>Označení</i>	<i>Odrůda</i>	<i>Ročník</i>	<i>Vinařská oblast</i>	<i>Vinařská podoblast</i>	<i>Výrobce</i>
B1	RULANDSKÉ BÍLÉ	2015	Morava	Velkopavlovická	PATRIA Kobylí, a. s.
B2	RULANDSKÉ BÍLÉ	2015	Morava	Znojemská	Šlechtitelská stanice vinařská Znojmo, s. r. o.
B3	RULANDSKÉ BÍLÉ	2016	Čechy	Litoměřická	Žernosecké vinařství, s. r. o.
B4	RULANDSKÉ ŠEDÉ	2016	Morava	Velkopavlovická	Petr Skoupil Velké Bílovice
B5	RULANDSKÉ ŠEDÉ	2015	Morava	Slovácká	Horáková farma, a.s.
B6	RULANDSKÉ ŠEDÉ	2016	Čechy	Litoměřická	Žernosecké vinařství, s. r. o.
C1	FRANKOVKA	2016	Morava	Velkopavlovická	Petr Skoupil Velké Bílovice
C2	FRANKOVKA	2015	Morava	Mikulovská	Templářské sklepy Čejkovice
C3	FRANKOVKA	2017	Čechy	Mělnická	Josef Piksa Roudnice n. L.
C4	RULANDSKÉ MODRÉ	2015	Morava	Velkopavlovická	Petr Skoupil Velké Bílovice
C5	RULANDSKÉ MODRÉ	2015	Morava	Znojemská	Šlechtitelská stanice vinařská Znojmo, s. r. o.
C6	RULANDSKÉ MODRÉ	2015	Čechy	Mělnická	Žernosecké vinařství, s. r. o.

2.4 Pracovní postupy

Pracovní postupy byly voleny dle předchozích diplomových prací studentů Univerzity Pardubice [80-83] dle laboratorních návodů Univerzity Pardubice a dle české technické normy ČSN 56 0216 [84]. Použité postupy byly optimalizovány dle potřeby.

2.4.1 Stanovení pomocí klasických analytických metod

Stanovení celkové kyselosti vína

Ke stanovení celkové kyselosti vína bylo do kádinky pipetováno 10 ml vína a 10 ml destilované vody. Do roztoku bylo vloženo magnetické míchadlo a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. K roztoku vína byl po 0,5 ml přidáván 0,1 M roztok hydroxidu sodného, přičemž bylo pomocí pH metru zaznamenáváno měnící se pH roztoku a přidané množství hydroxidu až do hodnoty pH vyšší než 8. Bod ekvivalence byl vyhodnocen graficky a výpočet celkového obsahu kyselin v jednotkách g/l byl proveden podle vztahu:

$$x = f \cdot a \cdot 0,75$$

kde x ... množství celkových kyselin v g/l

f ... faktor 0,1 M roztoku NaOH

a ... spotřeba NaOH v bodě ekvivalence.

Stanovení kyseliny vinné

Do kádinky byly naváženy 4 g chloridu draselného a poté bylo přidáno 25 ml vína. Po rozpuštění KCl bylo přidáno 25 ml 95% ethanolu a roztok byl 3 minuty intenzivně míchán. Následně byl roztok nechán 10 minut v klidu a poté zfiltrován přes skládaný filtr. Sraženina byla promyta 2x 5 ml 95% ethanolu. Filtrační papír se sraženinou byl přenesen do titrační baňky se 100 ml vroucí destilované vody, po rozpuštění bylo přidáno několik kapek indikátoru fenolftaleinu a roztok byl titrován 0,1 M NaOH do prvního stálého růžového zbarvení. Ze spotřeby odměrného roztoku NaOH bylo vypočítáno množství kyseliny vinné v jednotkách g/l podle vztahu:

$$m = c_{\text{NaOH}} \cdot V \cdot M$$

kde m ... množství kyseliny vinné v g/l

c_{NaOH} ... přesná koncentrace odměrného roztoku NaOH

V ... spotřeba odměrného roztoku NaOH

M ... molekulová hmotnost kyseliny vinné (150,087 g/mol).

Stanovení redukujících cukrů podle Schoorlova

Do kádinky bylo odpipetováno 50 ml vína a přidáno 5 ml Carrezova čířidla I. Po 10 minutách stání byla směs přefiltrována přes skládaný filtr. Z filtrátu bylo odebráno 27,5 ml do 50 ml odměrné baňky, bylo přidáno 5 ml Carrezova čířidla II a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl opět přefiltrován přes skládaný filtr. Z filtrátu bylo pipetováno 20 ml do titrační baňky, bylo přidáno 10 ml Fehlingova činidla I a 10 ml Fehlingova činidla II. Obsah titrační baňky byl vařen po dobu 2 minut a následně byl ochlazen pod proudem tekoucí vody. Bylo přidáno 20 ml 10% jodidu sodného a 15 ml 2 M kyseliny sírové. Vyloučený jod byl titrován 0,1 M odměrným roztokem thiosíranu sodného na škrobový maz do smetanového zbarvení. Stejným způsobem byl proveden slepý pokus, kdy místo 20 ml filtrátu bylo pipetováno 20 ml destilované vody. Množství 0,1 M jodového roztoku bylo vypočítáno podle vztahu:

$$x = f \cdot (b - a)$$

kde x ... množství 0,1 M jodového roztoku

f ... faktor 0,1 M roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

b ... spotřeba 0,1 M roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pro slepý pokus

a ... spotřeba 0,1 M roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pro vzorek.

Ze získané hodnoty x bylo z tabulky obsažené v normě odečteno výsledné množství redukujících cukrů v g/l.

2.4.2 Stanovení antioxidační aktivity

Metodou s DPPH radikálem

Výsledky stanovení antioxidační aktivity se vyjadřují ve formě TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Byl tedy připraven zásobní roztok látky Trolox rozpuštěním 25 mg v 100 ml 95% ethanolu. Z tohoto základního roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentracích 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a 50 $\mu\text{g/ml}$ Troloxu. Roztok DPPH radikálu byl připraven rozpuštěním 12,5 mg této látky v 500 ml methanolu. Vzorky červených vín byly před měřením ředěny destilovanou vodou 100x, vzorky bílých vín byly ředěny 10x.

Do zkumavky s víčkem bylo pipetováno 500 μl vzorku a 5 ml methanolického roztoku DPPH radikálu. Zkumavka byla uzavřena a ponechána 10 minut reagovat na temném místě při laboratorní teplotě. Poté byl změřen úbytek absorbance při 517 nm.

Stejným způsobem byly proměřeny roztoky kalibrační řady a slepý pokus s 500 µl vody místo vzorku. Inhibice DPPH radikálu v procentech ($I_{\%}$) byla počítána podle vztahu:

$$I(\%) = \frac{A_{sp} - A_{vz}}{A_{sp}} \cdot 100$$

kde A_{sp} ... absorbance slepého pokusu

A_{vz} ... absorbance vzorku.

Procenta inhibice u vzorků byla dále vyjádřena jako TEAC.

Metodou s ABTS radikálem

Kalibrační roztoky Troloxu o koncentracích 25, 50, 75, 100, 125 a 150 µg/ml i vzorky vín byly připraveny stejným způsobem jako u metody s DPPH radikálem. Na přípravu kation radikálu ABTS⁺ byla použita ABTS diamonná sůl ve formě tablety (10 mg), která byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody a poté bylo přidáno 100 µl roztoku peroxodisíranu draselného o koncentraci 0,064 mol/l. Takto připravený roztok byl ponechán 16 hodin reagovat při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Následně bylo odebráno 2,5 ml tohoto roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Tento pracovní roztok byl používán pro vlastní stanovení.

Do zkumavky s víčkem bylo pipetováno 100 µl vzorku a 3 ml roztoku ABTS radikálu. Zkumavka byla uzavřena a ponechána 30 minut reagovat bez přístupu světla při laboratorní teplotě. Poté byl změřen úbytek absorbance při 734 nm. Stejným způsobem byly proměřeny roztoky kalibrační řady a slepý pokus se 100 µl vody místo vzorku. Inhibice ABTS radikálu v procentech ($I_{\%}$) byla počítána podle stejného vzorce jako inhibice DPPH radikálu a vyjádřena jako TEAC.

2.4.3 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Celkový obsah fenolických látek se vyjadřuje jako GAE (Gallic Acid Equivalent), proto byla nejprve připravena kalibrační řada kyseliny galové. Zásobní roztok kyseliny galové byl připraven navážením 50 mg této látky do 100 ml odměrné baňky a jejím doplněním po rysku 95% ethanolem. Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny roztoky kalibrační řady o koncentracích 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 a 200 µg/ml kyseliny galové. Vzorky červených vín byly před měřením ředěny 50x (destilovanou vodou), vzorky bílých vín byly ředěny 10x.

Do zkumavky s víčkem byl pipetován 1 ml vzorku, 1 ml 95% ethanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml činidla dle Folin-Ciocalteu. Po pěti minutách stání byl přidán 1 ml 5% roztoku uhličitanu sodného, zkumavka byla uzavřena a ponechána

60 min při laboratorní teplotě. Poté byla proměřena absorbance při vlnové délce 765 nm. Stejným způsobem byla proměřena kalibrační řada a slepý pokus, kdy místo 1 ml vzorku byl dávkován příslušný kalibrační roztok, v případě slepého pokusu destilovaná voda. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny galové.

2.4.4 Chromatografická analýza

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze pro stanovení fenolických látek byla připravena rozpuštěním 0,3854 g octanu amonného v 500 ml redestilované vody. Roztok byl okyselen cca 1 ml kyseliny octové na pH ~ 3 a výsledné pH bylo ověřeno pomocí pH metru. Následně byla mobilní fáze přefiltrována přes 0,45 µm filtr. Složka B mobilní fáze byla připravena smícháním acetonitrilu se složkou A v poměru 4:1.

Mobilní fáze pro stanovení organických kyselin byla připravena okyselením 500 ml redestilované vody 220 µl kyseliny sírové na pH ~ 1,8 a přefiltrováním přes 0,45 µm filtr. Výsledné pH bylo zkontrolováno pomocí pH metru.

Mobilní fáze pro stanovení anthokyanů byla připravena stejným způsobem jako mobilní fáze pro stanovení organických kyselin. Složka B mobilní fáze byla připravena smícháním acetonitrilu s přefiltrovanou redestilovanou vodou v poměru 1:1 (250 ml + 250 ml) a okyselením 220 µl kyseliny sírové na pH ~ 1,8, které bylo zkontrolováno pomocí pH metru.

Příprava zásobních roztoků standardních látek

Pro přípravu kalibračních roztoků fenolických látek byly namíchány zásobní roztoky o koncentraci 400 mg/l kyseliny galové a katechinu a směsný roztok kyseliny kávové, kyseliny *p*-kumarové, kyseliny ferulové a protokatechaldehydu o koncentraci 50 mg/l. K přípravě zásobních i kalibračních roztoků byl použit 50% methanol. Ze zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky kyseliny galové o koncentracích v rozmezí 1 – 25 mg/l, katechinu o koncentracích v rozmezí 1 – 75 mg/l a kyseliny kávové, kyseliny *p*-kumarové, kyseliny ferulové i protokatechaldehydu o koncentracích v rozmezí 0,1 – 5 mg/l.

Rozpuštěním v redestilované vodě byly připraveny zásobní roztoky kyselin vinné, jablečné, mléčné, octové, citronové a jantarové o koncentraci 10 g/l. Ze zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky kyseliny vinné o koncentracích v rozmezí 100 – 500 mg/l, kyselin jablečné, mléčné a citronové

o koncentracích v rozmezí 50 – 300 mg/l a kyselin octové a jantarové o koncentracích v rozmezí 25 – 200 mg/l.

Pro přípravu kalibrační řady anthokyanů byly nejprve namíchány zásobní roztoky delphinidin-3-*o*-glukosidu a kyanidin-3-*o*-glukosidu o koncentraci 100 mg/l a malvidin-3-*o*-glukosidu o koncentraci 250 mg/l (roztoky byly připraveny do 50% methanolu okyseleného kyselinou sírovou na pH < 2). Z těchto zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky delphinidin-3-*o*-glukosidu a kyanidin-3-*o*-glukosidu o koncentraci v rozmezí 0,5 - 25 mg/l a malvidin-3-*o*-glukosidu o koncentraci v rozmezí 10 – 110 mg/l. Všechny připravené kalibrační roztoky byly před analýzou filtrovány přes 0,45 µm PTFE filtr.

Směs standardů těkavých látek byla připravena smícháním ethylacetátu, methanolu, *n*-propylalkoholu, isobutanolu, *n*-butanolu, isoamylalkoholu, pentanolu, ethyllaktátu a hexanolu (1 ml každého standardu) s 3 ml kyseliny hexanové.

Příprava vzorků vín před chromatografickou analýzou

Pro stanovení fenolických látek byly vzorky červených vín ředěny v poměru 3:1 (víno:voda) a vzorky bílých vín v poměru 1:1. Organické kyseliny ve vzorcích červených i bílých vín byly analyzovány po ředění 9:1. Ke stanovení anthokyanů a těkavých látek byla použita vína neředěná. Před analýzou pomocí kapalinové chromatografie byly připravené vzorky vždy přefiltrovány přes 0,45 PTFE filtr. K analýze těkavých látek pomocí plynové chromatografie bylo vždy použito čerstvých 15 ml vína uzavřeného ve vialce se septem, které bylo před dávkováním zahřáto v termostatu vyhřátém na 60 °C po dobu 40 minut a následně byl proveden nástřik pomocí Hamiltonovy stříkačky z headspace prostoru.

Podmínky chromatografických analýz

Stanovení fenolických látek

- Kolona Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 µm) s předkolonkou
- Mobilní fáze A: 10 mM octan amonný okyselený kyselinou octovou na pH~ 3
- Mobilní fáze B: 80 % acetonitrilu + 20 % MF A
- Průtok: 0,4 ml/min
- Teplota termostatu kolony: 40 °C
- Dávkovaný objem: 10 µl

- Gradientová eluce: 0 min – 0 % MF B; 30 min – 20 % MF B; 40 min – 50 % MF B; 50 min – 80 % MF B; 55 min – 80 % MF B
- Detekce: 280 nm, 320 nm

Stanovení organických kyselin

- Kolona Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) s předkolonkou
- Mobilní fáze: redestilovaná voda okyselená kyselinou sírovou na pH~1,8
- Průtok: 0,5 ml/min
- Teplota termostatu kolony: 35 °C
- Dávkovaný objem: 10 µl
- Isokratická eluce
- Detekce: 210 nm

Stanovení anthokyanů

- Kolona Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) s předkolonkou
- Mobilní fáze A: redestilovaná voda okyselená kyselinou sírovou na pH~1,8
- Mobilní fáze B: 50% acetonitril okyselený kyselinou sírovou na pH~1,8
- Průtok: 1 ml/min
- Teplota termostatu kolony: 35 °C
- Dávkovaný objem: 10 µl
- Gradientová eluce: 0 – 40 min: 0 – 100 % MF B
- Detekce: 520 nm

Stanovení těkavých látek

- Kapilární kolona Supelcowax 10 (15 m x 0,32 mm; 0,5 µm film PEG)
- Nosný plyn: dusík
- Teplotní program: počáteční teplota 40 °C po dobu 5 min; následně nárůst o 3 °C/min na teplotu 155 °C, která byla zachována po dobu 5 min; celková doba analýzy: 46 minut
- Dávkovaný objem: 50 µl bez splitu
- Teplota injektoru: 240 °C
- Teplota detektoru: 250 °C

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Výsledky klasických analytických metod

3.1.1 Výsledky stanovení pH, celkové kyselosti vín a kyseliny vinné

Po otevření každého vína bylo skleněnou elektrodou pH metru změřeno jeho pH. Celková kyselost vín a množství kyseliny vinné bylo stanoveno titračně podle pracovních postupů uvedených v kapitole 2.4.1. Bod ekvivalence při titraci celkové kyselosti vín byl vyhodnocen graficky pomocí první, respektive druhé derivace. Grafické vyhodnocení pro jeden vybraný vzorek („Rulandské modré C5“) je uvedeno v příloze I. Titrační stanovení kyseliny vinné bylo u každého vzorku provedeno třikrát a výsledná koncentrace byla vypočtena z průměrné spotřeby roztoku hydroxidu sodného. Množství kyseliny vinné bylo dále přepočítáno na procentuální zastoupení této kyseliny z celkového množství kyselin. Stanovené hodnoty pH, celkové kyselosti vín a kyseliny vinné jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Hodnoty pH, celkové kyselosti vín a kyseliny vinné

<i>Vzorek*</i>	<i>pH</i>	<i>Celková kyselost [g/l]</i>	<i>Kyselina vinná [g/l]</i>	<i>Kyselina vinná [%]</i>
RULANDSKÉ BÍLÉ (B1)	3,31	6,18	2,21	35,81
RULANDSKÉ BÍLÉ (B2)	3,29	7,36	2,52	34,20
RULANDSKÉ BÍLÉ (B3)	3,41	7,11	1,48	20,76
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B4)	3,51	6,95	2,52	36,22
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B5)	3,38	6,50	2,80	43,02
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B6)	3,60	7,13	1,04	14,60
FRANKOVKA (C1)	3,58	6,02	2,21	36,75
FRANKOVKA (C2)	3,61	5,67	2,26	39,81
FRANKOVKA (C3)	3,49	5,89	2,56	43,43
RULANDSKÉ MODRÉ (C4)	3,74	4,83	1,54	31,87
RULANDSKÉ MODRÉ (C5)	3,55	5,02	1,93	38,49
RULANDSKÉ MODRÉ (C6)	3,68	5,72	1,41	24,67

**Podrobnější informace o jednotlivých odrůdách jsou uvedeny v tabulce 1, kapitola 2.3*

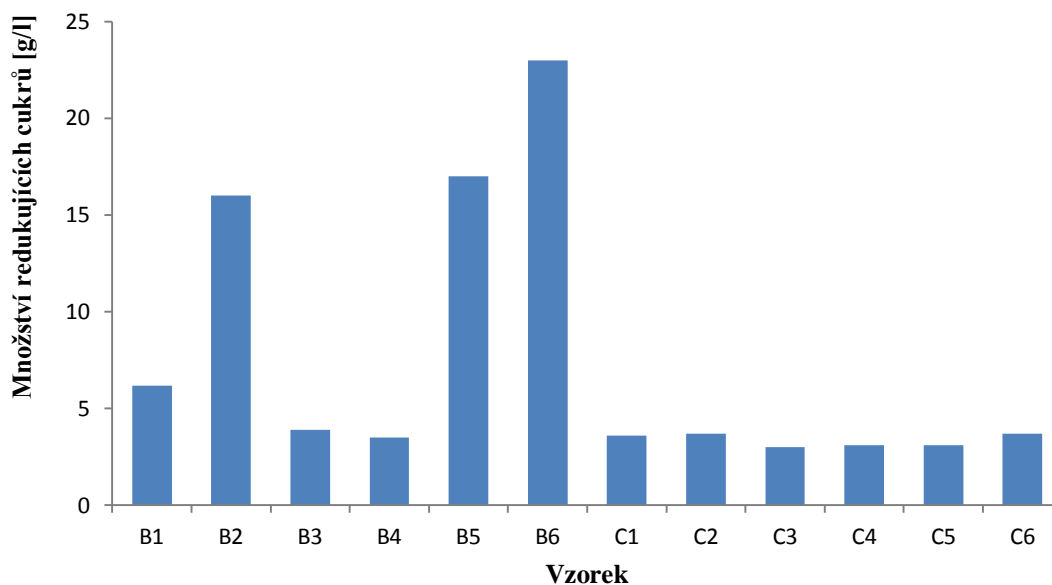
Z uvedených výsledků je patrné, že bílá vína obsahují více kyselin než vína červená. Množství celkových kyselin ve vínech se obvykle pohybuje v rozmezí 5 – 8 g/l [85]. Celková kyselost analyzovaných bílých vín v této diplomové práci se pohybuje v rozmezí 6,18 – 7,36 g/l, u červených vín v rozmezí 4,83 – 6,02 g/l. Množství kyseliny vinné se pohybovalo v rozmezí 1,04 – 2,80 g/l. Nejvyšší podíl kyseliny vinné byl zaznamenán u vzorků „Rulandské šedé B5“ a „Frankovka C3“. Tato vína obsahovala více než 43 % kyseliny vinné. Přes 30 % kyseliny vinné obsahovala vína „Rulandské bílé B1 a B2“, „Rulandské šedé B4“, „Frankovka C1 a C2“ a „Rulandské modré C4 a C5“. U ostatních vín bylo stanoveno 14,60 – 24,67 % kyseliny vinné.

Co se týká pH, mezi bílými a červenými víny nebyl zaznamenán výraznější rozdíl. U bílých vín bylo naměřeno pH v rozsahu 3,29 – 3,60 a u červených vín v rozsahu 3,49 – 3,74. Hodnota pH je ve vztahu k celkovému obsahu kyselin závislá na odrůdě vína, vyšší vliv je přikládán poměru mezi obsahem kyseliny vinné a kyseliny jablečné [86]. To se také projevuje u analyzovaných vzorků v této diplomové práci. Za nejnázornější příklad lze pokládat odrůdu „Rulandské modré“, jejíž všechny vzorky jsou ročníku 2015. Vzorky C4 a C5 této odrůdy pocházejí z vinařské oblasti Morava. Pro vzorek C4 bylo změřeno pH 3,74 a zastoupení kyseliny vinné 31,87 %, u vzorku C5 bylo zaznamenáno pH 3,55 a 38,49 % kyseliny vinné, tedy vyšší podíl kyseliny vinné a nižší hodnota pH než u vzorku C4. Lze tedy říci, že na výsledné pH má zásadní vliv množství kyseliny vinné, která je silnější kyselinou oproti kyselině jablečné. Vzorek C6 stejné odrůdy, pocházející z vinařské oblasti Čechy, vykazoval pH 3,68 a 24% zastoupení kyseliny vinné. V porovnání se vzorkem C4 se jedná o nižší pH a nižší podíl kyseliny vinné. Lze tedy předpokládat, že na výsledné pH vína má vliv také místo, kde byla vinná réva pěstována, neboť odlišné klimatické podmínky ovlivňují obsah a složení organických kyselin v bobulích.

3.1.2 Výsledky stanovení redukcujících cukrů

Ke stanovení redukcujících cukrů byl použit postup popsáný v kapitole 2.4.1. Titrační stanovení každého vzorku bylo provedeno třikrát a z průměrné spotřeby roztoku thiosíranu sodného bylo spočítáno množství 0,1 M jodového roztoku, podle kterého bylo z tabulky, uvedené v příloze II, odečteno množství redukcujících cukrů.

Množství redukujících cukrů v jednotlivých vzorcích vín je znázorněno na obrázku 8, konkrétní hodnoty a typy vín jsou uvedeny v tabulce v příloze III.



