

Stanovení antioxidantů ve víně

Bc. Soňa Dobšíčková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Soňa DOBŠÍČKOVÁ**
Osobní číslo: **T080331**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení antioxidantů ve víně**

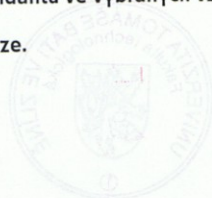
Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Chemické složení réвовého vína.
2. Charakterizace antioxidantů.
3. Fyziologie působení antioxidantů.
4. Princip a metody stanovení antioxidantů.

II. Praktická část

1. Způsoby zpracování vzorku pro analýzu antioxidantů.
2. Metodika stanovení antioxidantů.
3. Stanovení antioxidantů ve vybraných vzorcích vína.
4. Výsledky a diskuze.
5. Závěr.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] ŠVEJCAR, V a kol. Biochemie vína, 1. vydání, Vysoká škola zemědělská v Brně, Brno 1976.
- [2] ŠEVČÍK, L. Červená vína, 1. vydání, Grada publishing, Praha 1999.
- [3] STEVENSON, T. Víno, 1. vydání, Ikar, Praha 1998.
- [4] <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=147&ch=13&typ=1&val=88040/>.
- [5] KUTTELVAŠER, Z. Abeceda vína, 2.vydání, Radix, Praha 2003.
- [6] KRAUS,V. a kol. Nová encyklopedie českého a moravského vína 2.díl, Praga Mystika, Praha 2008.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

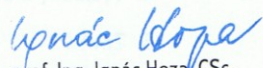
Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Dobšíčková Soňa Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;

- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně20.5.2010.....

.....*Debičková*.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k vyšší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo otestovat možnosti stanovení antioxidantů ve víně pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Antioxidanty byly stanoveny metodou HPLC – ECD a HPLC - UV. Při HPLC – ECD byla jako mobilní fáze použita směs voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová v poměru 95: 49,65: 0,35.

Při HPLC – UV byly pro stanovení použity 2 mobilní fáze. Jako mobilní fáze A byla použita směs voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová v poměru 95: 49,65: 0,35 a jako mobilní fáze B byla použita směs voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová v poměru 50: 49,75: 0,25.

Obě metody byly aplikovány na vybraných 6 vzorků vína.

Klíčová slova: antioxidanty, víno, HPLC, chromatografie

ABSTRACT

The goal of this graduation theses was to test possibilities of antioxidants determination in wine using High Performance Liquid Chromatography. The HPLC – ECD and HPLC - UV methods have been used for antioxidants measurement. When applying HPLC method with ECD, mixture of water: acetonitrile: trifluoroacetic acid (95: 49,65: 0,35) has been used as a mobile phase. When applying HPLC – UV, there were two mobile phases used. Mobile phase A was a mixture of water: acetonitrile: trifluoroacetic acid (95: 49,65: 0,35). Mobile phase B was a mixture of water: acetonitrile: trifluoroacetic acid (50: 49,75: 0,25).

Both methods have been applied to six selected wine samples.

Keywords: antioxidants, wine, HPLC, chromatography

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mojí diplomové práce doc. Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc. za odborné vedení, za věnovaný čas při měření praktické části diplomové práce.

Dále děkuji Ing. Daniele Kramářové, PhD. za poskytnutí mnoha cenných rad a zodpovězené otázky týkající se dané problematiky.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	12
I. TEORETICKÁ ČÁST	13
1 ANTIOXIDANTY	14
1.1 Co jsou volné radikály.....	14
1.2 Vznik volných radikálů.....	15
1.3 Funkce volných radikálů.....	16
1.4 Nemoci způsobené oxidací volnými radikály	17
1.5 Mechanismus účinku antioxidantů	17
1.6 Výskyt antioxidantů a faktory působící na jejich obsah v potravinách.....	18
1.7 Využití antioxidantů.....	19
1.8 Doporučená denní dávka antioxidantů	20
1.9 Nové výzkumy vlivu antioxidantů na rychlost stárnutí.....	20
2 RÉVOVÉ VÍNO	22
2.1 Druhy révového vína.....	22
2.2 Stavba hroznu	23
2.3 Víno a jeho vliv na zdraví člověka.....	25
2.4 Chemické složení vína	25
2.4.1 Voda	27
2.4.2 Ethanol.....	27
2.4.3 Zbytkový cukr.....	27
2.4.4 Glycerol	27
2.4.5 Kyseliny.....	28
2.4.6 Ostatní kyseliny	29
2.4.7 Titrovatelné kyseliny	29
2.4.8 Stupeň kyselosti vína	30