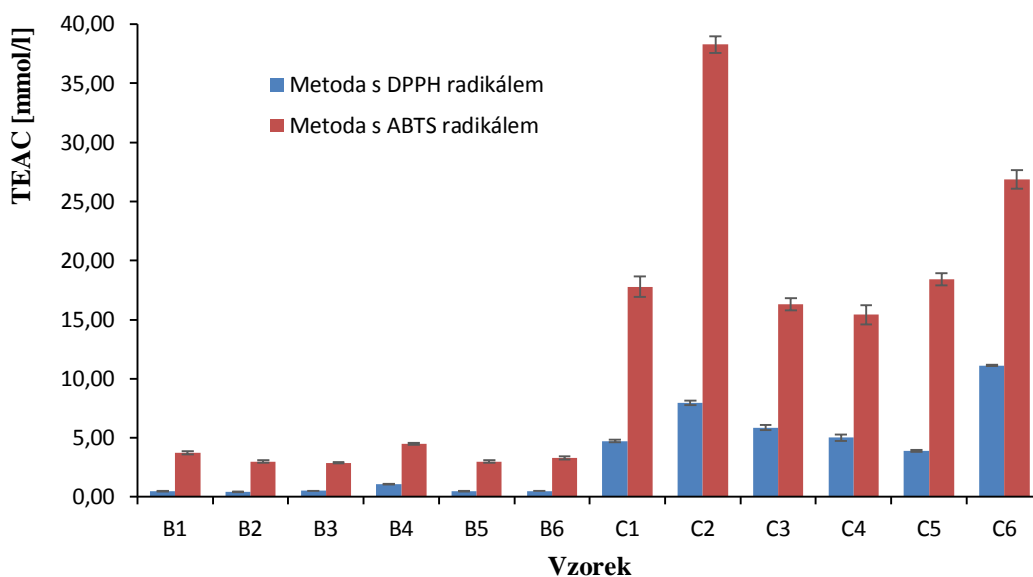
Obrázek 8: Obsah redukujících cukrů ve vzorcích vín;
B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé, C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Z obrázku je patrné, že nejvyšší obsah cukrů mají vzorky „Rulandské šedé B5“, „Rulandské šedé B6“ a „Rulandské bílé B2“, obsahující zbytkový cukr v rozmezí 16 – 23 g/l. Obsahem zbytkového cukru by tato vína měla spadat do skupiny polosladkých vín, jak je popsáno v kapitole 1.2.2. Nicméně pro zařazení lze využít i obsah celkových kyselin. Takto lze nepatrně zvýšit hranici pro suchá a polosuchá vína. Suchá vína mohou obsahovat až 9 g/l zbytkového cukru v případě, že je obsah cukru větší než obsah celkových kyselin a zároveň rozdíl těchto hodnot není větší než 2. Podobně polosuchá vína mohou obsahovat až 18 g/l zbytkového cukru, jestliže rozdíl mezi množstvím celkových kyselin a zbytkovým cukrem není více než 10 [85]. Proto je označení od výrobce u vzorku „Rulandské bílé B2“ jako „polosuché“ správné. Podobně je u vzorku vína „Rulandské bílé B1“ správné označení jako „suché“, i když obsahuje 6,2 g/l zbytkového cukru. Ostatní vína obsahují 3,1 – 3,9 g/l zbytkového cukru a bezpochyby tak patří mezi „suchá“ vína.

3.2 Výsledky stanovení antioxidační aktivity

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno dvěma spektrofotometrickými metodami, využívajícími odlišné radikály - DPPH[•] a ABTS^{•+}. Bylo postupováno podle návodu popsaných v kapitole 2.4.2. Naměřené hodnoty absorbancí byly přepočteny

na procenta úbytku daného radikálu a následně na ekvivalentní množství Troloxu (TEAC) v mmol/l. Kalibrační závislosti Troloxu pro oba radikály jsou uvedeny v přílohách IV a V. Každý vzorek vína byl proměřen pětkrát a z těchto měření byla vypočítána průměrná hodnota. Porovnání výsledků měření antioxidační aktivity oběma metodami je uvedeno na obrázku 9, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v příloze VI.



Obrázek 9: Porovnání antioxidační aktivity stanovené metodami s DPPH a ABTS radikálem;
B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé, C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Použité metody se zakládají na schopnosti látek, vykazujících antioxidační aktivitu, zhaset radikálový kation. Z obrázku je na první pohled vidět patrný rozdíl mezi víny červenými a bílými. Vzorky bílých vín vykazují antioxidační aktivitu v rozmezí 0,44 – 1,08 mmol/l TEAC (metoda DPPH) a v rozmezí 2,88 – 4,49 mmol/l TEAC (metoda ABTS). U vzorků červených vín byla zjištěna výrazně vyšší antioxidační aktivita. Hodnoty se pohybují v rozmezí 3,89 – 11,12 mmol/l TEAC (metoda DPPH) a v rozmezí 15,43 – 38,27 mmol/l TEAC (metoda ABTS). Rozdíl v antioxidační aktivitě mezi červenými a bílými víny je dán odlišným postupem při výrobě vína. Ke kvašení bílého vína totiž dochází po oddělení slupek a semen od moštu, kdežto červená vína kvasí v přítomnosti slupek i semen, ze kterých do moštu přechází významné množství fenolických látek, zejména pak anthokyany.

Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny u vzorků „Rulandské modré C6“ a „Frankovka C2“. Zajímavé je, že hodnota antioxidační aktivity získaná metodou ABTS je vyšší u vzorku „Frankovka C2“, kdežto pro DPPH metodu u vzorku

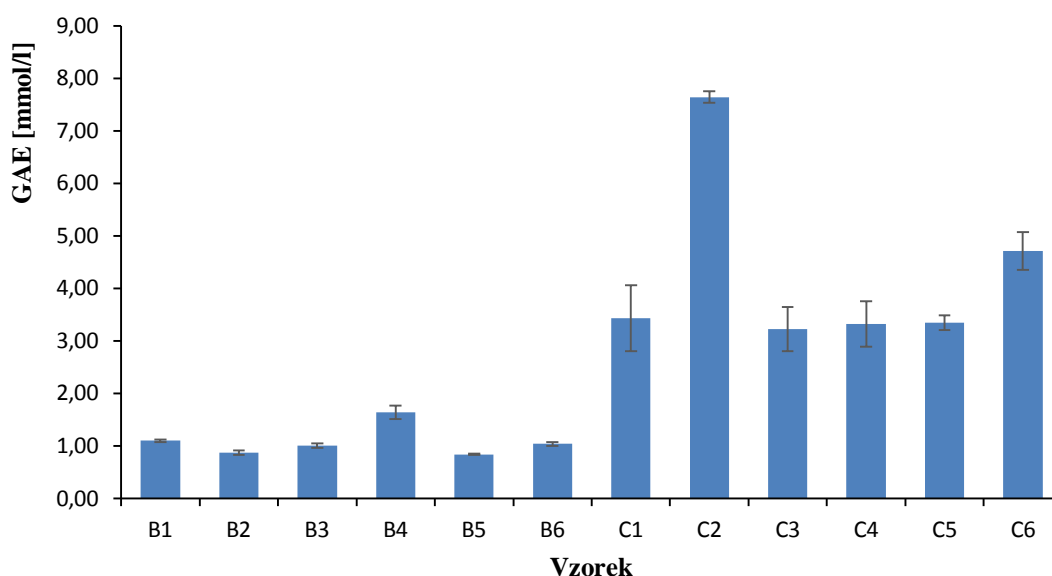
„Rulandské modré C6“. Z rozdílných výsledků jednotlivých metod i na základě poznatků z prostudované literatury lze usoudit, že různé radikály se liší mechanismem reakce s antioxidačními látkami. Dále lze předpokládat, že ABTS radikál má vyšší afinitu vůči fenolickým látkám, neboť antioxidační aktivita změřená touto metodou je pro stejné vzorky až 7x vyšší. Účinek antioxidantů bude nejspíš ovlivněn také reakčním prostředím, jelikož DPPH radikál je rozpustný výhradně v organickém rozpouštědle (v případě této diplomové práce v methanolu), kdežto pro rozpuštění ABTS radikálu byla použita destilovaná voda. U metody s DPPH radikálem tak dochází k omezení vlivu hydrofilních antioxidantů.

V porovnání s výsledky diplomové práce Z. Neoralové [80], lze sledovat podobný trend v rozdílech mezi metodami DPPH a ABTS. U analýz v této diplomové práci je však větší rozdíl v hodnotách u stejných vín, měřených rozdílnou metodou. Důvodem je nejspíš rozdílné zastoupení konkrétních fenolických látek vzhledem k rozdílnému původu vín jak časovému, tak místnímu, které se v jednotlivých metodách projevují odlišně. Výsledky červených vín v této diplomové práci se v porovnání s prací Z. Neoralové pohybují v podobném rozmezí hodnot, vyjma vzorku „Frankovka C2“, která vykazovala u metody ABTS vyšší antioxidační aktivitu. Pro bílá vína byla v této diplomové práci naměřena vyšší antioxidační aktivita metodou ABTS, ale u metody DPPH byly získány podobné hodnoty.

Ve studii Sartora et.al. [87], zabývající se italskými víny, lze nalézt výsledky antioxidační aktivity červených vín v rozmezí 7,14 – 12,07 mmol/l TEAC (metoda DPPH), které odpovídají pouze hodnotám vzorků „Frankovka C2“ a „Rulandské modré C6“, patřících mezi vzorky s nejvyšší antioxidační aktivitou této diplomové práce. Pro metodu ABTS byly v italské studii získány hodnoty TEAC v rozmezí 10,30 – 11,12 mmol/l. V této diplomové práci však byly pro vzorky červených vín naměřeny výrazně vyšší hodnoty. Další studie [74], zabývající se taktéž italskými víny, uvádí pro červená vína antioxidační aktivitu 2,6 a 3,4 mmol/l TEAC (metoda DPPH) a 17,1 a 23,2 mmol/l TEAC (metoda ABTS). U bílých vín pak 0,16 a 0,28 mmol/l TEAC (metoda DPPH) a 1,08 a 1,96 mmol/l TEAC (metoda ABTS). Tyto hodnoty jsou podobné hodnotám antioxidační aktivity vín z České republiky studovaných v této práci.

3.3 Výsledky stanovení celkového obsahu fenolických látek

Ke stanovení celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích vín byl použit postup popsany v kapitole 2.4.3. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalentní množství kyseliny galové (GAE) v jednotkách mmol/l. Kalibrační závislost této kyseliny je uvedena v příloze VII. Každé měření bylo provedeno pětkrát a průměrné hodnoty z těchto měření jsou znázorněny na obrázku 10, chybové úsečky představují směrodatné odchylky měření. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze VI.



Obrázek 10: Celkový obsah fenolických látek ve vzorcích vín;
B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé, C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Stejně jako antioxidační aktivita, i celkový obsah fenolických látek se vyznačuje významně vyššími hodnotami pro vína červená. Z bílých vín dosahuje nejvyšší hodnoty 1,64 mmol/l GAE vzorek „Rulandské šedé B4“. Ostatní bílá vína se pohybují v rozmezí 0,83 – 1,09 mmol/l GAE. Mezi červenými víny dominuje vzorek „Frankovka C2“ s hodnotou 7,64 mmol/l GAE, druhou nejvyšší hodnotu 4,71 mmol/l GAE má vzorek „Rulandské modré C6“. Zbylá červená vína obsahují velice podobné množství fenolických látek v rozmezí 3,22 – 3,43 mmol/l GAE.

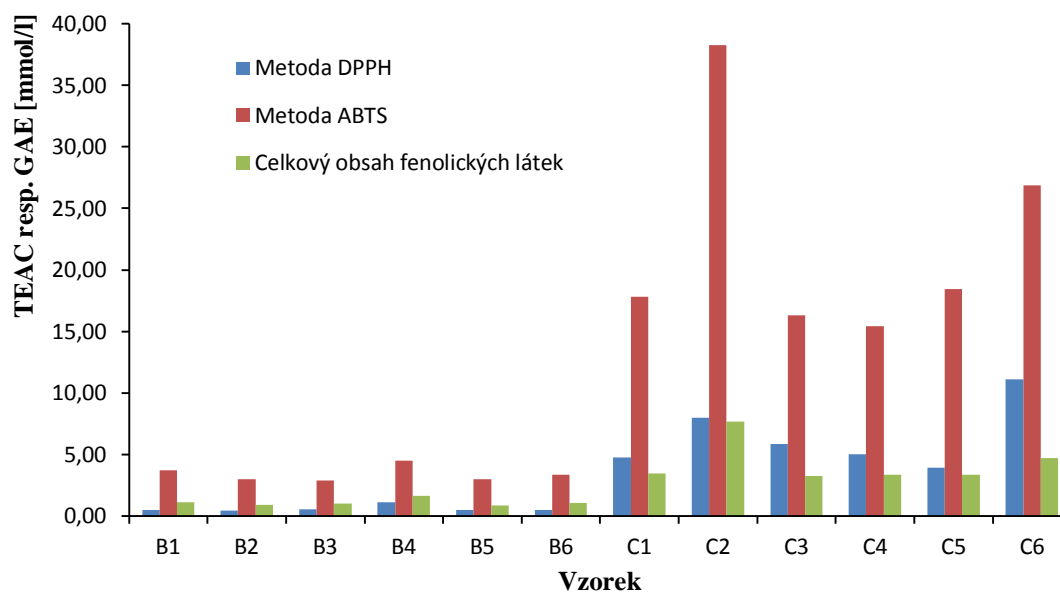
V porovnání s diplomovou prací Z. Neoralové [80] jsou výsledky získané v této práci zhruba o polovinu nižší jak u červených, tak u bílých vín. Důvodem mohou být rozdílné klimatické podmínky daných let.

Studie Sartora et.al. [87] uvádí celkový obsah fenolických látek pro červená italská vína v rozmezí hodnot 7,76 – 23,08 mmol/l GAE. Těmto hodnotám se vyrovnává pouze vzorek „Frankovka C2“ s hodnotou 7,64 mmol/l GAE, ostatní

vzorky v této diplomové práci obsahují výrazně méně fenolických látek. Celkovým obsahem fenolických látek ve vínech z jižní Itálie se zabývala také studie Lorenza et. al. [74]. V této studii byl zjištěn celkový obsah fenolických látek pro červená vína 25,6 a 32,4 mmol/l a pro bílá vína 2,76 a 4,06 mmol/l GAE. Také tyto hodnoty jsou výrazně vyšší než množství fenolických látek ve vínech analyzovaných v této diplomové práci. Je však nutné si uvědomit, že zmíněné studie se zabývají víny původem z Itálie, kde pravděpodobně převládají lepší klimatické podmínky ve srovnání s Českou republikou.

3.4 Porovnání metod pro stanovení celkového obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity

Relativní srovnání výsledků obou metod stanovení antioxidační aktivity vyjádřené jako TEAC a celkového obsahu fenolických látek vyjádřeného jako GAE je znázorněno na obrázku 11. Avšak v potaz je brán vliv rozdílných mechanismů působení jednotlivých činidel s antioxidanty a tedy použití odlišných standardních látek pro dané metody.

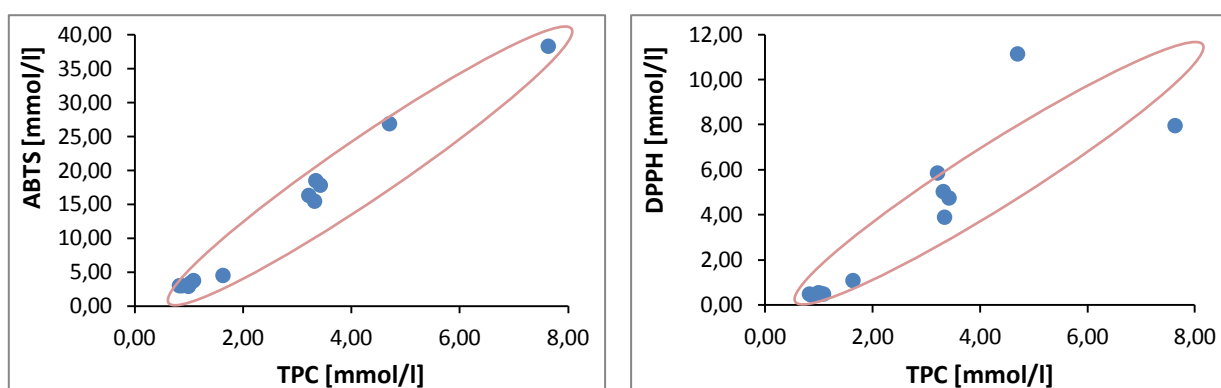


Obrázek 11: Porovnání výsledků stanovení antioxidační aktivity a celkového obsahu fenolických látek; B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé, C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Rozdíl mezi metodami DPPH a ABTS pro stanovení antioxidační aktivity byl zmiňován již v kapitole 3.1.3. Z obrázku 11 vyplývá také rozdíl mezi celkovým obsahem fenolických látek a antioxidační aktivitou. Ve srovnání s ABTS metodou je celkový obsah fenolických látek pro daný vzorek vždy nižší. Vysvětlením by mohlo být

to, že vína obsahují i jiné než fenolické látky, např. vitamíny nebo organické kyseliny, které působí jako antioxidanty. Zajímavější poznatek vyplývá ze srovnání celkového obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH. V tomto případě byly pro bílá vína naměřeny mírně vyšší hodnoty a pro červená vína nižší hodnoty celkového množství fenolických látek ve srovnání s antioxidační aktivitou stanovenou metodou DPPH. Tento trend lze pozorovat také v diplomové práci Z. Neoralové [80]. Lze tak zřejmě předpokládat vliv látek, jako jsou cukry, kyselina askorbová, oxid siřičitý a další.

Pro porovnání vztahu mezi metodami stanovení antioxidační aktivity a celkového obsahu fenolických látek byly dále sestaveny korelační grafy, uvedené na obrázku 12.



Obrázek 12: Korelační grafy mezi metodami ABTS-TPC a DPPH-TPC

Porovnáním metody ABTS s TPC byl vyhodnocen korelační koeficient 0,9830 a pro metodu DPPH s TPC odpovídá korelační koeficient hodnotě 0,7492. Jak z obrázku 12, tak z rozdílných korelačních koeficientů vyplývá, že výraznější korelaci se stanovením celkového obsahu fenolických látek vykazuje metoda určující antioxidační aktivitu pomocí ABTS radikálu.

3.5 Výsledky chromatografických analýz

3.5.1 Výsledky stanovení fenolických látek

Optimalizace podmínek chromatografické analýzy fenolických látek

Pro separaci fenolických látek byla použita kolona Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m). Vzhledem k rozměrům kolony byl zvolen průtok 0,4 ml/min. Optimální pH mobilní fáze bylo zvoleno podle práce Z. Neoralové [80]. Mobilní fázi A

tvořil 10 mM octan amonný, okyselený kyselinou octovou na pH~ 3. Mobilní fáze B se skládala z 80 % acetonitrilu a 20 % MF A. Gradient mobilní fáze byl nejprve zkoušen na vzorovém víně. Jako první byl aplikován gradient 0 min – 0 % MF B; 40 min – 40 % MF B; 50 min – 60 % MF B; 60 min – 60 % MF B. Druhým zkoušeným gradientem byl 0 min – 0 % MF B; 40 min – 30 % MF B; 50 min – 60 % MF B; 60 min – 60 % MF B. Dalšími testovanými byly gradienty 0 min – 0 % MF B; 40 min – 20 % MF B; 50 min – 70 % MF B; 60 min – 80 % MF B a gradient 0 min – 0 % MF B; 30 min – 15 % MF B; 40 min – 20 % MF B; 50 min – 70 % MF B; 60 min – 80 % MF B. Posledním zkoušeným gradientem byl 0 min – 0 % MF B; 30 min – 20 % MF B; 40 min – 50 % MF B; 50 min – 80 % MF B; 55 min – 80 % MF B, který poskytoval uspokojivou separaci standardních látek i zkušební vína, a tak byl použit pro všechny analýzy.

Analýza standardů fenolických látek

Na základě poznatků z prostudované literatury a podle zkušební vína bylo k analýze vybráno šest zástupců fenolických látek: kyselina galová, protokatechaldehyd, katechin, kyselina kávová, kyselina *p*-kumarová a kyselina ferulová. Jednotlivé standardy byly nejprve analyzovány samostatně, aby byly zjištěny jejich retenční časy. Z analýz standardů byla také zjištěna maximální vlnová délka absorpce UV záření a UV-VIS spektra daných standardů v rozmezí vlnových délek 190 – 500 nm. Ke kvantifikaci těchto látek ve vzorcích vín byly připraveny kalibrační roztoky. Rozsah kalibrace byl zvolen podle zkušební vína a dle poznatků z prostudované literatury. Parametry kalibračních závislostí standardů a jejich retenční časy jsou zaznamenány v tabulce 3. Grafy kalibračních závislostí jsou uvedeny v přílohách VIII - XIII.

Tabulka 3: Retenční časy fenolických látek a parametry jejich kalibračních závislostí

Standardní látka	t_R [min]	Rozsah kalibrace [mg/l]	Rovnice regrese	R^2
kyselina galová	4,69	1,0 – 25,0	$y = 362,57x - 165,91$	0,9987
protokatechaldehyd	11,47	0,1 – 5,0	$y = 680,44x - 18,726$	0,9997
katechin	15,77	1,0 – 75,0	$y = 100,54x - 84,586$	0,9992
kyselina kávová	16,69	0,1 – 5,0	$y = 777,25x - 15,061$	0,9999
kyselina <i>p</i> -kumarová	22,18	0,1 – 5,0	$y = 805,41x - 17,783$	0,9999
kyselina ferulová	26,19	0,1 – 5,0	$y = 613,86x - 9,8432$	0,9999

Chromatogram směsného roztoku standardních látek protokatechaldehydu, kyseliny kávové, kyseliny *p*-kumarové, kyseliny ferulové, kyseliny galové a katechinu při vlnových délkách 280 nm a 320 nm je zaznamenán v příloze XIV.

Pro všechny stanovované látky byly vypočítány meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Tyto parametry byly vyhodnoceny na základě šumu nulové linie. Trojnásobek hodnoty šumu (LOD) a desetinásobek hodnoty šumu (LOQ) byl vztažen přímou úměrou k výšce píku dané látky a její aktuální koncentraci. Výpočet byl vždy proveden z hodnot nejnižší koncentrace kalibračního roztoku. V tabulce 4 jsou uvedeny vypočtené hodnoty mezí detekce i stanovitelnosti pro stanovované fenolické látky.

Tabulka 4: Meze detekce a stanovitelnosti fenolických látek

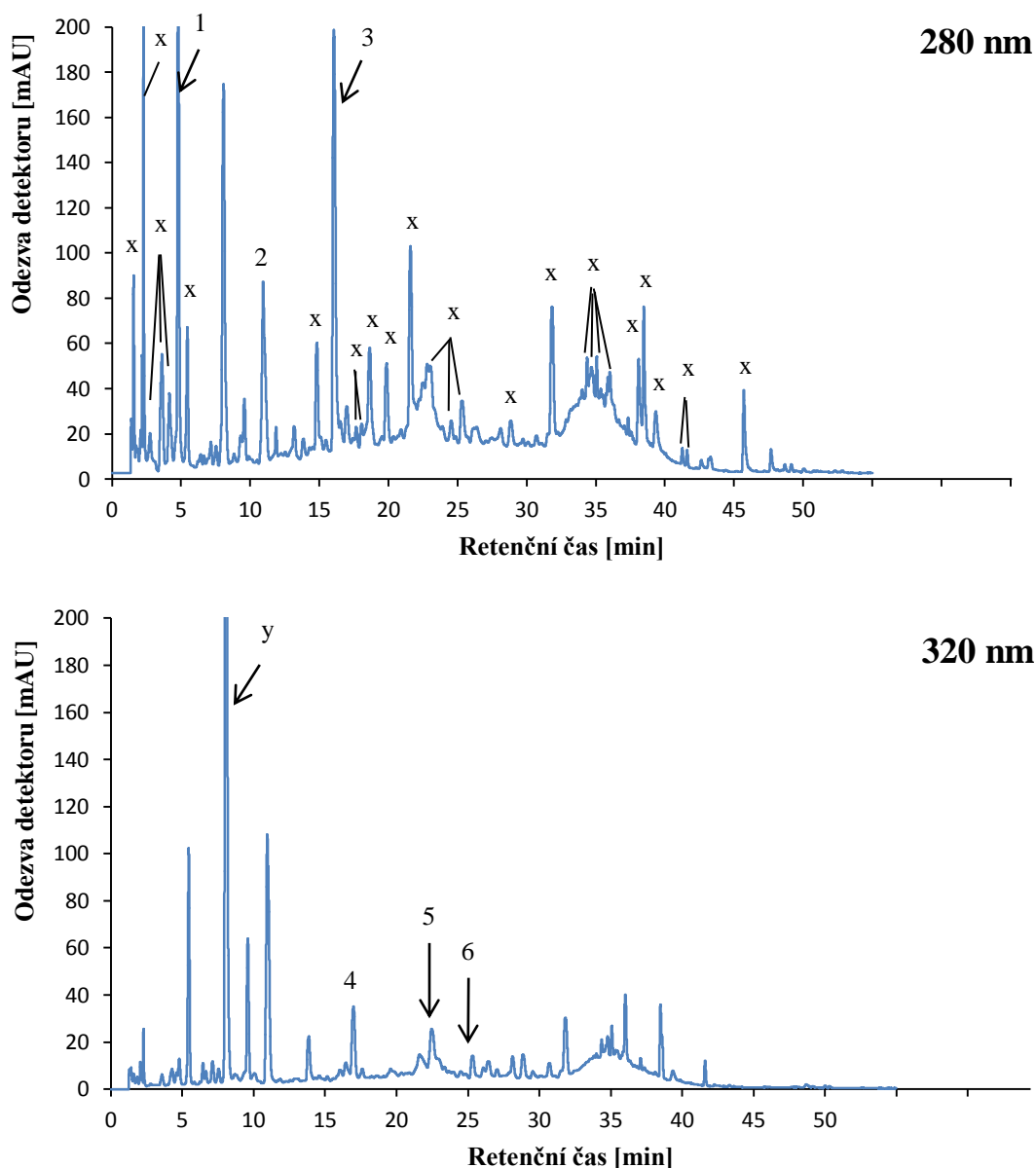
<i>Standardní látka</i>	<i>LOD</i> [$\mu\text{g/l}$]	<i>LOQ</i> [$\mu\text{g/l}$]	<i>Standardní látka</i>	<i>LOD</i> [$\mu\text{g/l}$]	<i>LOQ</i> [$\mu\text{g/l}$]
kyselina galová	7,4	24,7	kyselina kávová	2,9	9,8
protokatechaldehyd	4,1	13,8	kyselina <i>p</i> -kumarová	2,9	9,8
katechin	25	83,3	kyselina ferulová	3,5	11,8

Vypočtené meze protokatechaldehydu, kyseliny kávové, kyseliny *p*-kumarové a kyseliny ferulové jsou si velice podobné. Vyšší hodnoty mezí byly získány pro kyselinu galovou, nejvyšší pro katechin.

Fenolické látky ve vzorcích vín

Vzorky bílých vín byly před analýzou ředěny redestilovanou vodou 2x, u červených vín byl očekáván vyšší obsah fenolických látek, proto byly ředěny 4x. Zředěná vína byla před analýzou přefiltrována přes 0,45 μm PTFE filtr. Každé víno bylo analyzováno třikrát.

Na základě porovnání retenčních časů, absorpčních maxim a UV-VIS spekter byly ve vzorcích vín identifikovány jednotlivé fenolické látky. Na obrázku 13 je chromatogram vybraného vzorku vína „Rulandské modré C5“.



Obrázek 13: Chromatogramy vzorku vína „Rulandské modré C5“ při 280nm a 320 nm

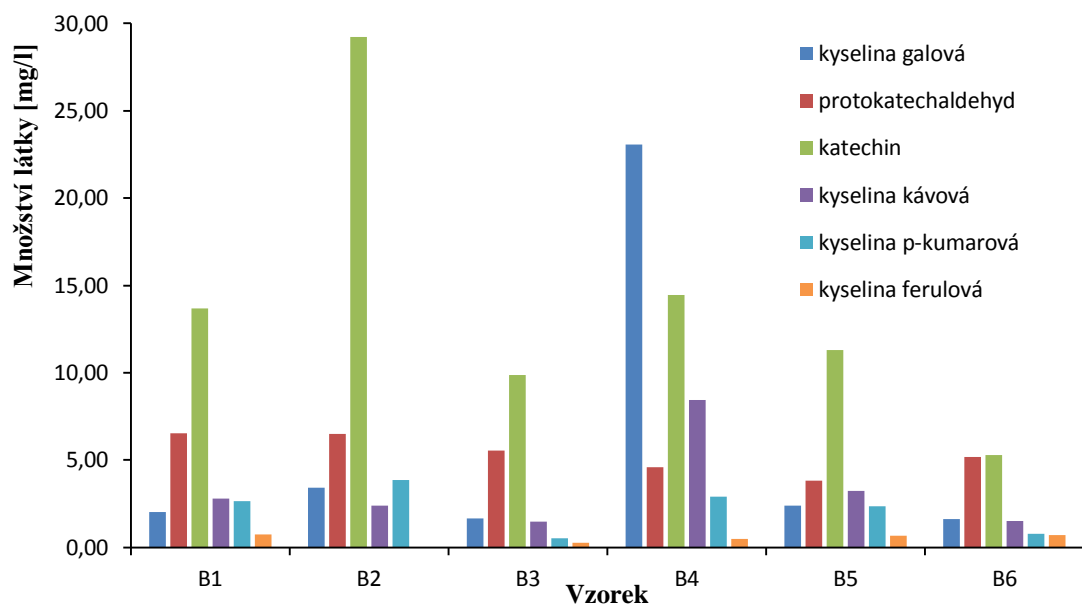
1 – kyselina galová, 2 – protokatechaldehyd, 3 – katechin, 4 – kyselina kávová, 5 – kyselina p-kumarová, 6 – kyselina ferulová, x – deriváty katechinu, y – kyselina kaftarová

Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); MF A - 10 mM octan amonný okyselený kyselinou octovou na pH~3; MF B - 80 % acetonitrilu + 20 % MF A; průtok 0,4 ml/min; gradientová eluce: 0 min – 0 % MF B; 30 min – 20 % MF B; 40 min – 50 % MF B; 50 min – 80 % MF B; 55 min – 80 % MF B; teplota 40 °C; detekce při vlnových délkách 280 nm a 320 nm; dávkovaný objem 10 μ l

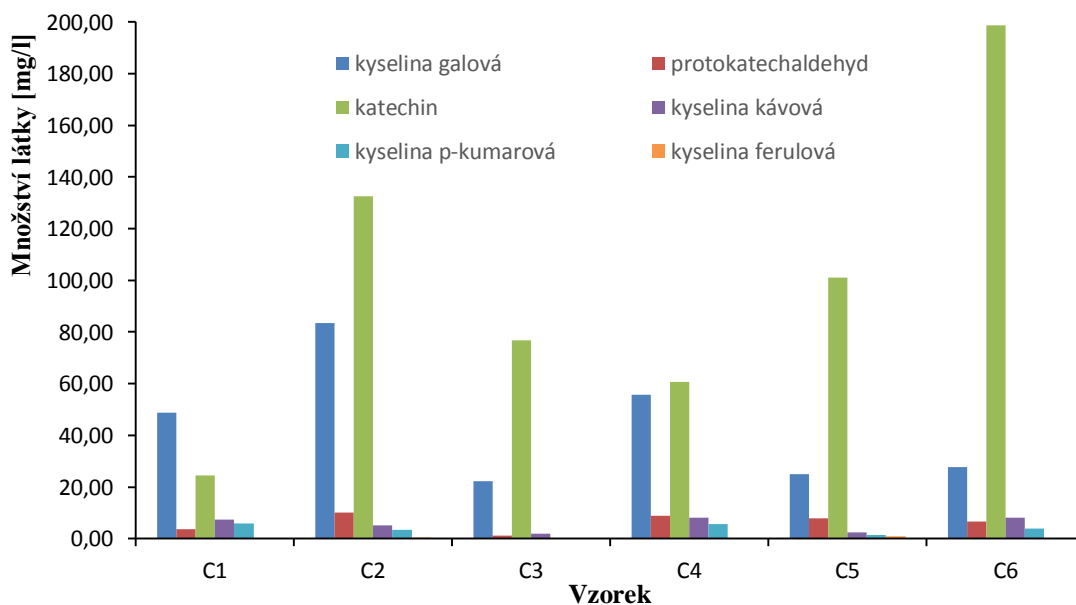
Podle UV-VIS spektra a podle prostudované literatury byl identifikován pík s retenčním časem 8,08 min jako kyselina kaftarová, jejíž standard nebyl k dispozici. Tato fenolická látka se vyskytovala ve všech vzorcích analyzovaných vín jako jedna z dominantních. Naprostá většina separovaných látek vykazovala absorpční maximum při 280 nm. UV-VIS spektra většiny z těchto látek byla podobná spektru katechinu. Lze tedy předpokládat, že se jedná právě o deriváty katechinů. Součet procentuálního

zastoupení ploch píků těchto látek, analyzovaných při 280 nm, tvořil cca 40 – 50 % ze všech fenolických látek.

Kvantifikováno bylo šest fenolických látek. Množství jednotlivých látek ve vzorcích vín znázorňují obrázky 14 a 15, konkrétní hodnoty jsou zaznamenány v tabulce v příloze XV.



Obrázek 14: Množství fenolických látek ve vzorcích bílých vín
B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé



Obrázek 15: Množství fenolických látek ve vzorcích červených vín
C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Na obrázcích 14 a 15 lze pozorovat znatelný rozdíl mezi červenými a bílými víny. Červená vína obsahují mnohonásobně vyšší koncentrace fenolických látek oproti vínům bílým, což také koreluje s výsledky stanovení antioxidační aktivity a celkového obsahu fenolických látek, popsány v kapitolách 3.2 a 3.3.

U vzorků červených vín ze stanovovaných fenolických látek převládají kyselina galová a katechin. Nejvyšší množství kyseliny galové 83,56 mg/l bylo zjištěno u vzorku „Frankovka C2“, ostatní červená vína obsahovala 22,22 – 55,67 mg/l kyseliny galové. U vzorku „Rulandské modré C6“ ze všech stanovovaných fenolických látek výrazně převládal katechin s hodnotou 198,74 mg/l. U ostatních červených vín bylo množství katechinu v rozmezí 24,47 – 132,48 mg/l. Protokatechaldehyd se pohyboval u červených vín v rozmezí hodnot 1,29 – 10,09 mg/l, kyselina kávová 1,99 – 8,10 mg/l. Kyselina *p*-kumarová dosahovala maximální hodnoty 5,86 mg/l, ale např. u vzorku „Frankovka C3“ nebyla vůbec identifikována. Kyselina ferulová byla stanovena jen u vzorků „Frankovka C2“ a „Rulandské modré C4 a C5“, kdy dosahovala hodnot pouze 0,28 – 0,84 mg/l.

U vzorků bílých vín převládá katechin, a to v množství 5,29 – 29,24 mg/l. Jedinou výjimkou je vzorek „Rulandské šedé B4“, který obsahuje vyšší koncentraci kyseliny galové (23,08 mg/l) než katechinu (14,47 mg/l). U ostatních vzorků bílých vín se kyselina galová pohybuje v rozmezí 1,64 – 3,42 mg/l. Kyselina ferulová dosahuje maximální hodnoty 0,73 mg/l, pro vzorek „Rulandské bílé B2“ nebyla identifikována. Zbylé stanovované fenolické látky se v bílých vínech pohybují v následujících rozmezích koncentrací: protokatechaldehyd 3,84 – 6,54 mg/l, kyselina kávová 1,49 – 8,44 mg/l a kyselina *p*-kumarová 0,51 – 3,88 mg/l.

Porovnáním se studií Šerugova et.al. [88], ve které stanovovali kyselinu galovou, kyselinu kávovou, kyselinu *p*-kumarovou a katechin ve vzorcích červených vín původem z Chorvatska, bylo v této diplomové práci dosaženo podobných výsledků katechinu a kyseliny *p*-kumarové. Získané výsledky pro kyselinu galovou a kávovou byly v této práci nižší. Fenolickými látkami v italských vínech se zabývala také studie Castellariho [89]. Hodnoty kyselin galové, kávové, *p*-kumarové a ferulové lze srovnávat s hodnotami v této práci. Rozdíl byl nalezen v množství katechinu, který ve vínech z České republiky značně převyšoval italská vína. Ve studii italských vín byla kvantifikována také kyselina kaftarová. Její hodnoty se pro červená vína pohybovaly v rozmezí 20 – 75 mg/l, pro bílá vína 12 – 79 mg/l. Kyselina kaftarová nebyla v této

práci kvantifikována, pouze identifikována. Nicméně podle ploch píků této látky může být předpokládáno její vysoké množství ve vzorcích analyzovaných vín.

3.5.2 Výsledky stanovení organických kyselin

Optimalizace podmínek chromatografické analýzy organických kyselin

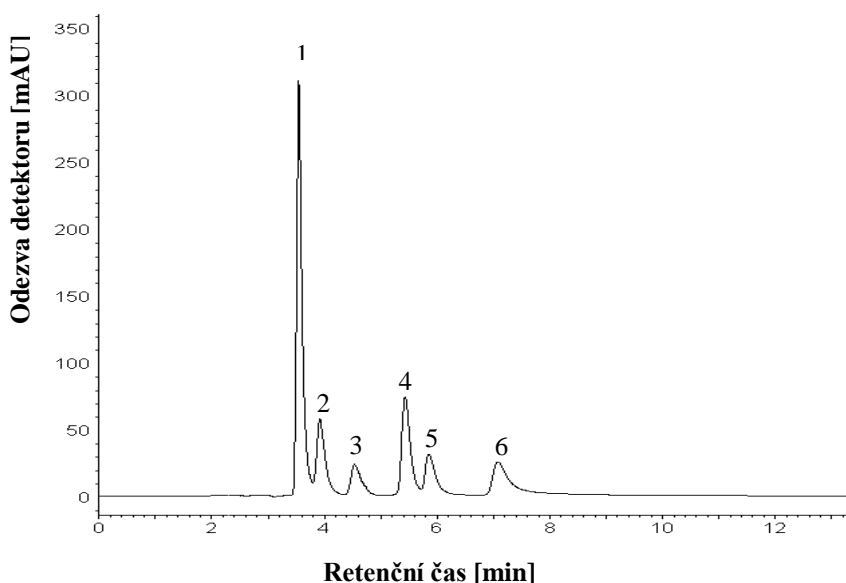
Pro analýzu organických kyselin byla použita kolona Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), která odolává nízkým hodnotám pH. Jako mobilní fáze byla použita redestilovaná voda, okyselená kyselinou sírovou. Pro analýzu byla zvolena isokratická eluce. Optimální pH a průtok mobilní fáze byl testován pomocí standardů stanovovaných organických kyselin. Nejprve bylo zvoleno pH mobilní fáze 2,2 a průtok 1 ml/min a 0,5 ml/min. Použitím průtoku 0,5 ml/min byla získána na pohled lepší analýza než pro průtok 1 ml/min, ale výsledkem obou těchto analýz bylo nedostatečné rozdělení kyselin vinné, jablečné a mléčné. Dalším pokusem bylo použití mobilní fáze o hodnotě pH 2 a vhodnějšího průtoku 0,5 ml/min. Takto byla získána analýza, kdy kyseliny jablečná a mléčná splývaly v jeden pík. Posledním zkoušeným pH mobilní fáze bylo 1,8 s průtokem 0,5 ml/min. Výsledkem byla uspokojivá analýza kyselin vinné, jablečné, mléčné, octové, citronové i jantarové, a tak byly tyto podmínky použity pro všechny další analýzy.

Analýza standardů organických kyselin

K analýze bylo zvoleno šest organických kyselin, očekávaných ve vínech podle literatury: kyselina vinná, kyselina jablečná, kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina citronová a kyselina jantarová. Retenční časy jednotlivých kyselin byly zjištěny analýzami samostatných standardů již během optimalizace pH mobilní fáze a jsou uvedeny v tabulce 5. Byly tedy připraveny jednotlivé kalibrační roztoky standardů, které byly využity pro kvantifikaci látek v jednotlivých vzorcích vín. Rozsah kalibrace byl zvolen podle zkušebního vína a na základě poznatků z prostudované literatury. Parametry kalibračních závislostí standardů jsou součástí tabulky 5. Grafy kalibračních závislostí jsou zobrazeny v přílohách XVI - XXI. Obrázek 16 znázorňuje separaci směsi těchto standardních látek.

Tabulka 5: Retenční časy organických kyselin a parametry jejich kalibračních závislostí

<i>Standardní látka</i>	<i>t_R [min]</i>	<i>Rozsah kalibrace [mg/l]</i>	<i>Rovnice regrese</i>	<i>R²</i>
kyselina vinná	3,58	100 – 500	$y = 5143,1x + 79433$	0,9984
kyselina jablečná	3,95	50 – 300	$y = 3065,7x + 32555$	0,9999
kyselina mléčná	4,54	50 – 300	$y = 2081,8x - 73342$	0,9881
kyselina octová	5,38	25 – 200	$y = 4102,0x - 13416$	0,9943
kyselina citronová	5,81	50 – 300	$y = 2373,2x - 24163$	0,9920
kyselina jantarová	7,01	25 – 200	$y = 3182,1x + 2669$	0,9927



Obrázek 16: Chromatogram směsi standardních látek organických kyselin

1 – kyselina vinná (400 mg/l), 2 – kyselina jablečná (200 mg/l), 3 – kyselina mléčná (200 mg/l), 4 – kyselina octová (200 mg/l), 5 – kyselina citronová (200 mg/l), 6 – kyselina jantarová (200 mg/l)

Podmínky analýzy: Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm); MF – redestilovaná voda okyselená kyselinou sírovou na pH~ 1,8; průtok 0,5 ml/min; isokratická eluce; teplota kolony 35 °C; dávkovaný objem 10 μl; detekce při 210 nm

Podobně jako u fenolických látek, tak i pro organické kyseliny byly stejným způsobem vypočteny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ), které jsou uvedeny v tabulce 6.

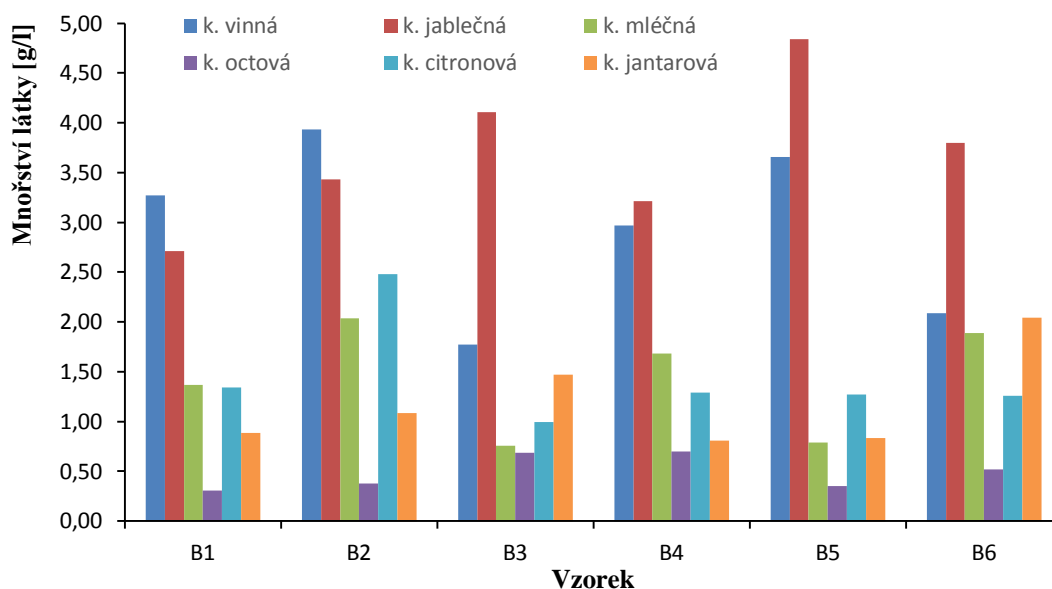
Tabulka 6: Meze detekce a stanovitelnosti organických kyselin

<i>Standardní látka</i>	<i>LOD [mg/l]</i>	<i>LOQ [mg/l]</i>	<i>Standardní látka</i>	<i>LOD [mg/l]</i>	<i>LOQ [mg/l]</i>
kyselina vinná	0,254	0,845	kyselina octová	1,037	3,455
kyselina jablečná	0,616	2,054	kyselina citronová	1,202	4,008
kyselina mléčná	1,910	6,367	kyselina jantarová	1,208	4,027

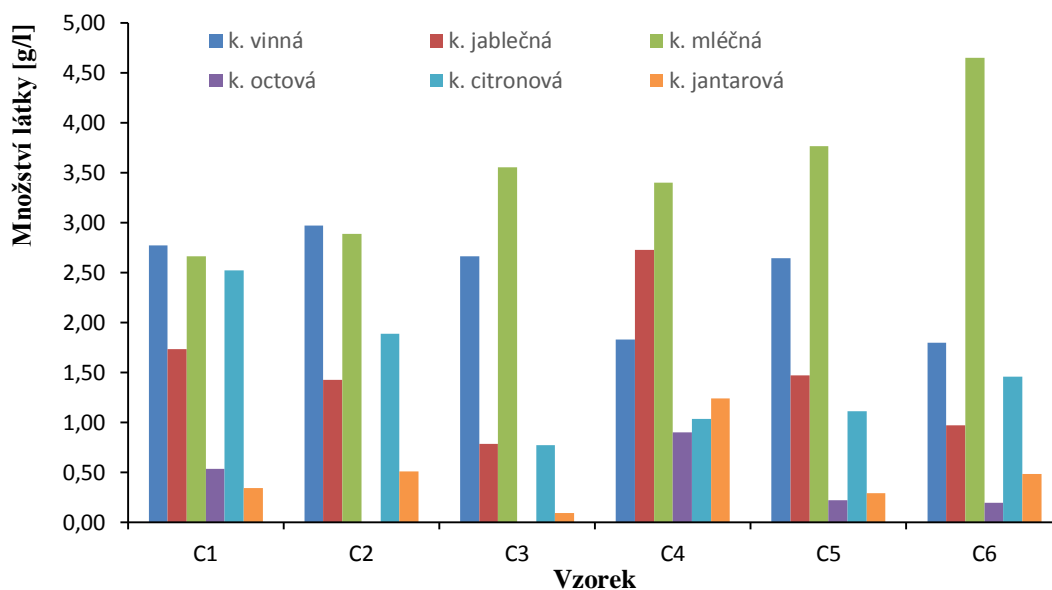
Meze detekce kyselin mléčné, octové, citronové a jantarové se pohybují v rozmezí 1 – 2 mg/l. Pro kyseliny jablečnou a mléčnou byly vypočteny hodnoty mezi nižší.

Organické kyseliny ve vzorcích vín

Vzorky červených i bílých vín byly před analýzou 10x zředěny redestilovanou vodou a poté přefiltrovány přes 0,45 µm PTFE filtr. Stanovované organické kyseliny byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů. Každý vzorek vína byl analyzován třikrát. Ze tří analýz byla vypočtena průměrná hodnota plochy píku pro danou organickou kyselinu, která byla dosazena do rovnice regrese kalibrační přímky. Takto byly vypočítány koncentrace jednotlivých organických kyselin ve vzorcích vín. Výsledky analýz jsou znázorněny na obrázcích 17 a 18. Konkrétní hodnoty výsledků jsou zaznamenány v tabulce v příloze XXII. V příloze XXIII je uveden ukázkový chromatogram vybraného vzorku „Rulandské bílé B3“.



Obrázek 17: Množství organických kyselin ve vzorcích bílých vín
 B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé



Obrázek 18: Množství organických kyselin ve vzorcích červených vín C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Z organických kyselin ve vínech převládají kyseliny vinná, jablečná a mléčná. Toto tvrzení platí také pro vzorky vín, analyzovaných v této diplomové práci. Na obrázcích 17 a 18 je vidět patrný rozdíl mezi červenými a bílými víny. U vzorků bílých vín dominují kyseliny vinná a jablečná, kdežto pro červená vína převládá zastoupení kyselin vinné a mléčné. Tento rozdíl je dán procesem malolaktické fermentace, využívaným zejména u vín červených, jak je uvedeno v kapitole 1.1.2. Podstatou tohoto procesu je totiž to, že kmeny bakterie *Oenococcus oeni* konvertují kyselinu jablečnou na jemnější kyselinu mléčnou. Množství kyseliny jablečné se u bílých vín pohybovalo v rozmezí 2,71 až 4,84 g/l a u vín červených v rozmezí 0,78 – 2,73 g/l. Hodnoty obsahu kyseliny mléčné byly u bílých vín nalezeny v rozmezí 0,76 – 2,03 g/l a u červených vín v rozmezí 2,66 – 4,65 g/l.

Kyselina vinná dosahovala chromatografickou analýzou hodnot v rozmezí 1,77 – 3,93 g/l. Titrační metodou stanovení kyseliny vinné, popsané v kapitole 3.1.1, bylo dosaženo hodnot 1,04 – 2,80 g/l pro stejné vzorky vín. Titrační metodou tedy byly stanoveny nepatrně nižší koncentrace této kyseliny. Důvodem pravděpodobně bude způsob provedení. Kyselina vinná se titračně stanovuje po vysrážení ethanolem ve formě hydrogenvinanu draselného, který je následně filtrován a s filtrem převeden do titrační baňky. Ke ztrátám hydrogenvinanu draselného tak dochází během filtrace, kdy jeho část ulpívá na stěnách kádinky.

Kyselina citronová byla stanovena v rozmezí hodnot 0,77 – 2,52 g/l, koncentrace kyseliny jantarové výrazně nepřesáhla 2 g/l. Množství kyseliny octové dosahovalo

maximální hodnoty 0,9 g/l u vzorku „Rulandské modré C4“. Vyšší koncentrace kyseliny octové jsou nežádoucí, jelikož se jedná o důsledek kažení vína. Již množství okolo 1 g/l se negativně projevuje na chuti vína [9].

Porovnáním se studií Zeravika et.al. [50] bylo v této diplomové práci dosaženo podobných výsledků vyjma kyseliny citronové, která ve zmíněné studii dosahovala hodnot pouze do 0,56 g/l, kdežto v této práci byly získány hodnoty až 2,52 g/l. Příčinou by mohlo být umělé přidávání této kyseliny během výroby vín. Analýzou organických kyselin ve vínech se zabývala také studie Coelhova et.al. [90], která dosáhla podobně rozdílných výsledků mezi červenými a bílými víny, způsobenými malolaktickou fermentací, jako bylo dosaženo v této práci.

3.5.3 Výsledky stanovení anthokyanů

Optimalizace podmínek chromatografické analýzy anthokyanů

Stejně jako pro organické kyseliny byla i pro analýzu anthokyanů použita kolona Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), která je vhodná pro analýzu v oblasti pH pod 2. Barva anthokyanů je totiž závislá na hodnotě pH. V kyselém prostředí mají anthokyany červenou barvu, v zásaditém prostředí se barva anthokyanů mění na modrou nebo zelenou, čímž se mění také vlnová délka světla, absorbovaného tímto barvivem. Proto byla používaná mobilní fáze okyselována kyselinou sírovou na nízké hodnoty pH. Byly zkoušeny dvě mobilní fáze o pH 1,5 a 1,8. Separace anthokyanů se s měnícím pH mobilní fáze nijak výrazně nelišily, proto bylo zvoleno shodné pH mobilní fáze jako pro analýzu organických kyselin, tedy 1,8.

Vzhledem k rozměrům kolony byl zvolen průtok mobilní fáze 1 ml/min. Pro první pokusnou analýzu byl nastaven lineární gradient mobilní fáze 0 – 40 min: 0 – 100 % MF B. Tento gradient byl nejprve vyzkoušen pro směs standardních látek a následně také pro zkušební vzorek vína. Separace standardních látek i vzorku byla uspokojivá, proto zvolený gradient nebyl dále upravován a byl použit pro všechny analýzy.

Analýza standardů anthokyanů

Ze standardních látek, očekávaných podle literatury ve vínech, byly dostupné tři: delfinidin-3-*o*-glukosid, kyanidin-3-*o*-glukosid a malvidin-3-*o*-glukosid. Pro zjištění retenčních časů těchto látek byly jednotlivé standardy nejprve analyzovány zvlášť. Následně byl připraven směsný roztok standardů a jednotlivé kalibrační roztoky, které

sloužily ke kvantifikaci látek v jednotlivých vzorcích vín. Rozsah kalibrace byl zvolen podle zkušebního vína a na základě prostudované literatury. Parametry kalibračních závislostí standardů včetně jejich retenčních časů jsou uvedeny v tabulce 7. Grafy kalibračních závislostí jsou zobrazeny v přílohách XXIV – XXVI.

Tabulka 7: Retenční časy anthokyanů a parametry jejich kalibračních závislostí

<i>Standardní látka</i>	<i>t_R [min]</i>	<i>Rozsah kalibrace [mg/l]</i>	<i>Rovnice regrese</i>	<i>R²</i>
delfinidin-3- <i>o</i> -glukosid	14,10	0,5 – 15,0	y = 64129x - 1516,1	0,9968
kyanidin-3- <i>o</i> -glukosid	15,05	0,5 – 15,0	y = 36003x - 4368,1	0,9950
malvidin-3- <i>o</i> -glukosid	17,10	10,0 – 110,0	y = 66234x - 140864	0,9941

Stejným způsobem jako u předchozích stanovení byly také pro anthokyany stanoveny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Vypočtené hodnoty mezí detekce i stanovitelnosti jsou v tabulce 8.

Tabulka 8: Meze detekce a stanovitelnosti anthokyanů

<i>Standardní látka</i>	<i>LOD [μg/l]</i>	<i>LOQ [μg/l]</i>
delfinidin-3- <i>o</i> -glukosid	9,1	30,4
kyanidin-3- <i>o</i> -glukosid	16,7	55,5
malvidin-3- <i>o</i> -glukosid	19,2	64,2

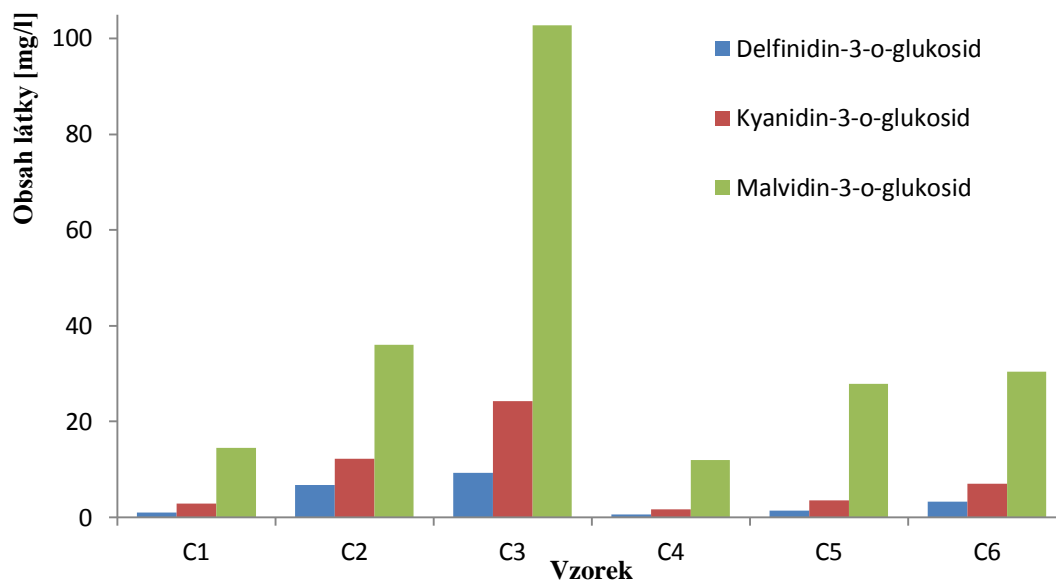
Meze detekce a stanovitelnosti se pro jednotlivé anthokyany liší. Zajímavé je, že nejvyšší hodnoty těchto mezí byly vypočteny pro malvidin-3-*o*-glukosid, který je také ve všech vzorcích vín obsažen v nejvyšších koncentracích. Stejně tak nejnižší meze byly vypočteny pro delfinidin-3-*o*-glukosid, vyskytující se ve vzorcích v nejnižších koncentracích.

Anthokyany ve vzorcích vín

Anthokyany, jakožto červená barviva, jsou součástí červených vín, nikoliv bílých. Analýza proto byla provedena pouze u vzorků červených vín. Ta nebyla před analýzou nijak upravována, neředěná vína byla pouze přefiltrována přes 0,45 μm PTFE filtr.

Na základě porovnání retenčních časů byly identifikovány tři výše uvedené anthokyany. Ze tří analýz každého vzorku vína byla vypočtena průměrná hodnota plochy píku pro daný anthokyan a z rovnice regrese kalibrační přímky byla vypočítána jeho koncentrace ve vzorku. Výsledky stanovení jsou znázorněny na obrázku 19,

konkrétní výsledky jsou zaznamenány v tabulce v příloze XXVII. Obsahem přílohy XXVIII je také ukázkový chromatogram vzorku „Frankovka C3“.



Obrázek 19: Množství anthokyanů ve vzorcích červených vín;
C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Jak je vidět na obrázku 19, ve všech vzorcích vín ze stanovovaných anthokyanů zcela převládá malvidin-3-*o*-glukosid. Vůbec nejvyšší hodnoty stanovovaných anthokyanů byly nalezeny ve vzorku „Frankovka C3“, kdy malvidin-3-*o*-glukosid dosáhl průměrné hodnoty 102,8 mg/l, kyanidin-3-*o*-glukosid 24,2 mg/l a delfinidin-3-*o*-glukosid 9,3 mg/l. Ostatní vzorky obsahovaly malvidin-3-*o*-glukosid v rozmezí 11,97 – 36,06 mg/l, kyanidin-3-*o*-glukosid v rozmezí 1,72 – 12,29 mg/l a delfinidin-3-*o*-glukosid v rozmezí 0,54 – 6,78 mg/l. Je známo, že během zrání vína dochází k reakcím anthokyanů s jinými složkami vína za vzniku derivátů anthokyanů odlišné barvy. To by vysvětlovalo nejvyšší nalezené koncentrace u vzorku „Frankovka C3“, která je ročníku 2017, tedy nejmladší. Zajímavým poznatkem také je, že u všech vzorků červených vín zůstává zachováno pořadí stanovovaných anthokyanů podle koncentrace. U každého vzorku červeného vína byla nalezena nejvyšší koncentrace malvidin-3-*o*-glukosidu, druhým zastoupeným byl kyanidin-3-*o*-glukosid a nejnižší koncentrace byla stanovena pro delfinidin-3-*o*-glukosid.

Porovnáním se studií Romera-Fernándeze et.al. [91], lze hodnoty získané v této diplomové práci označit za podobné. Shodný je zejména výrazně vyšší podíl malvidin-3-*o*-glukosidu oproti ostatním stanoveným anthokyanům, což dokazuje také studie Alecova et.al. [92].

3.5.4 Výsledky stanovení těkavých látek

Optimalizace podmínek chromatografické analýzy těkavých látek

Analýza vybraných těkavých látek byla zvolena jako zajímavý doplněk souboru analýz jednotlivých parametrů. První volba podmínek chromatografické separace tak byla zvolena podle diplomové práce J. Bryndy [81]. Nejprve byly analyzovány vybrané standardní látky, které byly stanoveny ve zmíněné diplomové práci. Byl zvolen nástřik 1 μl každého standardu se splitovacím poměrem 100. Takto byly zjištěny retenční časy vybraných standardů a teplotní gradient byl zkrácen podle posledního eluujícího se standardu tak, jak je popsáno v podmínkách uvedených v kapitole 2.4.4.

Následně bylo optimalizováno dávkování vzorku vína. Pro dávkování vzorku byla zvolena technika „headspace“, byl tedy dávkován plyn nad hladinou kapaliny. Do 50 ml vialky s uzavíratelným septem bylo odměřeno 15 ml vzorku vína. K uvolnění těkavých látek z kapaliny byla vialka umístěna na 40 minut do termostatu, vyhřátého na 70 °C. Poté bylo pomocí Hamiltonovy stříkačky dávkováno 5, 50 a 100 μl plynu bez použití splitu. Dále bylo zkoušeno dávkování stejných objemů plynu po umístění vialky na 40 minut do termostatu vyhřátého na 60 °C. Za optimální podmínky bylo zvoleno dávkování 50 μl plynné fáze z vialky temperované po dobu 40 minut na 60 °C. Při teplotě 60 °C totiž nedocházelo k deformaci prvních dvou píků (ethylacetát a methanol), na rozdíl od teploty 70 °C, která je velice blízká bodům varu těchto dvou látek. Při vyšší teplotě tak pravděpodobně docházelo k degradaci ethylacetátu a methanolu.

Analýza standardů těkavých látek

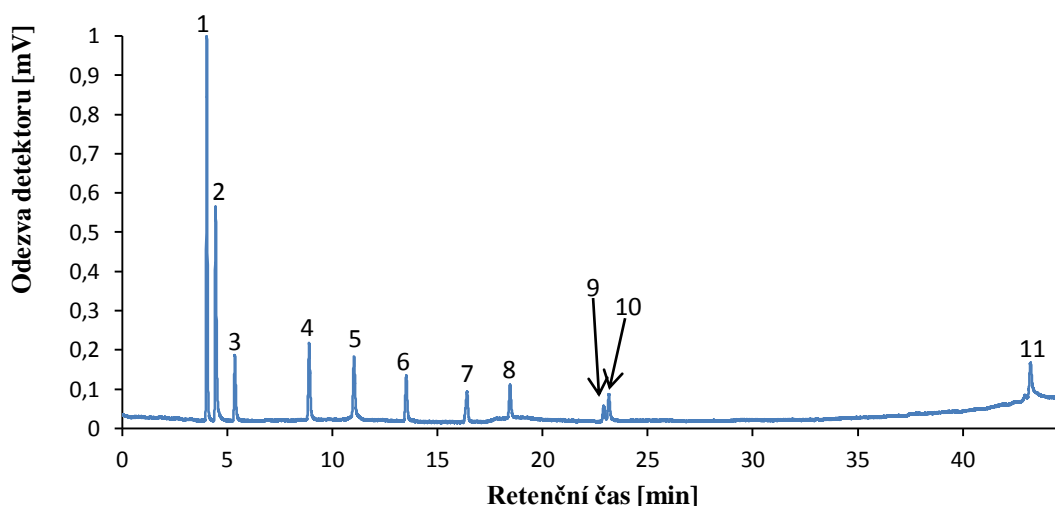
K tomuto stanovení bylo vybráno celkem 11 standardních látek. Přehled těchto standardů včetně jejich bodů varu a retenčních časů je uveden v tabulce 9.

Tabulka 9: Přehled bodů varu a retenčních časů těkavých látek

<i>Látka</i>	<i>Bod varu [°C]</i>	<i>t_R [min]</i>
ethylacetát	77,1	4,03
methanol	64,7	4,45
ethanol	78,4	5,36
n-propylalkohol	97,1	9,16
isobutanol	107,9	11,37
n-butanol	117,7	13,85

<i>Látka</i>	<i>Bod varu [°C]</i>	<i>t_R [min]</i>
isoamylalkohol	131,1	16,69
pentanol	136,0	18,73
ethylaktát	154,0	23,07
hexanol	156,0	23,36
kyselina hexanová	205,0	43,27

Z uvedených standardů byla připravena jejich směs smícháním 1 ml každého standardu kromě kyseliny hexanové, která oproti ostatním vykazovala velice nízkou odezvu detektoru, proto byly do směsi přidány 3 ml této kyseliny. Tato směs byla zahřívána za stejných podmínek jako vzorky vín a poté bylo z headspace prostoru dávkováno 5 μ l plynu do plynového chromatografu. Takto byl získán chromatogram, znázorněný na obrázku 20.



Obrázek 20: Chromatogram směsi těkavých látek;

1 - ethylacetát, 2 - methanol, 3 - ethanol, 4 - n-propylalkohol, 5 - isobutanol, 6 - n-butanol, 7 - isoamylalkohol, 8 - pentanol, 9 - ethylaktát, 10 - hexanol, 11 - kyselina hexanová

Podmínky analýzy: Supelcowax 10 (15 m x 0,32 mm; 0,5 μ m film PEG), nosný plyn dusík, teplotní program - počáteční teplota 40 °C po dobu 5 min; následně nárůst o 3 °C/min na teplotu 155 °C, která byla zachována po dobu 5 min, teplota injektoru 240 °C, teplota detektoru 250 °C, dávkovaný objem 5 μ l

Těkavé látky ve vzorcích vín

Z vybraných standardů bylo ve vzorcích vín identifikováno 10 látek. V žádném ze vzorků nebyl nalezen pentanol. Zastoupení těchto látek bylo vyhodnoceno jako procentuální podíl z ploch všech píků dané analýzy vyjma ethanolu, který tvoří majoritní složku těkavých látek. Každý vzorek vína byl analyzován třikrát a průměrné

hodnoty z analýz jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11. Ukázkové chromatogramy bílého a červeného vína jsou součástí příloh XXIX a XXX.

Na rozdíl od standardů nedošlo u všech vzorků vín, zřejmě vlivem vyšších koncentrací, k separaci ethylacetátu a methanolu. Stejně tak nedošlo k rozdělení ethyllaktátu a hexanolu u vzorku „Rulandské šedé B4“.

Tabulka 10: Zastoupení sledovaných těkavých látek ve vzorcích bílých vín

<i>Látka</i>	<i>Množství látky ve vzorku vína v %</i>					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
ethylacetát + methanol	30,3	30,6	18,1	19,3	25,9	13,6
n-propylalkohol	4,0	2,2	1,8	1,2	2,2	2,7
isobutanol	1,6	3,0	3,1	1,1	3	6,7
n-butanol	0,6	0,4	-	0,1	0,3	-
isoamylalkohol	11,9	19,9	15,8	9,4	23,2	20,7
ethyllaktát	0,1	0,5	0,8	18,5	0,1	0,6
Hexanol	0,1	0,5	1,0		0,6	0,9
kyselina hexanová	0,4	0,4	0,3	0,5	-	0,5

*B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé,

Tabulka 11: Zastoupení sledovaných těkavých látek ve vzorcích červených vín

<i>Látka</i>	<i>Množství látky ve vzorku vína v %</i>					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
ethylacetát + methanol	26,5	36,1	18,6	31,6	33,0	29,5
n-propylalkohol	0,8	0,8	0,7	1,1	2,8	0,9
isobutanol	2,6	4,7	2,3	3,6	4,5	8,2
n-butanol	1,4	0,3	-	0,1	0,3	-
isoamylalkohol	13,9	20,8	15,2	14,4	30,6	17,1
ethyllaktát	0,5	0,2	1,0	2,1	0,1	0,3
Hexanol	0,7	0,2	0,8	4,1	0,2	0,5
kyselina hexanová	0,3	-	0,2	0,4	-	0,1

*C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

Z uvedených dat je patrné, že rozdíl mezi červenými a bílými víny není nijak zásadní. Neuvažujeme-li ethanol, který se podle údajů z etiket pohyboval v rozmezí 12 – 14 % obj., pak by nejvyšší procentuální zastoupení u všech vzorků vín představovaly látky ethylacetát s methanolem, které však mají oproti ostatním

standardním látkám výrazně vyšší odezvy, jak je patrné z obrázku 20. Proto lze za nejvíce zastoupenou těkavou látku označit isoamylalkohol, který se mírou odezvy vyrovnává všem ostatním a jeho procentuální zastoupení podle ploch píků se pohybuje v rozmezí 9,4 – 30,6 %. Ostatní těkavé látky se vyskytují převážně do 1 %, ojediněle přesahují 5 %. Jedinou výjimkou je výrazně vyšší koncentrace ethyllaktátu a hexanolu u vzorku „Rulandské šedé B4“. Zajímavostí je úplná absence *n*-butanolu u vzorků „Rulandské bílé B3“, „Rulandské šedé B6“, Frankovka C3“ a „Rulandské modré C6“, které na rozdíl od ostatních vín pocházejí z vinařské oblasti Čechy. Lze tedy konstatovat, že na celkovém aromatickém dojmu vín se podílí kombinace obrovského množství látek, která je ovlivněna mimo jiné umístěním vinic.

4 Závěr

Cílem této práce bylo stanovení vybraných charakteristických skupin látek ve vzorcích 12 vín. Jednalo se o 6 červených a 6 bílých vín, která svým původem zastupovala všechny vinařské podoblasti v České republice. Pomocí kapalinové chromatografie bylo ve vzorcích vín stanoveno množství fenolických látek, organických kyselin a anthokyanů. Z fenolických látek byly kvantifikovány kyselina galová, protokatechaldehyd, katechin, kyselina kávová, kyselina *p*-kumarová a kyselina ferulová, kdy v nejvyšším množství byl zastoupen katechin. Zastoupení ostatních látek bylo dosti různorodé. Z hlediska množství fenolických látek byl pozorován zejména rozdíl mezi červenými a bílými víny. Červená vína obsahovala výrazně vyšší koncentrace fenolických látek, což je dáno procesem výroby. Vedle chromatografické analýzy bylo provedeno také spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity (za použití DPPH a ABTS radikálů) a celkového obsahu fenolických látek. Také antioxidační aktivita byla mnohem vyšší u červených vín. Antioxidační účinky vykazují také anthokyaniny, což jsou červená barviva, obsažená v červených vínech. Stanoven byl obsah delphinidin-3-*o*-glukosidu, kyanidin-3-*o*-glukosidu a malvidin-3-*o*-glukosidu. Všechny vzorky červených vín obsahovaly nejvíce malvidin-3-*o*-glukosidu. Pomocí kapalinové chromatografie bylo dále ve vínech stanoveno šest organických kyselin – kyseliny vinná, jablečná, mléčná, octová, citronová a jantarová. U bílých vín převládaly kyseliny vinná a jablečná, kdežto u červených vín, vlivem malolaktické fermentace, kyseliny vinná a mléčná. Stanovení kyseliny vinné a celkové kyselosti vína bylo provedeno také titračně. Získané hodnoty byly porovnány s naměřenými hodnotami pH vín, které je ovlivněno zejména poměrem kyselin vinné a jablečné. Pro doplnění souboru analýz bylo u jednotlivých vín jodometricky stanoveno množství redukujících cukrů. Zajímavým doplňkem bylo stanovení několika aromatických látek pomocí plynové chromatografie. Ve vzorcích vín tak bylo identifikováno deset těkavých látek, které se společně podílejí na výsledném aromatickém dojmu.

Závěrem lze konstatovat, že chemické složení vín je velice rozmanité. Na zastoupení jednotlivých látek má vliv mnoho faktorů, jako je půdní podloží či klimatické podmínky, které se mohou rok od roku lišit. Ke změnám ve skladbě látek též dochází během procesu zrání vína.

Seznam použité literatury

- [1] MRKOSKI, M. M., J. GARAVAGLIA, A. OLIVEIRA, J. OLIVEAS a A. MARCADENTI. Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits. *Nutrition and metabolic insights*. 2016, **9**, 51–57.
- [2] GOOLD, H. D., H. KROUKAMP, T. C. WILLIAMS, I. T. PAULSEN, C. VERELA a I. S. PRETORIUS. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology*. 2017, **10**(2), 264–278.
- [3] WIEL, A Van De, P H M Van GOLDE a H Ch HART. Blessings of the grape. *European journal of internal medicine*. 2001, **12**(6), 484–489.
- [4] ZEPPA, G. The science and technology of wine making. *Scientific, information & consultancy services for the food industry* [online]. 2007 [cit. 16.10. 2017]. Dostupné z: <https://www.dairyscience.info/index.php/science-and-technology-of-wine/124-the-science-and-technology-of-wine-making.html>
- [5] MULERO, J., F. PARDO a P. ZAFRILLA. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010, **23**, 569–574.
- [6] WANG, R., Q. SUN a Q. CHANG. Soil Types Effect on Grape and Wine Composition in Helan Mountain Area of Ningxia. *PLOS ONE*. 2015, **10**(2),1–12.
- [7] *VÝROBA VÍNA KROK ZA KROKEM* [online]. [cit. 28. 1. 2018]. Dostupné z: <https://www.vinovnici.cz/clanek/30-vyroba-vina-krok-za-krokem>
- [8] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002.
- [9] PAVLOUŠEK, P. a P. BUREŠOVÁ. *Vše co byste měli vědět o víně...a nemáte se koho zeptat*. Praha: Grada. 2015.
- [10] *Data a fakta o vinařství v České republice* [online]. [cit. 12. 12. 2017]. Dostupné z: <https://www.wineofczechrepublic.cz/images/pdf/wineofczechrepublic.cz-pro-novinare.pdf>
- [11] *Vinařské oblasti, podoblasti a vinařské obce Moravy a Čech* [online]. [cit. 12. 12. 2017]. Dostupné z: <http://www.evinice.cz/o-vine/vinarske-oblasti-cr>
- [12] *Vinařské oblasti České republiky* [online]. 2015 [cit. 12. 12. 2017]. Dostupné z: <http://www.vinostyl.cz/clanky/vinarske-oblasti-ceske-republiky>

- [13] KOŠIR, I. J. a J. KIDRIČ. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **458**(1), 77–84.
- [14] COOPER, H. J. a A. G. MARSHALL. Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001, **49**(3), 5710–5718.
- [15] NICULESCU, M., T. ERICHSEN, V. SUKHAREV, Z. KERENYI, E. CSÖREGI a W. SCHUHMANN. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **463**(1), 39–51.
- [16] SWIEGERS, J. H, E. J. BARTOWSKY, P. A. HENSCHKE a I. S. PRETORIUS. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2005, **11**(2), 139–173.
- [17] *Sacharidy* [online]. [cit. 8. 12. 2017]. Dostupné z: <http://www.komenskeho66.cz/materialy/chemie/WEB-CHEMIE9/sacharidy.html>
- [18] PAMBIANCHI, D. Measuring Residual Sugar: Techniques. *Wine Maker* [online]. 2002 [cit. 28. 10. 2017]. Dostupné z: <https://winemakermag.com/501-measuring-residual-sugar-techniques>
- [19] TRONCHONI, J., A. GAMERO, F. N. ARROYO-LÓPEZ, E. BARRIO a A. QUEROL. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, **134**(3), 237–243.
- [20] FERNÁNDEZ-NOVALES, J., M. I. LÓPEZ, M. T. SÁNCHEZ, J. MORALES a V. GONZÁLEZ-CABALLERO. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. *Food Research International*. 2009, **42**(2), 285–291.
- [21] *Obrázky struktur standardních látek* [online]. [cit. 8. 12. 2017]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com>
- [22] KRUZLICOVA, D., Ž. FIKET a G. KNIEWALD. Classification of Croatian wine varieties using multivariate analysis of data obtained by high resolution ICP-MS analysis. *Food Research International*. 2013, **54**(1), 621–626.

- [23] CLIFF, M. A., M. C. KING a J. SCHLOSSER. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*. 2007, **40**(1), 92–100.
- [24] GARRIDO, J. a F. BORGES. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*. 2013, **54**(2), 1844–1858.
- [25] BELMIRO, T. M. C., C. F. PEREIRA a A. P. S. PAIM. Red wines from South America: Content of phenolic compounds and chemometric distinction by origin. *Microchemical Journal*. 2017, **133**, 114–120.
- [26] LACHMAN, J., M. ŠULC, A. HEJTMÁNKOVÁ, V. PIVEC a M. ORSÁK. Content of polyphenolic antioxidants and trans -resveratrol in grapes of different varieties of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Hort. Sci. (Prague)*. 2004, **31**(2), 63–69.
- [27] ANLI, R. E. a N. VURAL. Antioxidant Phenolic Substances of Turkish Red Wines from Different Wine Regions. *Open Access Molecules*. 2009, **14**, 289–297.
- [28] FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. *Life Science*. 2000, **66**(8), 663–673.
- [29] ARESTA, A., P. COTUGNO, F. MASSARI a C. ZAMBONIN. Determination of Trans-resveratrol in Wines, Spirits, and Grape Juices Using Solid-Phase Micro Extraction Coupled to Liquid Chromatography with UV Diode-Array Detection. *Food Analytical Methods*. 2018, **11**(2), 426–431.
- [30] DONNA, L. Di, D. TAVERNA, S. INDELICATO, A. NAPOLI, G. SINDONA a F. MAZZOTTI. Rapid assay of resveratrol in red wine by paper spray tandem mass spectrometry and isotope dilution. *Food Chemistry*. 2017, **229**, 354–357.
- [31] CHEN, K., C. ESCOTT, I. LOIRA, J. M. del FRESNO, A. MORATA, W. TESTAYE, F. CALDERON, S. BENITO a J. A. SUÁREZ-LEPE. The Effects of Pre-Fermentative Addition of Oenological Tannins on Wine Components and Sensorial Qualities of Red Wine. *Molecules*. 2016, **21**(11).
- [32] MUDNIC, I., D. MODUN, V. RASTIJA, J. VUKOVIC, I. BRIZIC, V. KATALINIC, B. KOZINA, M. MEDIC-SARIC a M. BOBAN. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*. 2010, **119**(3), 1205–1210.

- [33] MENDOZA, L., B. MATSUHIRO, M. J. AGUIRRE, M. ISAACS, G. SOTÉS, M. COTORAS a R. MELO. Characterization of Phenolic Acids Profile from Chilean Red Wines by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2011, **2**(56), 688–691.
- [34] MORENO-ARRIBAS, M. V. a M. C. POLO. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer. 2009.
- [35] DEMYTTENAERE, J. C. R., C. DAGHER, P. SANDRA, S. KALLITHRAKA, R. VERHÉ a N. D. KIMPE. Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003, **985**(1-2), 233–246.
- [36] ZHU, F., B. DU a J. LI. Aroma Compounds in Wine. *INTECH open science* [online]. 2016 [cit. 23. 10. 2017]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/grape-and-wine-biotechnology/aroma-compounds-in-wine>
- [37] PEINADO, R. A., J. MORENO, J. E. BUENO, J. A. MORENO a J. C. MAURICIO. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*. 2004, **84**(4), 585–590.
- [38] SUMBY, K. M., P. R. GRBIN a V. JIRANEK. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*. 2010, **121**(1), 1–16.
- [39] GOMÉZ-ALONSO, S., I. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ a E. GARCÍA-ROMERO. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007, **55**(3), 608–613.
- [40] HÉBERGER, K., E. CSOMÓS a L. SIMON-SARKADI. Principal Component and Linear Discriminant Analyses of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Hungarian Wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003, **51**(27), 8055–8060.
- [41] KALAČ, P. a P. KRAUSOVÁ. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. 2005, **90**, 219–230.

- [42] VILLIERS, A., F. LYNEN, A. CROUCH a P. SANDRA. Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine. *Chromatographia*. 2004, **59**(7/8), 403–409.
- [43] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. Praha: Grada. 2010.
- [44] CORTEZ, P., A. CERDEIRA, F. ALMEIDA, T. MATOS a J. REIS. Modeling wine preferences by data mining from physicochemical properties. *Decision Support Systems*. 2009, **47**, 547–553.
- [45] MURRAY, J. M., C. M. DELAHUNTY a I. A. BAXTER. Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International*. 2001, **34**, 461–471.
- [46] LACHENMEIER, D. W., R. GODELMANN, M. STEINER, B. ANSAY, J. WEIGEL a G. KRIEG. Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor. *Chemistry Central Journal*. 2010, **5**(4), 1–10.
- [47] BOYACI, I. H., H. E. GENIS, B. GUVEN, U. TAMER a N. ALPER. A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2012, **43**(8), 1171–1176.
- [48] B. ROIG a O. THOMAS. UV monitoring of sugars during wine making. *Carbohydrate Research*. 2003, **338**, 79–83.
- [49] FERNÁNDEZ-NOVALES, J., M. I. LÓPEZ, M. T. SÁNCHEZ, J. A. GARCÍA a J. MORALES. A feasibility study on the use of a miniature fiber optic NIR spectrometer for the prediction of volumic mass and reducing sugars in white wine fermentations. *Journal of Food Engineering*. 2008, **89**, 325–329.
- [50] ZERAVIK, J., Z. FOHLEROVA, M. MILOVANOVIC, O. KUBESA, M. ZEISBERGEROVA, K. LACINA, A. PETROVIC, Z. GLATZ a P. SKLADAL. Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. *Food Chemistry*. 2016, **194**, 432–440.
- [51] PERES, R. G., E. P. MORAES, G. A. MICKE, F. G. TONIN, M. F. M. TAVARES a D. B. RODRIGUEZ-AMAYA. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control*. 2009, **20**(6), 548–552.

- [52] VAHL, K., H. KAHLERT, L. MÜHLEN, A. ALBRECHT a G. MEYER. Determination of the titratable acidity and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis. *Talanta*. 2013, **111**, 134–139.
- [53] CARRASCON, V., I. ONTANÓN, M. BUENO a V. FERREIRA. Gas chromatography-mass spectrometry strategies for the accurate and sensitive speciation of sulfur dioxide in wine. *Journal of Chromatography A*. 2017, **1504**, 27–34.
- [54] IVANOVA-PETROPULOS, V., D. PETRUSEVA a S. MITREV. Methods for determination of SO₂ and reducing sugars in wines and alcoholic beverages. *Yearbook*. 2015, **13**(1), 119–127.
- [55] WANG, X., J. LIU, X. WANG, B. SHAO, L. LIU a J. ZHANG. Direct quantification of total sulfur dioxide in wine using triple quadrupole ICP-MS. *Analytical Methods*. 2015, **7**, 3224–3228.
- [56] COZZOLINO, D., M. J. KWIATKOWSKI, R. G. DAMBERGS, W. U. CYNKAR, L. J. JANIK, G. SKOUROUMOUNIS a M. GISHEN. Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Talanta*. 2008, **74**(4), 711–716.
- [57] DUTRA, S. V., L. ADAMI, A. R. MARCON, G.J. CARNIELI, C. A. ROANI, F. R. SPINELLI, S. LEONARDELLI a R. VANDERLINDE. Characterization of wines according the geographical origin by analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values. *Food Chemistry*. 2013, **141**(3), 2148–2153.
- [58] BOSCHETTI, W., A. R. BORGES, A. T. DUARTE, M. B. DESSUY, M. G. R. VALE, J. B. ANDRADE a B. WELZ. Simultaneous determination of Mo and Ni in wine and soil amendments by HR-CS GF AAS. *Analytical Methods*. 2014, **12**(6), 4247–4256.
- [59] HERBERT, P., P. BARROS, N. RATOLA a A. ALVES. HPLC Determination of Amino Acids in Musts and Port Wine Using OPA/FMOC Derivatives. *Food Chemistry and Toxicology*. 2000, **65**(7), 1130–1133.
- [60] ZHANG, M., Q. PAN, G. YAN a Ch. DUAN. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. *Food Chemistry*. 2011, **125**(2), 743–749.
- [61] HARBERTSON, J. F. a S. SPAYD. Measuring Phenolics in the Winery. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2006, **57**(3), 280–288.

- [62] CETIN, E. S., D. ALTINOZ, E. TARCAN a N. G. BAYDAR. Chemical composition of grape canes. *Industrial Crops and Products*. 2011, **34**, 994–998.
- [63] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004, **98**, 174–179.
- [64] BALASUNDRAM, N., K. SUNDRAM a S. SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, **99**, 191–203.
- [65] ALAM, M. N., N. J. BRISTI a M. RAFIQUAZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, **21**, 143–152.
- [66] MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*. 2004, **26**(2), 211–219.
- [67] *Stanovení antioxidantů* [online]. [cit. 30. 1. 2018]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52974
- [68] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990.
- [69] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, 2013.
- [70] BARKOVICH, M. High performance liquid chromatography. *Libre Texts* [online]. 2017 [cit. 3. 12. 2017]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_performance_liquid_chromatography
- [71] *Types of High Performance Liquid Chromatography Injectors* [online]. [cit. 9. 12. 2017]. Dostupné z: <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-12/>
- [72] POOLE, C. *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier. 2012.
- [73] JENNINGS, W. a T. SHIBAMOTO. *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*. San Francisco: Academic Press, 1980.

- [74] LORENZO, Ch. D., M. BADEA, F. COLOMBO, F. ORGIU, G. FRIGERIO, R. F. PASTOR a P. RESTANI. Antioxidant activity of wine assessed by different in vitro methods. *BIO Web of Conferences* [online]. 2017, **9**. Dostupné z: https://www.bio-conferences.org/articles/bioconf/full_html/2017/02/bioconf-oiv2017_04008/bioconf-oiv2017_04008.html#T1
- [75] ALEIXANDRE-TUDO, J. L., H. NIEUWOUDT, J. L. ALEIXANDRE a W. TOIT. Chemometric compositional analysis of phenolic compounds in fermenting samples and wines using different infrared spectroscopy techniques. *Talanta*. 2018, **176**, 526–536.
- [76] CASTRO, G., L. PÉREZ-MAYÁN, T. RODRÍGUEZ-CABO, I. RODRÍGUEZ, M. RAMIL a R. CELA. Multianalyte, high-throughput liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the sensitive determination of fungicides and insecticides in wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, **410**(3), 1139–1150.
- [77] PANG, L., P. YANG, R. PANG, X. LU, J. XIAO, S. LI, H. ZHANG a J. ZHAO. Ionogel-Based Ionic Liquid Coating for Solid-Phase Microextraction of Organophosphorus Pesticides from Wine and Juice Samples. *Food Analytical Methods*. 2018, **11**(1), 270–281.
- [78] YONG, W., T. GUO, P. FANG, J. LIU, Y. DONG a F. ZHANG. Direct determination of multi-pesticides in wine by ambient mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2017, **417**, 53–57.
- [79] CETÓ, X., A. GONZÁLEZ-CALABUIG, N. CRESPO, S. PÉREZ, J. CAPDEVILA, A. PUIG-PUJOL a M. VALL. Electronic tongues to assess wine sensory descriptors. *Talanta*. 2017, **162**, 218–224.
- [80] NEORALOVÁ, Z. *Analýza resveratrolu a dalších antioxidantů ve víně*. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2014.
- [81] BRYNDA, J. *Chromatografická analýza vína*. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2011.
- [82] KREJČOVÁ, D. *Analýza významných bioaktivních látek ve stévii sladké*. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2012.
- [83] KRÍŽ, M. *Analýza organických kyselin v medovině*. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2017.
- [84] Česká technická norma ČSN 56 0216, Metody zkoušení révových vín, tokajských vín a vín sladových. 1964.

- [85] *Vinařská laboratoř - Něco málo o analytech vína* [online]. [cit. 14. 4. 2018]. Dostupné z: <http://www.vinarska-laborator.cz/analyty.php>
- [86] PAVLOUŠEK, P. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada. 2011.
- [87] SARTOR, S., V. CALIARI, L. I. MALINOVSKI, I. MAIA, T. BORDIGNON-LUIZ a M. BORDIGNON-LUIZ. Bioactive profiling of polyphenolics and oenological properties of red wines from Italian grapes (*Vitis vinifera* L.) cultivated in a selected subtropical region. *International Journal of Food Properties*. 2017, **20**(2), 1319–1328.
- [88] ŠERUGA, M., I. NOVAK a L. JAKOBEK. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 2011, **124**, 1208–1216.
- [89] CASTELLARI, M., A. SARTINI, A. FABIANI, G. ARFELLI a A. AMATI. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*. 2002, **973**, 221–227.
- [90] COELHO, E. M., C. V. S. PADILHA, G. A. MISKINS, A. G. BARROSO, G. E. PEREIRA, Azevedo L. C a M. S. LIMA. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018, **66**, 160–167.
- [91] ROMERA-FERNÁNDEZ, M., L. A. BERRUETA, S. GARMÓN-LOBATO, B. GALLO, F. VICENTE a J. M. MOREDA. Feasibility study of FT-MIR spectroscopy and PLS-R for the fast determination of anthocyanins in wine. *Talanta*. 2012, **88**, 303–310.
- [92] ALECU, A., C. ALBU, S. C. LITESCU, S. A. V. EREMIA a G. L. RADU. Phenolic and Anthocyanin Profile of Valea Calugareasca Red Wines by HPLC-PDA-MS and MALDI-TOF Analysis. *Food Analytical Methods*. 2016, **9**(2), 300–310.

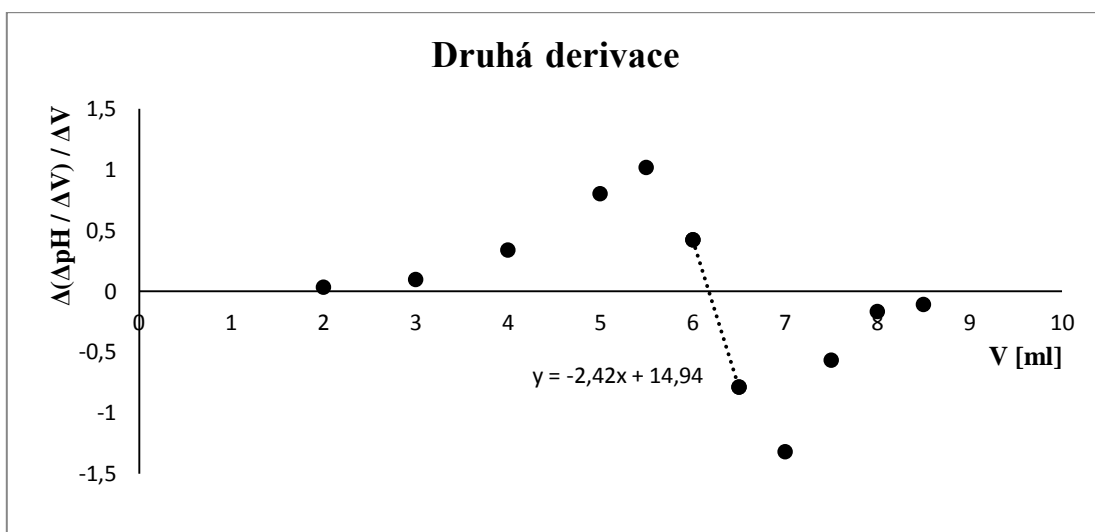
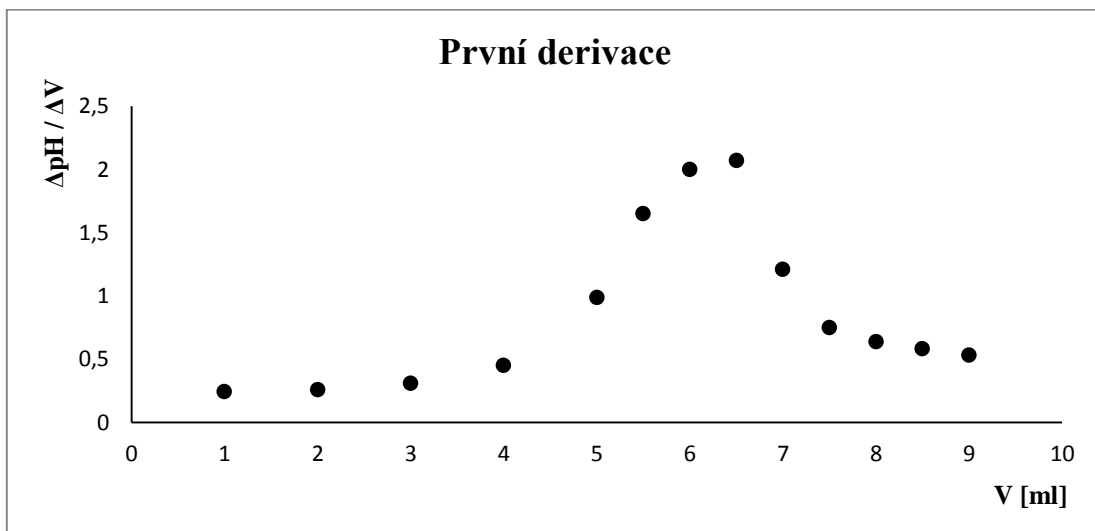
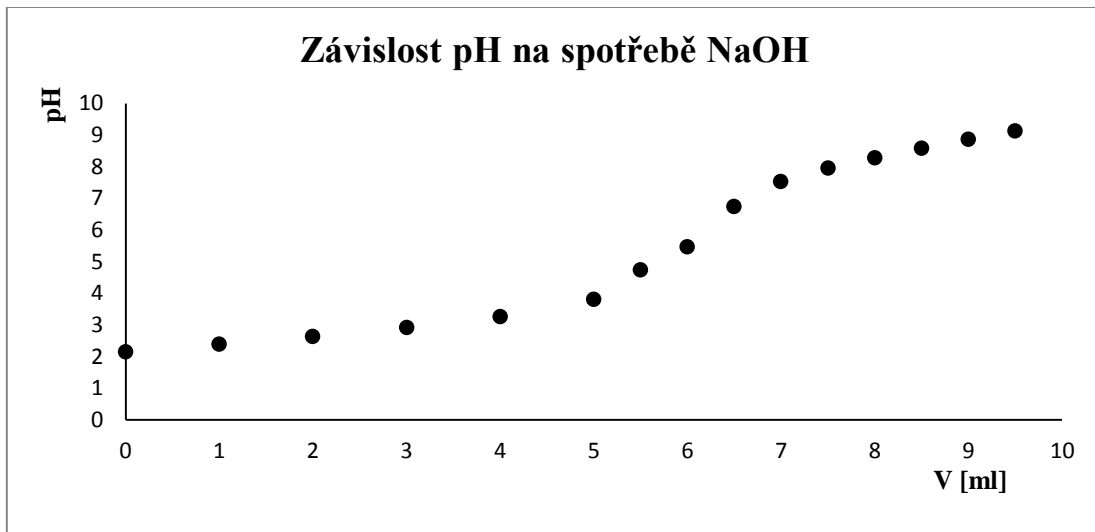
Seznam příloh

Příloha I:	Grafická závislost stanovení celkové kyselosti vína “Rulandské modré C5”
Příloha II:	Tabulka pro odečtení množství redukujících cukrů ve víně
Příloha III:	Množství redukujících cukrů v jednotlivých vzorcích vín
Příloha IV:	Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH
Příloha V:	Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS
Příloha VI:	Antioxidační aktivita a celkový obsah fenolických látek (TPC) u jednotlivých vzorků vín
Příloha VII:	Kalibrační křivka kyseliny galové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích vín
Příloha VIII:	Kalibrační křivka kyseliny galové
Příloha IX:	Kalibrační křivka protokatechaldehydu
Příloha X:	Kalibrační křivka katechinu
Příloha XI:	Kalibrační křivka kyseliny kávové
Příloha XII:	Kalibrační křivka kyseliny <i>p</i> -kumarové
Příloha XIII:	Kalibrační křivka kyseliny ferulové
Příloha XIV:	Chromatogram směsi fenolických látek při 280 nm a 320 nm
Příloha XV:	Výsledky stanovení fenolických látek ve vzorcích vín
Příloha XVI:	Kalibrační křivka kyseliny vinné
Příloha XVII:	Kalibrační křivka kyseliny jablečné
Příloha XVIII:	Kalibrační křivka kyseliny mléčné
Příloha XIX:	Kalibrační křivka kyseliny octové
Příloha XX:	Kalibrační křivka kyseliny citronové
Příloha XXI:	Kalibrační křivka kyseliny jantarové
Příloha XXII:	Výsledky stanovení organických kyselin ve vzorcích vín
Příloha XXIII:	Chromatogram organických kyselin ve vzorku vína „Rulandské bílé B3“
Příloha XXIV:	Kalibrační křivka delfinidin-3- <i>o</i> -glukosidu
Příloha XXV:	Kalibrační křivka kyanidin-3- <i>o</i> -glukosidu
Příloha XXVI:	Kalibrační křivka malvidin-3- <i>o</i> -glukosidu

- Příloha XXVII: Výsledky stanovení anthokyanů ve vzorcích červených vín
- Příloha XXVIII: Chromatogram anthokyanů vzorku „Frankovka C3“
- Příloha XXIX: Chromatogram těkavých látek ve vzorku vína „Frankovka C2“
- Příloha XXX: Chromatogram těkavých látek ve vzorku vína „Rulandské bílé B1“

Přílohy

Příloha I: Grafická závislost stanovení celkové kyselosti vína "Rulandské modré C5"



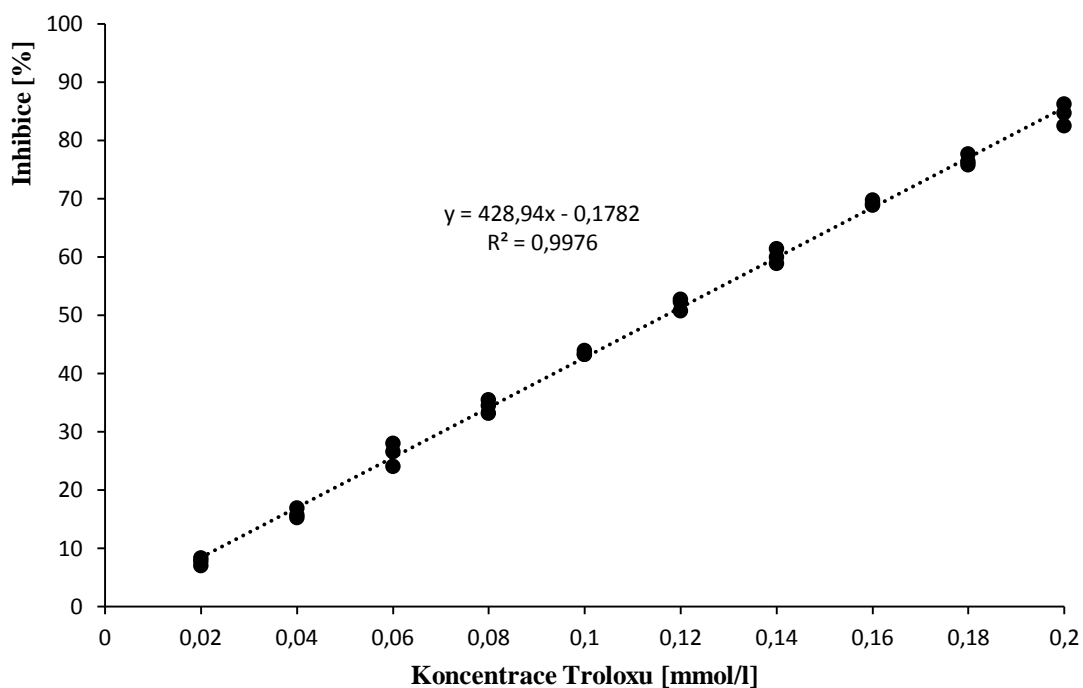
Příloha II: Tabulka pro odečtení množství redukujících cukrů ve víně

Počet ml 0,1 N jodového roztoku	Počet desetin ml 0,1 N jodového roztoku									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	gramy invertního cukru v 1 l vína									
0	0,0	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4
1	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7
2	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0
3	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3
4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,7
5	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,9	1,9	1,9	2,0	2,0
6	2,0	2,1	2,1	2,1	2,2	2,2	2,2	2,3	2,3	2,3
7	2,4	2,4	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6	2,6
8	2,7	2,7	2,7	2,8	2,8	2,8	2,9	2,9	2,9	3,0
9	3,0	3,0	3,1	3,1	3,1	3,2	3,2	3,2	3,3	3,3
10	3,3	3,4	3,4	3,4	3,5	3,5	3,5	3,6	3,6	3,6
11	3,7	3,7	3,7	3,8	3,8	3,8	3,9	3,9	3,9	4,0
12	4,0	4,0	4,1	4,1	4,1	4,2	4,2	4,2	4,3	4,3
13	4,3	4,4	4,4	4,4	4,5	4,5	4,5	4,6	4,6	4,6
14	4,7	4,7	4,7	4,7	4,8	4,8	4,8	4,9	4,9	4,9
15	5,0	5,0	5,0	5,1	5,1	5,1	5,2	5,2	5,2	5,3

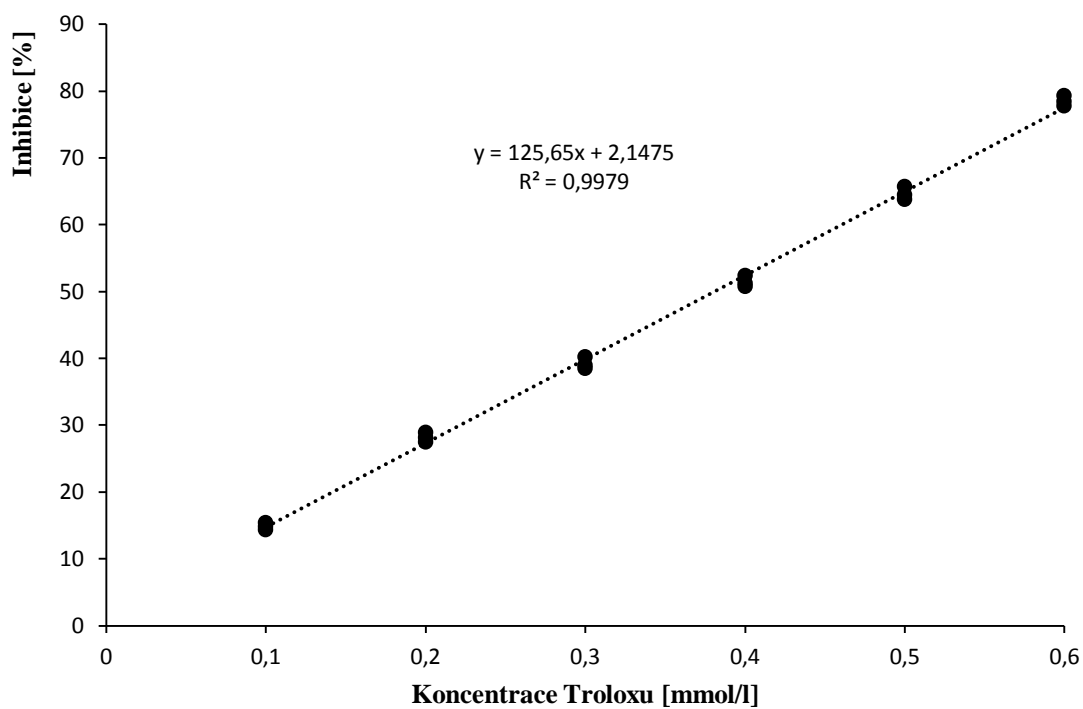
Příloha III: Množství redukujících cukrů v jednotlivých vzorcích vín

<i>Vzorek</i>	<i>Typ vína</i>	<i>Redukující cukry [g/l]</i>	<i>Vzorek</i>	<i>Typ vína</i>	<i>Redukující cukry [g/l]</i>
RULANDSKÉ BÍLÉ (B1)	suché	6,2	FRANKOVKA (C1)	suché	3,6
RULANDSKÉ BÍLÉ (B2)	polosuché	16	FRANKOVKA (C2)	suché	3,7
RULANDSKÉ BÍLÉ (B3)	suché	3,9	FRANKOVKA (C3)	suché	3,0
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B4)	suché	3,5	RULANDSKÉ MODRÉ (C4)	suché	3,1
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B5)	polosladké	17	RULANDSKÉ MODRÉ (C5)	suché	3,1
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B6)	polosladké	23	RULANDSKÉ MODRÉ (C6)	suché	3,7

Příloha IV: Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH



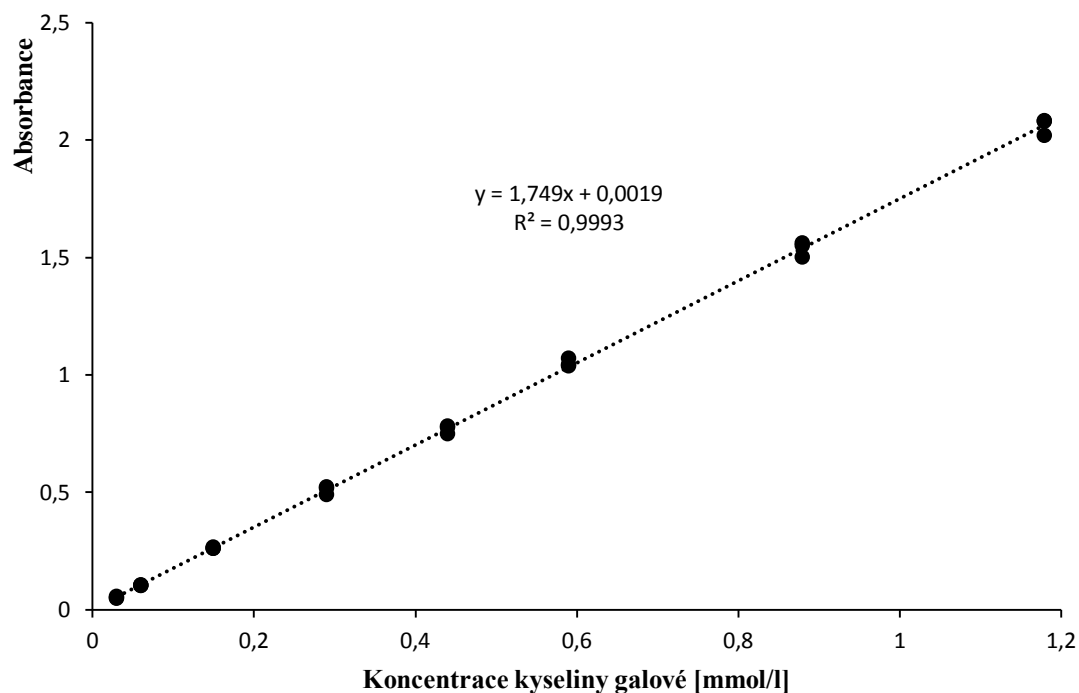
Příloha V: Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS



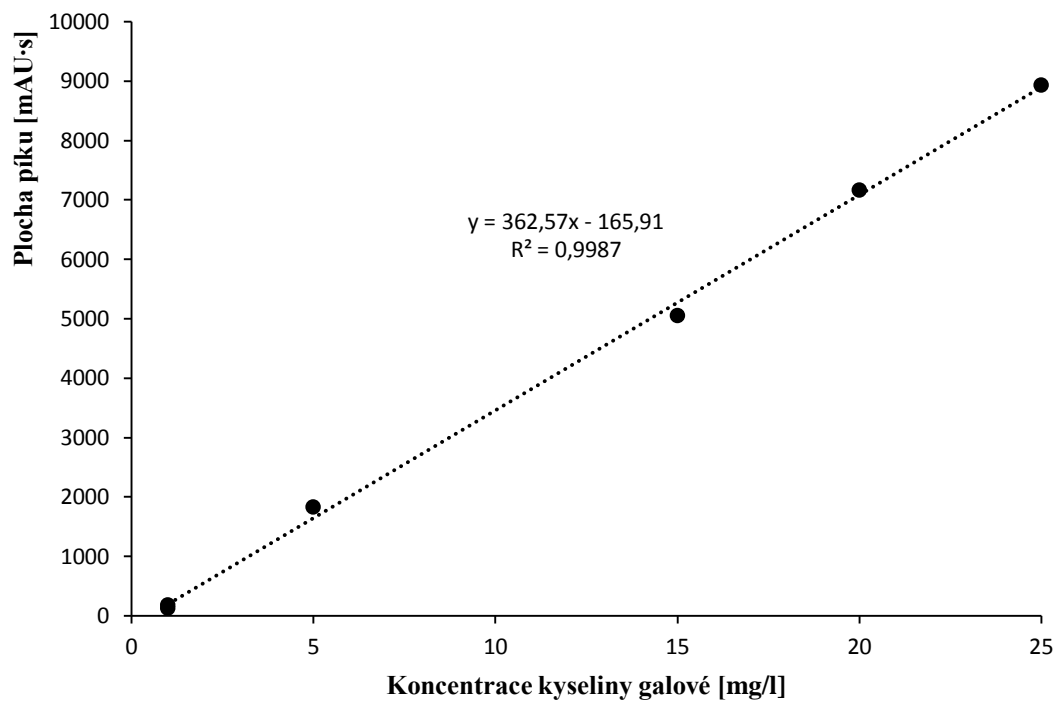
Příloha VI: Antioxidační aktivita a celkový obsah fenolických látek (TPC) u jednotlivých vzorků vín

<i>Vzorek</i>	<i>TEAC metodou DPPH [mmol/l ± SD]</i>	<i>TEAC metodou ABTS [mmol/l ± SD]</i>	<i>GAE pro TPC [mmol/l ± SD]</i>
RULANDSKÉ BÍLÉ (B1)	0,49 ± 0,02	3,72 ± 0,12	1,09 ± 0,03
RULANDSKÉ BÍLÉ (B2)	0,44 ± 0,10	2,98 ± 0,11	0,87 ± 0,04
RULANDSKÉ BÍLÉ (B3)	0,53 ± 0,01	2,88 ± 0,06	1,00 ± 0,04
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B4)	1,08 ± 0,02	4,49 ± 0,09	1,64 ± 0,13
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B5)	0,49 ± 0,10	3,00 ± 0,10	0,83 ± 0,01
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B6)	0,50 ± 0,01	3,32 ± 0,13	1,03 ± 0,04
FRANKOVKA (C1)	4,73 ± 0,11	17,79 ± 0,87	3,43 ± 0,63
FRANKOVKA (C2)	7,96 ± 0,19	38,27 ± 0,70	7,64 ± 0,11
FRANKOVKA (C3)	5,86 ± 0,22	16,32 ± 0,52	3,22 ± 0,42
RULANDSKÉ MODRÉ (C4)	5,02 ± 0,29	15,43 ± 0,81	3,32 ± 0,43
RULANDSKÉ MODRÉ (C5)	3,89 ± 0,09	18,41 ± 0,52	3,35 ± 0,14
RULANDSKÉ MODRÉ (C6)	11,12 ± 0,07	26,85 ± 0,79	4,71 ± 0,36

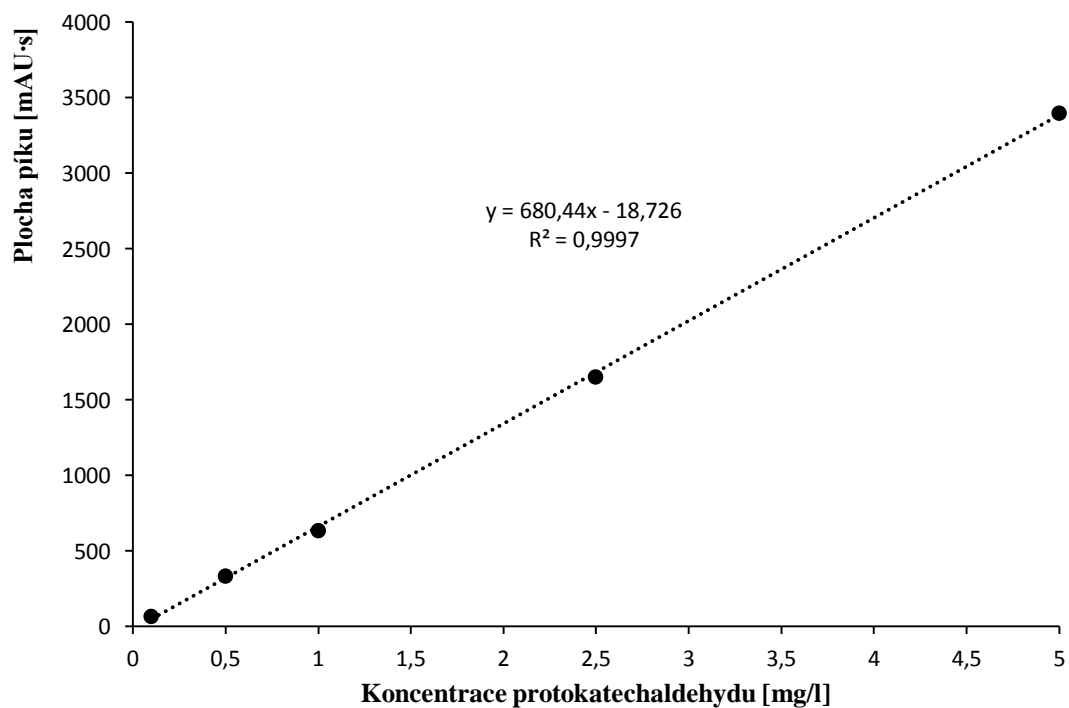
Příloha VII: Kalibrační křivka kyseliny galové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích vín



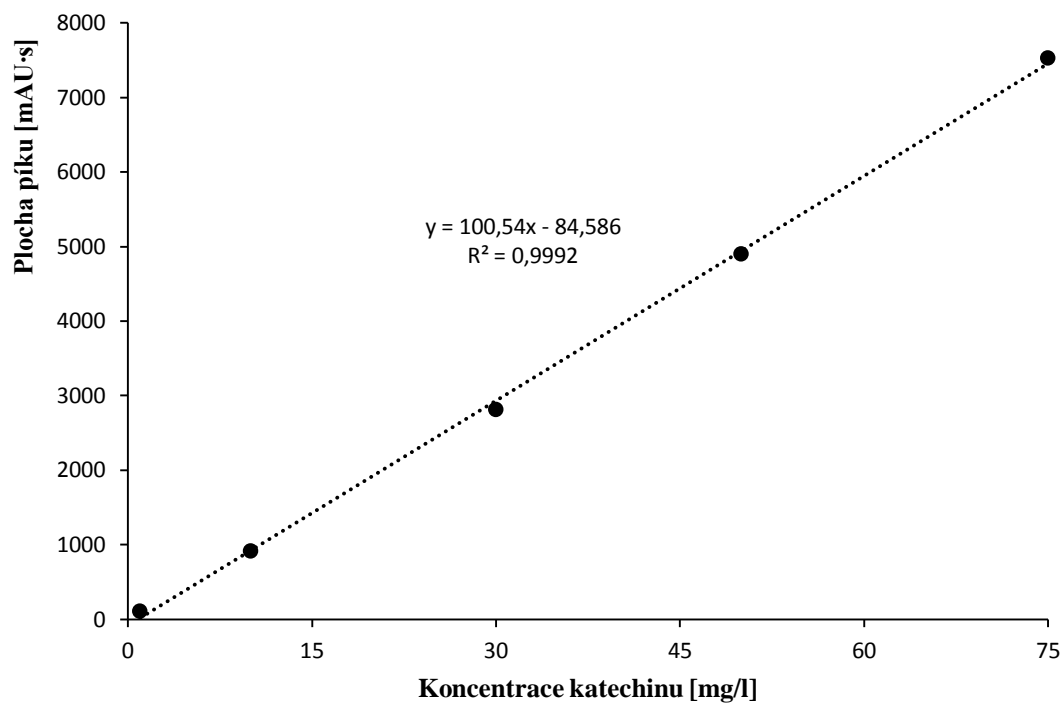
Příloha VIII: Kalibrační křivka kyseliny galové



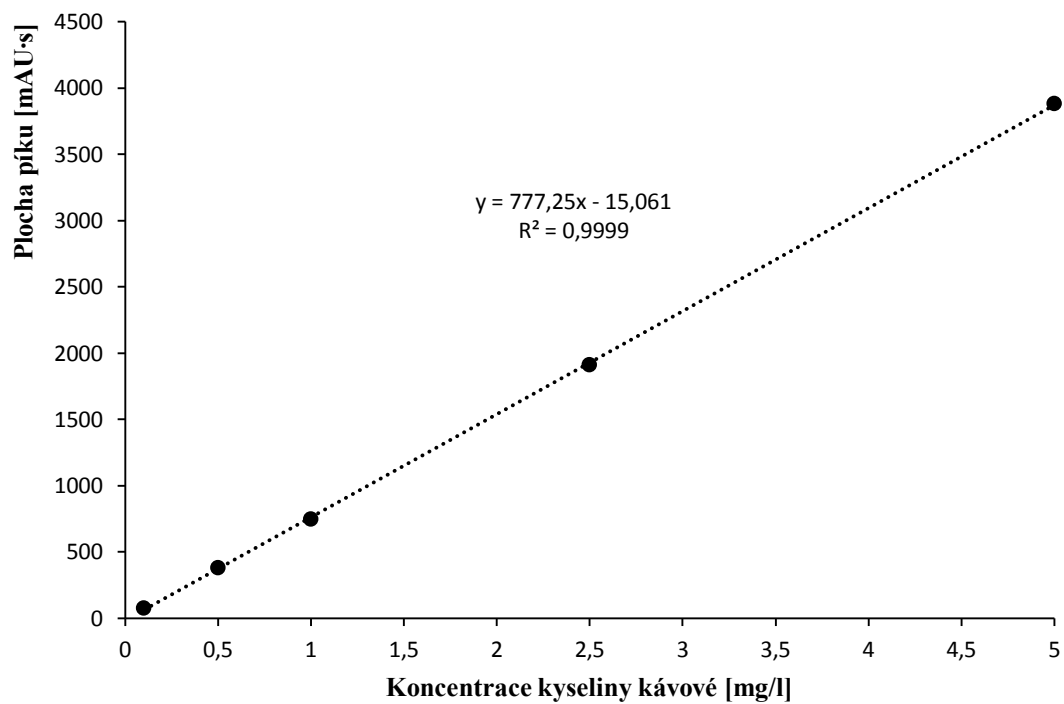
Příloha IX: Kalibrační křivka protokatechaldehydu



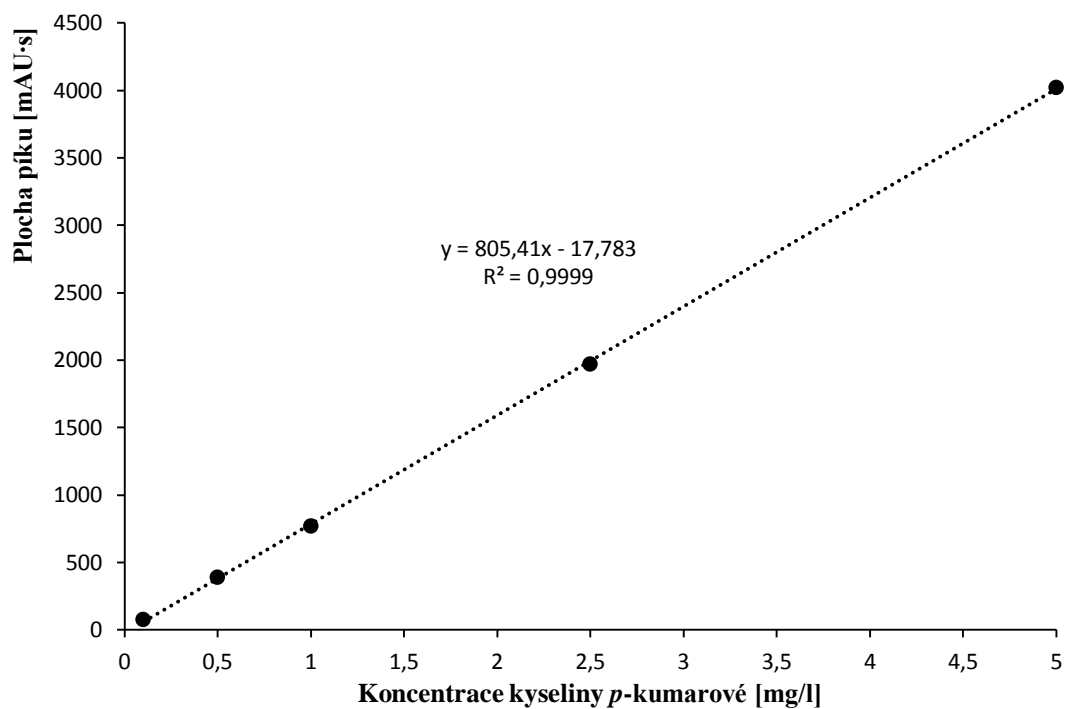
Příloha X: Kalibrační křivka katechinu



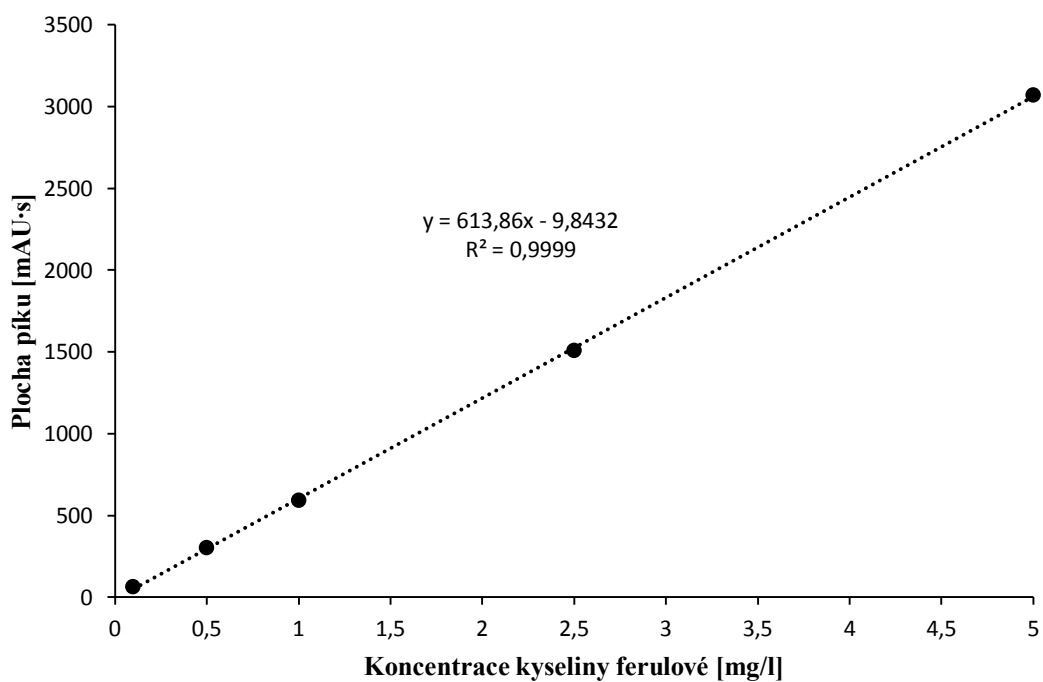
Příloha XI: Kalibrační křivka kyseliny kávové



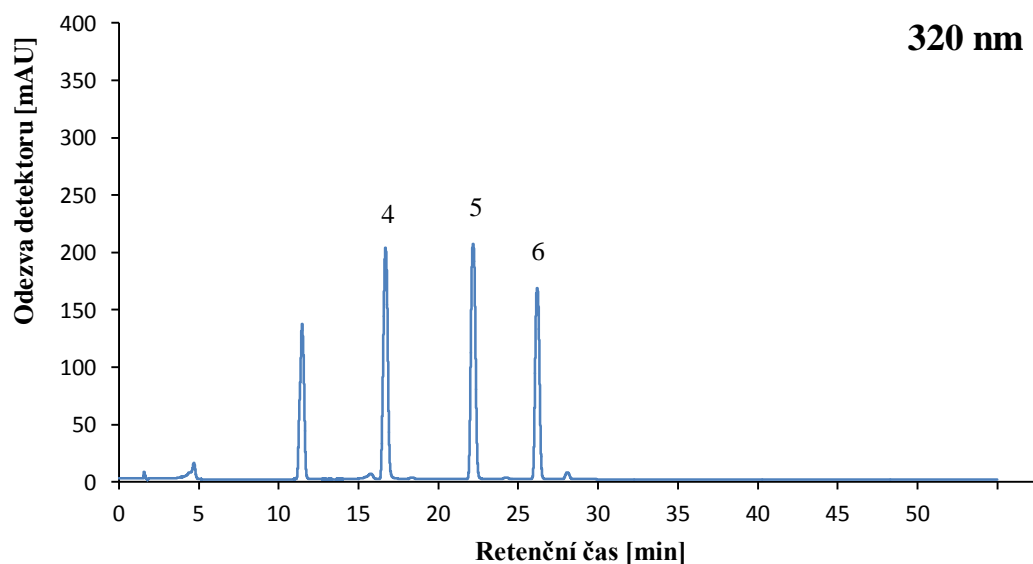
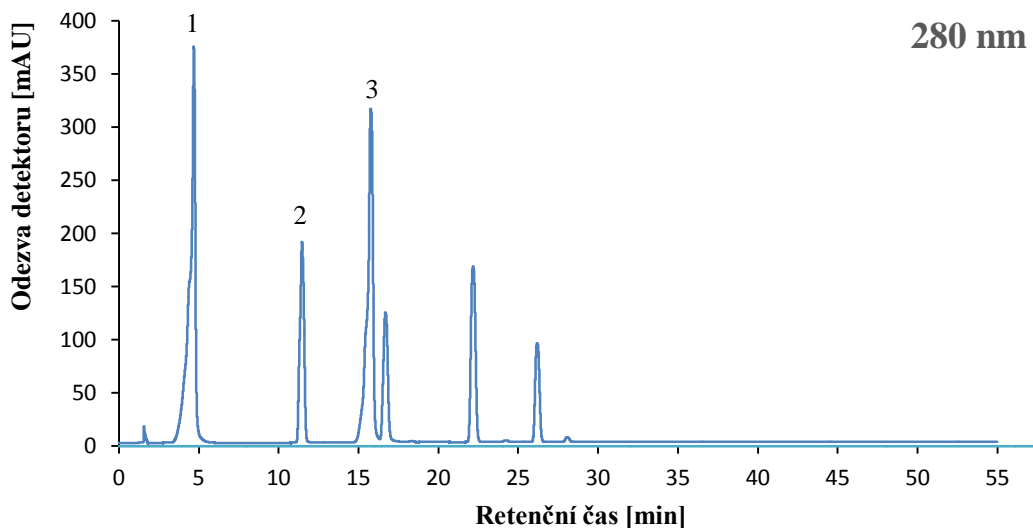
Příloha XII: Kalibrační křivka kyseliny *p*-kumarové



Příloha XIII: Kalibrační křivka kyseliny ferulové



Příloha XIV: Chromatogram směsi fenolických látek při 280 nm a 320 nm



1 – kyselina galová (25 mg/l), 2 – protokatechaldehyd (5 mg/l), 3 – katechin (75 mg/l), 4 – kyselina kávová (5 mg/l), 5 – kyselina p-kumarová (5 mg/l), 6 – kyselina ferulová (5 mg/l)

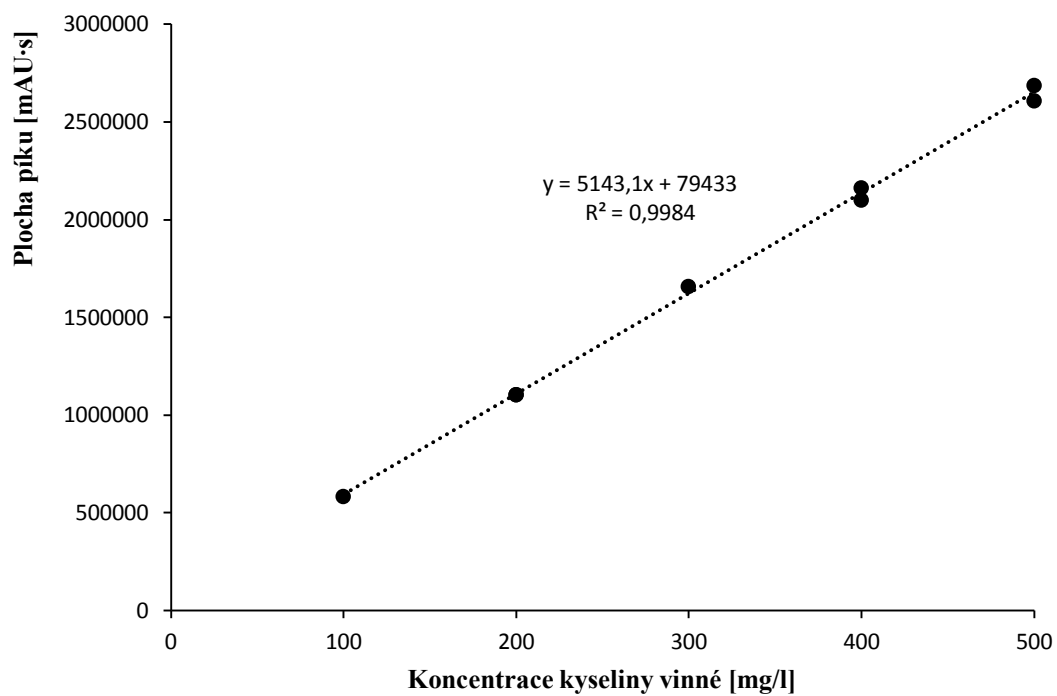
Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m); MF A - 10 mM octan amonný okyselený kyselinou octovou na pH~3; MF B - 80 % acetonitrilu + 20 % MF A; průtok 0,4 ml/min; gradientová eluce: 0 min – 0 % MF B; 30 min – 20 % MF B; 40 min – 50 % MF B; 50 min – 80 % MF B; 55 min – 80 % MF B; teplota 40 °C; detekce při vlnových délkách 280 nm a 320 nm; dávkovaný objem 10 μ l

Příloha XV: Výsledky stanovení fenolických látek ve vzorcích vín

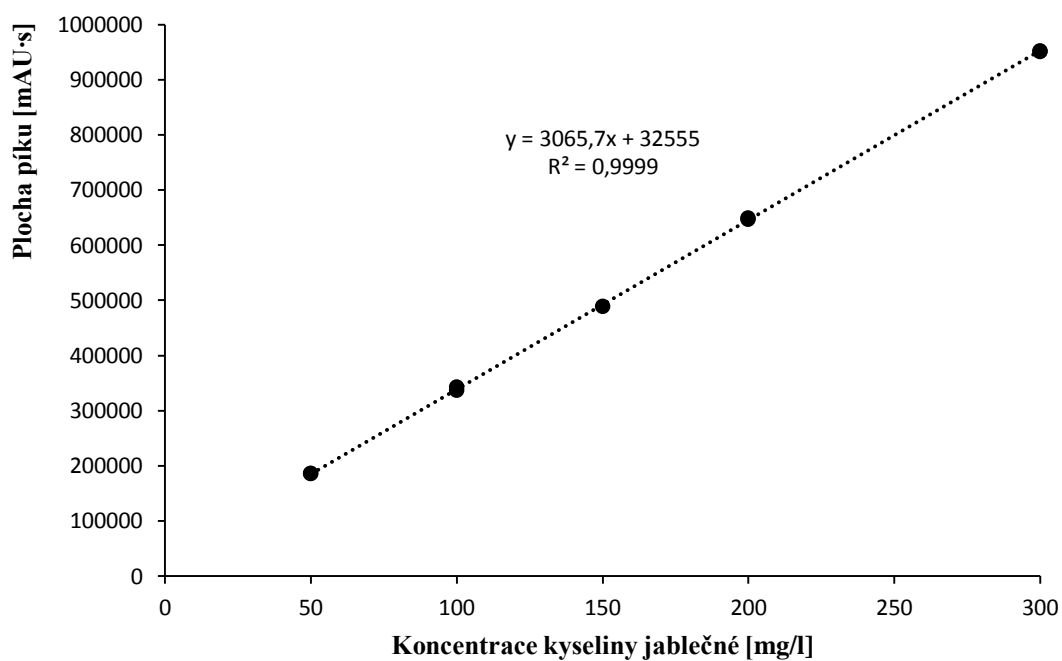
<i>Fenolická látka</i>	Vzorky bílých vín *					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
<i>kyselina galová [mg/l]</i>	2,03	3,42	1,67	23,08	2,41	1,64
<i>protokatechaldehyd [mg/l]</i>	6,54	6,50	5,57	4,60	3,84	5,19
<i>katechin [mg/l]</i>	13,69	29,24	9,86	14,47	11,32	5,29
<i>kyselina kávová [mg/l]</i>	2,79	2,40	1,49	8,44	3,23	1,50
<i>kyselina p-kumarová [mg/l]</i>	2,67	3,88	0,51	2,92	2,38	0,78
<i>kyselina ferulová [mg/l]</i>	0,73	< LOD	0,27	0,50	0,67	0,72
	Vzorky červených vín *					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>kyselina galová [mg/l]</i>	48,71	83,56	22,22	55,67	24,87	27,59
<i>protokatechaldehyd [mg/l]</i>	3,52	10,09	1,29	8,95	7,84	6,71
<i>katechin [mg/l]</i>	24,47	132,48	76,73	60,54	101,05	198,74
<i>kyselina kávová [mg/l]</i>	7,34	5,04	1,99	8,06	2,42	8,10
<i>kyselina p-kumarová [mg/l]</i>	5,86	3,37	< LOD	5,69	1,48	3,80
<i>kyselina ferulová [mg/l]</i>	< LOD	0,37	< LOD	0,28	0,84	< LOD

*B1-B3 Rulandské bílé, B4-B6 Rulandské šedé, C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré

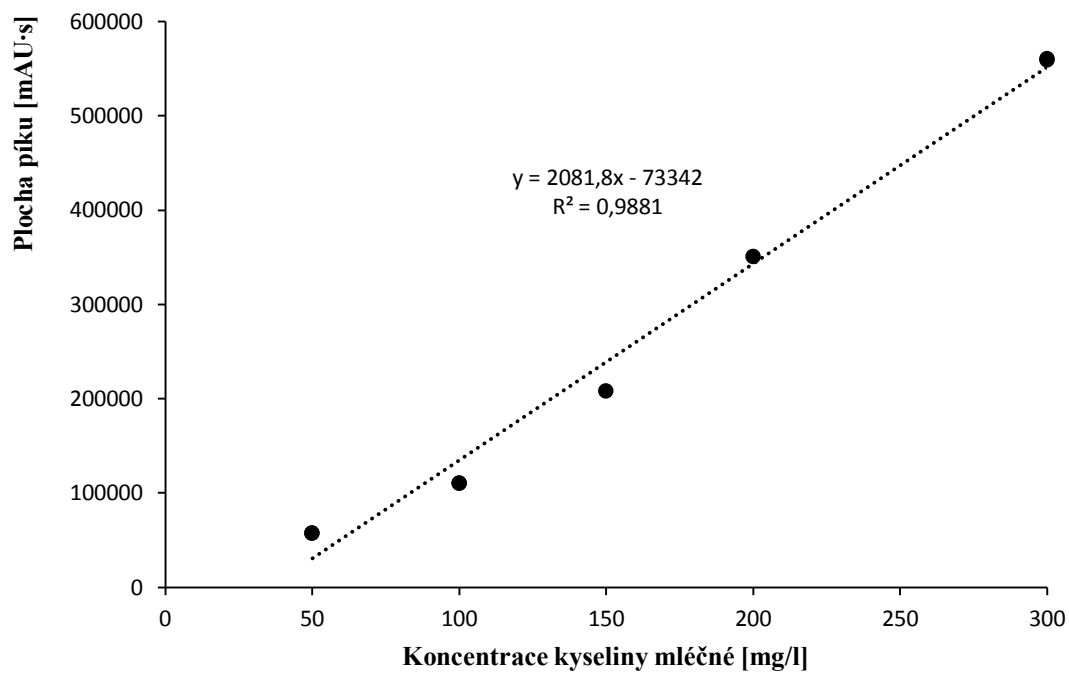
Příloha XVI: Kalibrační křivka kyseliny vinné



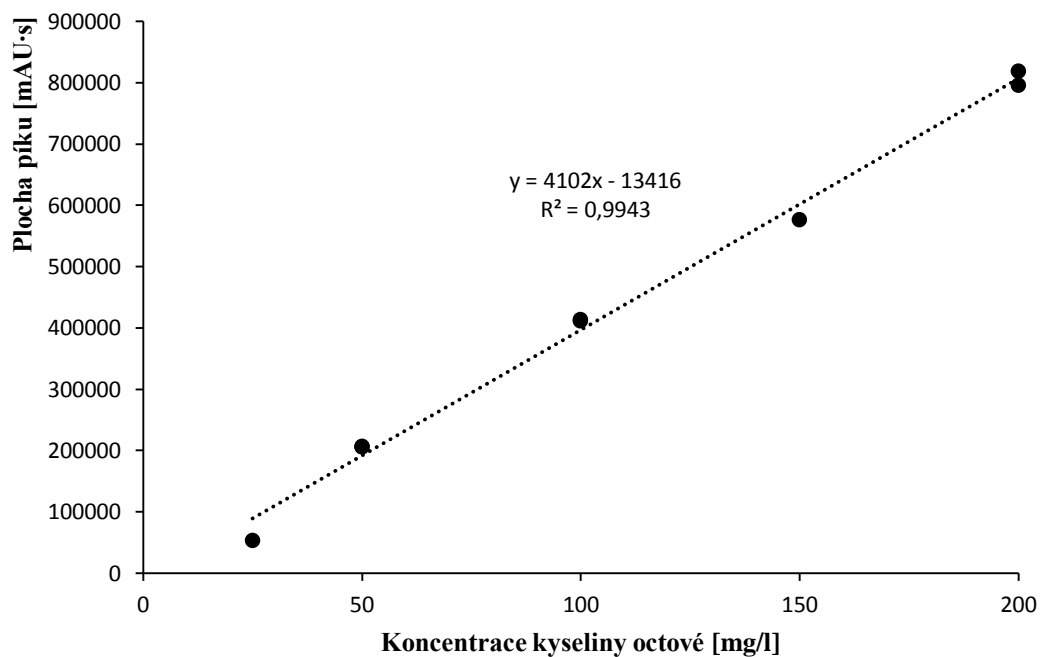
Příloha XVII: Kalibrační křivka kyseliny jablečné



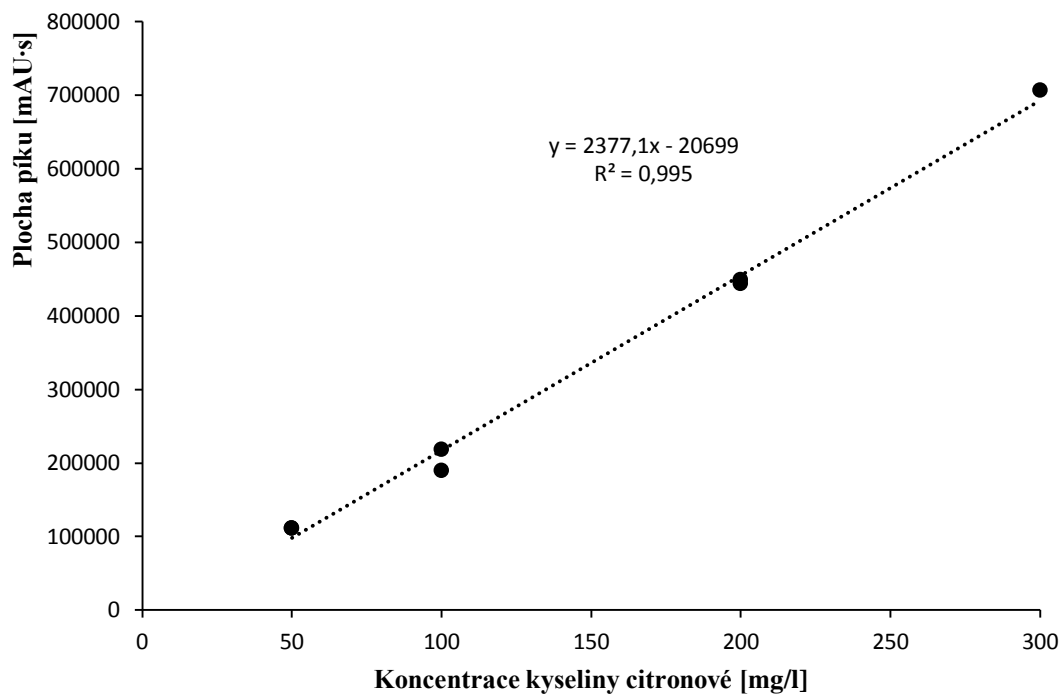
Příloha XVIII: Kalibrační křivka kyseliny mléčné



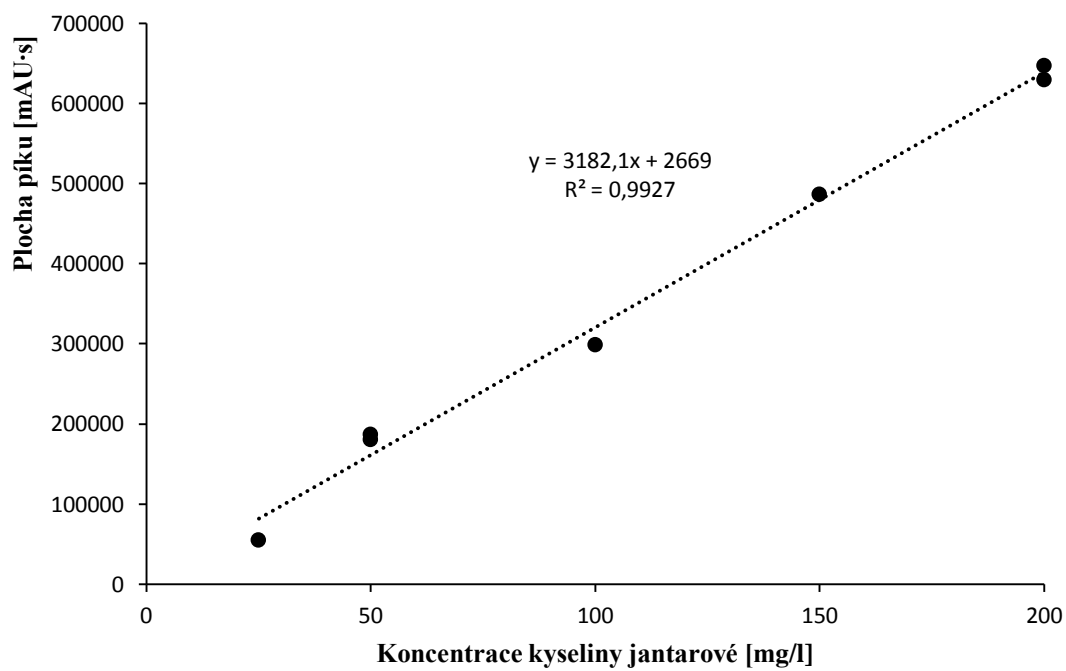
Příloha XIX: Kalibrační křivka kyseliny octové



Příloha XX: Kalibrační křivka kyseliny citronové



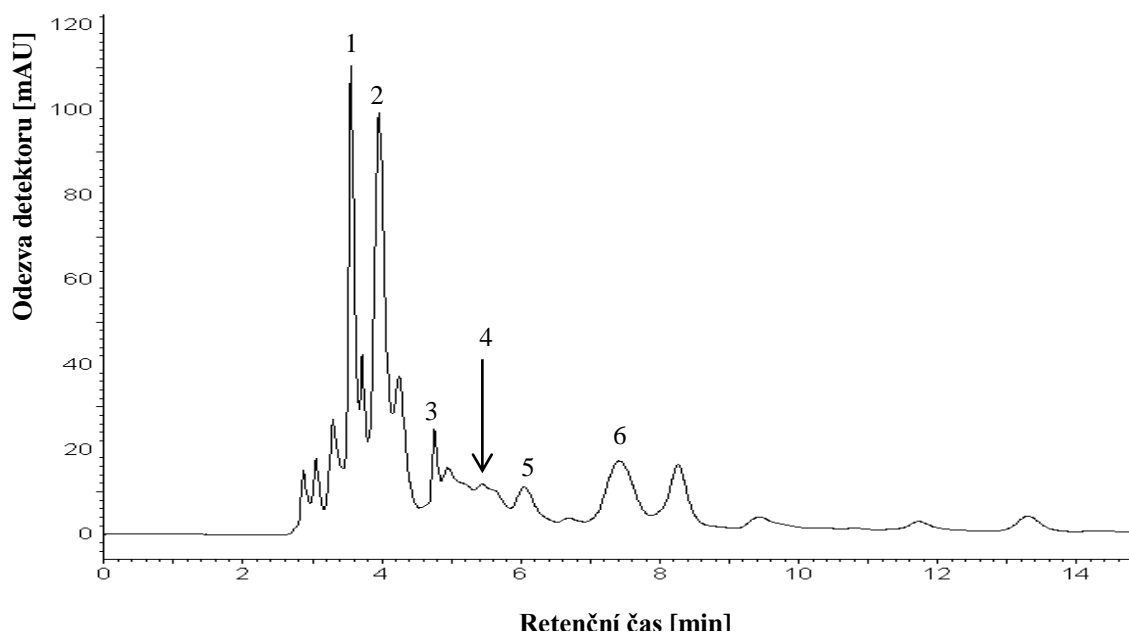
Příloha XXI: Kalibrační křivka kyseliny jantarové



Příloha XXII: Výsledky stanovení organických kyselin ve vzorcích vín

<i>Vzorek</i>	<i>kyselina vinná [g/l]</i>	<i>kyselina jablečná [g/l]</i>	<i>kyselina mléčná [g/l]</i>	<i>kyselina octová [g/l]</i>	<i>kyselina citronová [g/l]</i>	<i>kyselina jantarová [g/l]</i>
RULANDSKÉ BÍLÉ (B1)	3,27	2,71	1,37	0,30	1,34	0,88
RULANDSKÉ BÍLÉ (B2)	3,93	3,43	2,03	0,37	2,48	1,09
RULANDSKÉ BÍLÉ (B3)	1,77	4,11	0,76	0,69	0,99	1,47
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B4)	2,97	3,21	1,68	0,70	1,29	0,81
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B5)	3,66	4,84	0,79	0,35	1,27	0,83
RULANDSKÉ ŠEDÉ (B6)	2,09	3,80	1,88	0,52	1,26	2,05
FRANKOVKA (C1)	2,77	1,73	2,66	0,53	2,52	0,34
FRANKOVKA (C2)	2,97	1,42	2,89	< LOD	1,89	0,51
FRANKOVKA (C3)	2,66	0,78	3,55	< LOD	0,77	0,09
RULANDSKÉ MODRÉ (C4)	1,83	2,73	3,40	0,90	1,03	1,24
RULANDSKÉ MODRÉ (C5)	2,64	1,47	3,76	0,22	1,11	0,29
RULANDSKÉ MODRÉ (C6)	1,79	0,97	4,65	0,16	1,46	0,48

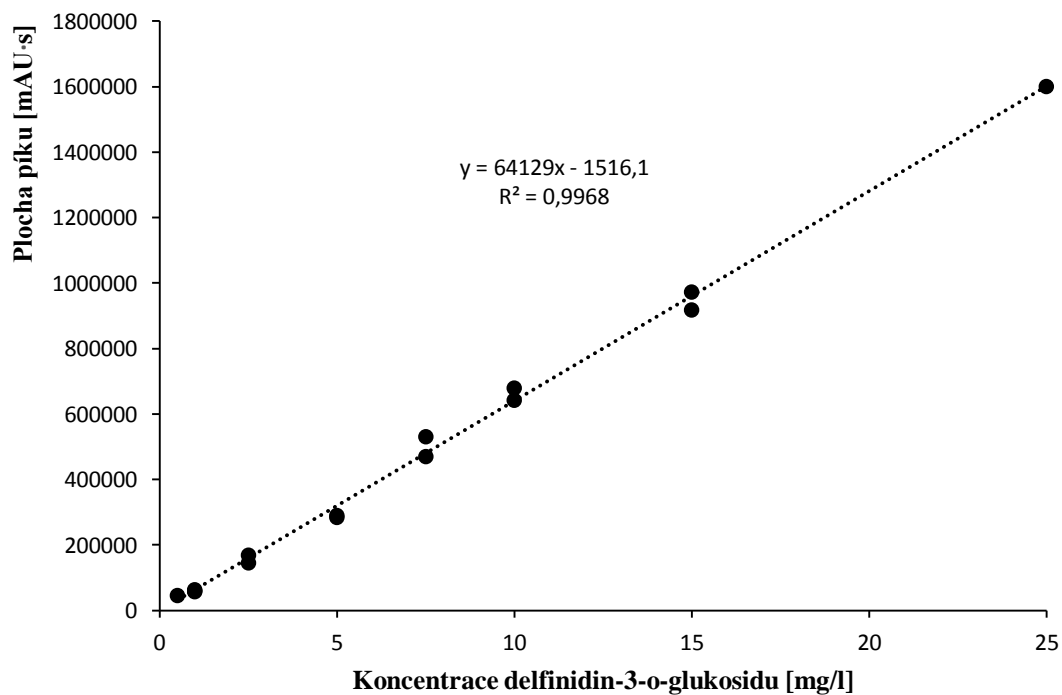
Příloha XXIII: Chromatogram organických kyselin ve vzorku vína „Rulandské bílé B3“



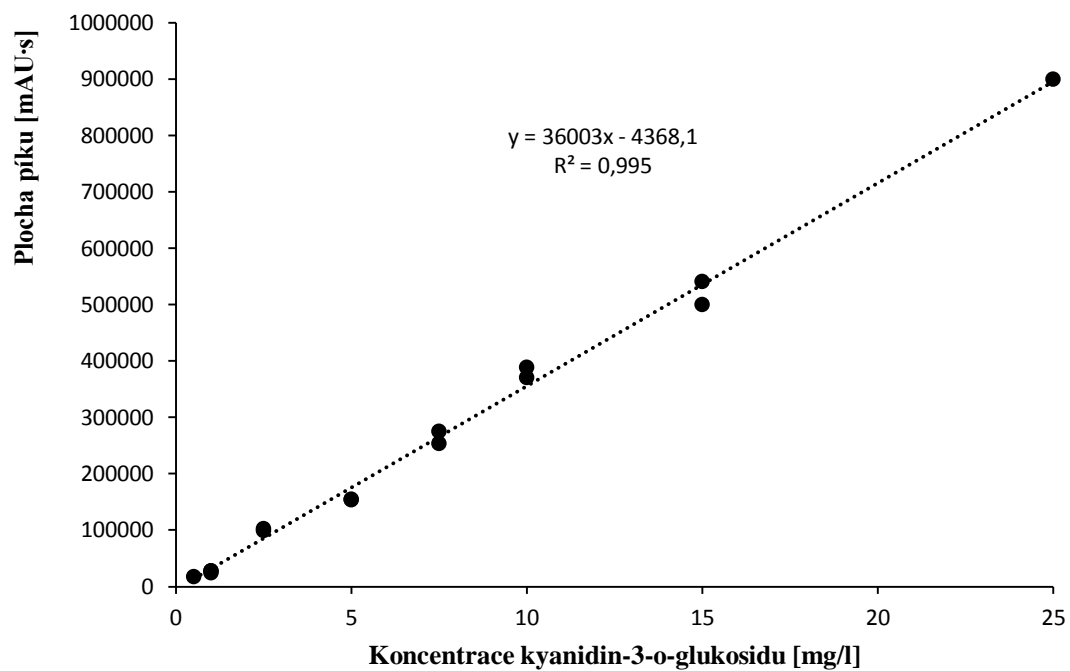
1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina octová, 5 – kyselina citronová, 6 – kyselina jantarová

Podmínky analýzy: Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m); MF – redestilovaná voda okyselená kyselinou sírovou na pH ~ 1,8; průtok 0,5 ml/min; isokratická eluce; teplota kolony 35 °C; dávkovaný objem 10 μ l; detekce při 210 nm

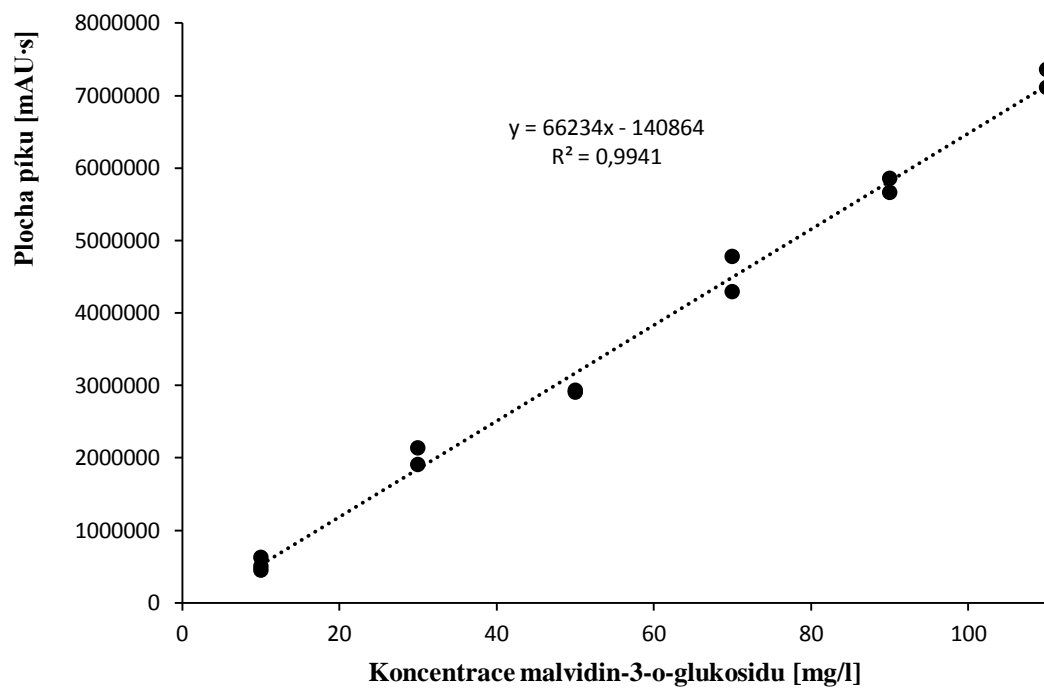
Příloha XXIV: Kalibrační křivka delfinidin-3-*o*-glukosidu



Příloha XXV: Kalibrační křivka kyanidin-3-*o*-glukosidu



Příloha XXVI: Kalibrační křivka malvidin-3-*o*-glukosidu

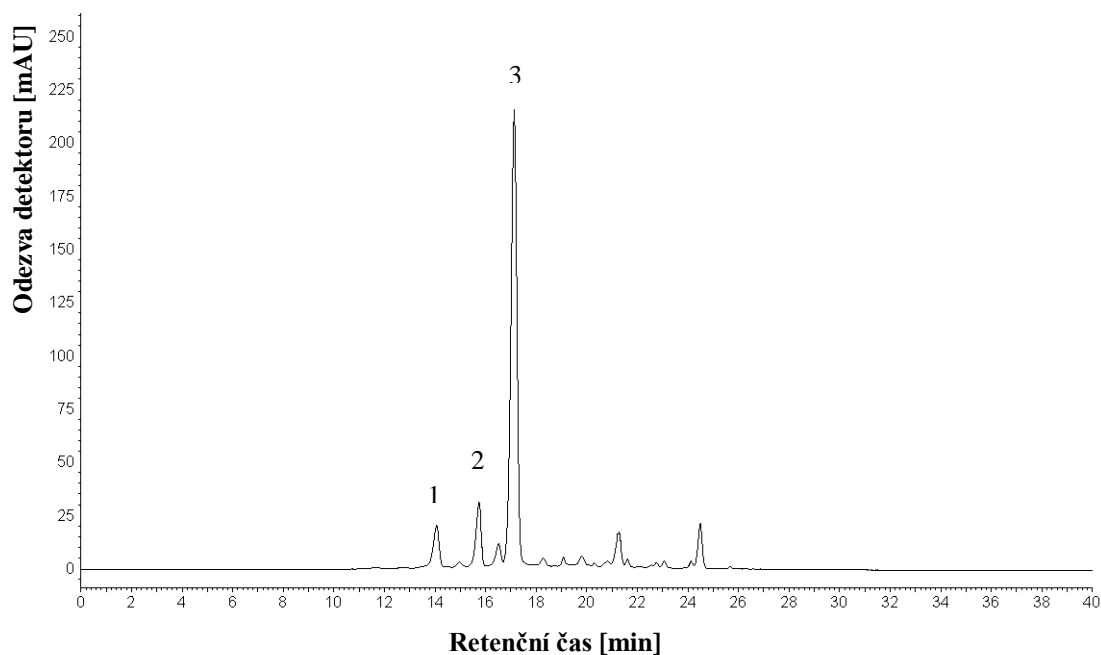


Příloha XXVII: Výsledky stanovení anthokyanů ve vzorcích červených vín

<i>Anthokyan</i>	<i>Koncentrace anthokyanu ve vzorku [mg/l]</i>					
	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>
delfinidin-3- <i>o</i> -glukosid	1,06	6,78	9,30	0,54	1,37	3,29
kyanidin-3- <i>o</i> -glukosid	2,89	12,29	24,20	1,72	3,56	6,99
malvidin-3- <i>o</i> -glukosid	14,57	36,06	102,80	11,97	27,81	30,39

* *C1-C3 Frankovka, C4-C6 Rulandské modré*

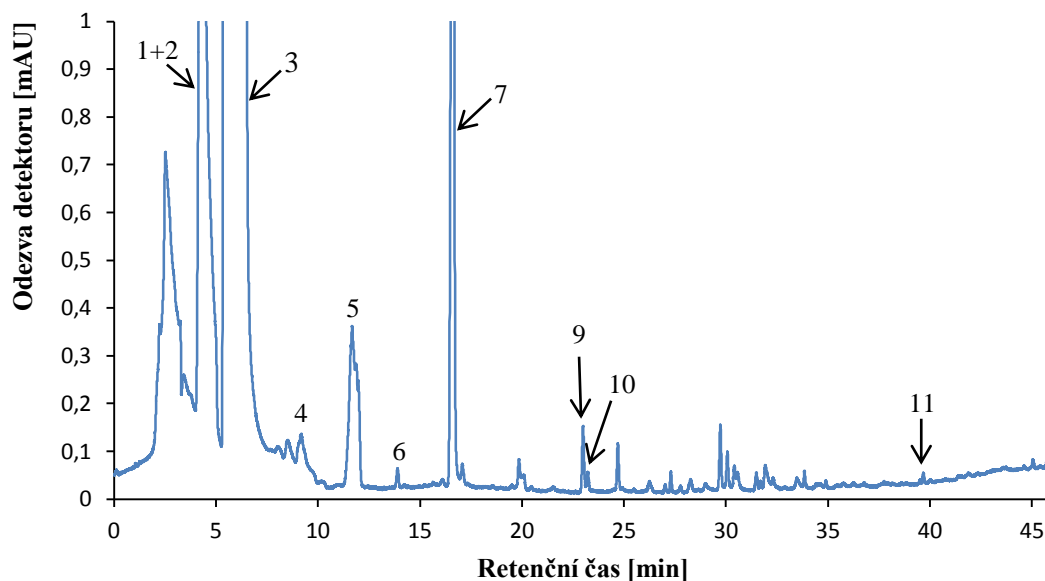
Příloha XXVIII: Chromatogram anthokyanů vzorku „Frankovka C3“



1 – delfinidin-3-*o*-glukosid, 2 – kyanidin-3-*o*-glukosid, 3 – malvidin-3-*o*-glukosid;

Podmínky analýzy: Luna Omega C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); MF A – redestilovaná voda okyselená kyselinou sírovou na pH~1,8; MF B – 50% acetonitril okyselený kyselinou sírovou na pH~1,8; průtok 1 ml/min; gradientová eluce 0 – 40 min: 0 – 100 % MF B; teplota kolony 35 °C; detekce při 520 nm; dávkovaný objem 10 µl

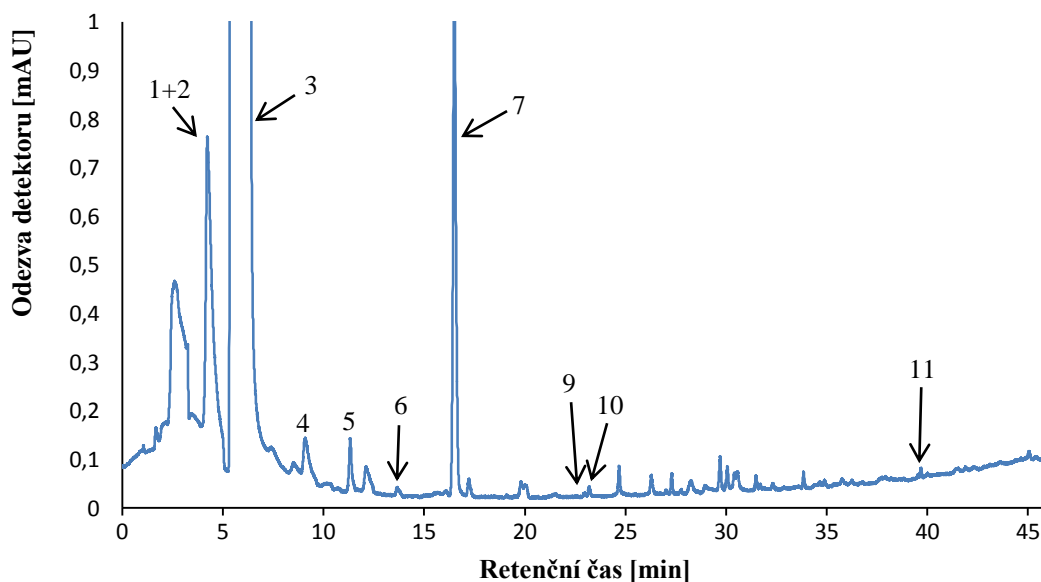
Příloha XXIX: Chromatogram těkavých látek ve vzorku vína „Frankovka C2“



1 - ethylacetát, 2 - methanol, 3 - ethanol, 4 - n-propylalkohol, 5 - isobutanol, 6 - n-butanol, 7 - isoamylalkohol, 9 - ethyllaktát, 10 - hexanol, 11 - kyselina hexanová

Podmínky analýzy: Supelcowax 10 (15 m x 0,32 mm; 0,5 µm film PEG), nosný plyn dusík, teplotní program - počáteční teplota 40 °C po dobu 5 min; následně nárůst o 3 °C/min na teplotu 155 °C, která byla zachována po dobu 5 min, teplota injektoru 240 °C, teplota detektoru 250 °C, dávkovaný objem 50 µl

Příloha XXX: Chromatogram těkavých látek ve vzorku vína „Rulandské bílé B1“



1 - ethylacetát, 2 - methanol, 3 - ethanol, 4 - n-propylalkohol, 5 - isobutanol, 6 - n-butanol, 7 - isoamylalkohol, 9 - ethyllaktát, 10 - hexanol, 11 - kyselina hexanová

Podmínky analýzy: Supelcowax 10 (15 m x 0,32 mm; 0,5 µm film PEG), nosný plyn dusík, teplotní program - počáteční teplota 40 °C po dobu 5 min; následně nárůst o 3 °C/min na teplotu 155 °C, která byla zachována po dobu 5 min, teplota injektoru 240 °C, teplota detektoru 250 °C, dávkovaný objem 50 µl