2.4.9	Barevné látky v bobulích a ve víně	30
2.4.10	Třísloviny	31
2.4.11	Extrakt	31
2.4.12	Popel	31
2.4.13	Aromatické látky	32
2.4.14	Enzymy	34
2.4.15	Vitaminy	34
2.4.16	Dusíkaté látky	35
2.4.17	Tuk	35
2.4.18	Ostatní látky	35
2.4.19	Fenolické látky	35

3 STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ VE VÍNĚ 40

3.1 Podmínky pro stanovení obsahu celkových fenolických látek (CP) 40

3.2 Podmínky pro stanovení některých fenolických sloučenin pomocí HPLC 40

3.2.1	Stanovení kyseliny gallové, katechinu, epikatechinu, antokyanů a antokyanidinů	49
3.2.2	Stanovení katechinu, epikatechinu, resveratrolu, kvercetinu a rutinu v červeném víně	50
3.2.3	Stanovení katechinu a epikatechinu v červeném víně	52

3.3 Stanovení flavonoidů v červeném víně 54

3.3.1	Stanovení fenolických látek v červeném víně s UV a fluorescenční detekcí	56
3.3.2	Stanovení 11 fenolických látek ve víně s UV a fluorescenční detekcí	59
3.3.3	Stanovení fenolických látek s detekcí pomocí diodového pole	61

3.4 Podmínky pro stanovení resveratrolu a jeho izomerů 63

3.4.1	Stanovení trans-resveratrolu ve víně pomocí HPLC	63
3.4.2	Stanovení trans-resveratrolu ve víně pomocí HPLC	65
3.4.3	Stanovení derivátů resveratrolu	67
3.4.4	Stanovení 4 různých izomerů resveratrolu pomocí HPLC	68
3.4.5	Stanovení trans-resveratrolu a flavan-3-olů ve víně pomocí HPLC s fluorescenční detekcí	70
3.4.6	Stanovení kvercetinu a cis- a trans-resveratrolu ve víně	71

II. PRAKTICKÁ ČÁST	73
4 METODIKA PRÁCE	74
4.1 Stanovení antioxidantů ve víně metodou HPLC – ECD.....	74
4.1.1 Chemikálie.....	74
4.1.2 Použité pomůcky a přístroje	74
4.1.3 Postup pro naměření kalibračních křivek epigallokatechinu, katechinu, kyseliny gallové a epikatechinu	75
4.1.4 Postup pro stanovení antioxidantů ve víně	75
4.2 Stanovení antioxidantů ve víně metodou HPLC - UV.....	76
4.2.1 Chemikálie.....	76
4.2.2 Použité pomůcky a přístroje	76
4.2.3 Postup pro stanovení antioxidantů ve víně	76
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	77
5.1 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení epigallokatechinu	77
5.2 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení katechinu	78
5.3 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny gallové	79
5.4 Stanovení obsahu antioxidantů ve vzorcích vína metodou HPLC – ECD.....	82
5.4.1 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Cabernet Sauvignon po otevření láhve.....	82
5.4.2 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování.....	84
5.4.3 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Modrý Portugal	85
5.4.4 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Modrý Portugal po 10 dnech skladování.....	87
5.4.5 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Svatovavřínecké	88
5.4.6 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Svatovavřínecké po 10 dnech skladování.....	90
5.4.7 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Frankovka.....	92
5.4.8 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Frankovka po 10 dnech skladování	94
5.4.9 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Rulandské modré.....	96
5.4.10 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Rulandské modré po 10 dnech skladování	98
5.4.11 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Zweigeltrebe rosé	100
5.4.12 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování.....	101
5.5 Stanovení antioxidantů ve víně po 10 dnech skladování metodou HPLC - UV	103

ZÁVĚR.....	106
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	109
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	112
SEZNAM TABULEK.....	114
SEZNAM PŘÍLOH	117

ÚVOD

Existuje několik faktorů, které mají významný vliv na zdraví člověka. Některé z nich můžeme jako jedinci sami ovlivnit, např. dodržováním zdravé životosprávy, pravidelným pohybem, vyhýbáním se kouření a alkoholu. Na náš zdravotní stav má však vliv také kvalita životního prostředí, kterou jako jedinci příliš neovlivníme. Vlivem znečištěného vzduchu, vody, potravin, kouření, bifenylyů a dalších karcinogenních látek, které se nám denně dostávají do těla, dochází k nežádoucí oxidaci v organismu a tím i k tvorbě volných radikálů, které mohou způsobovat různá onemocnění. Látky, které pomáhají chránit náš organismus před vlivem volných radikálů se nazývají antioxidanty.

Antioxidanty jsou všechny látky, přírodní i syntetické, které svou přítomností zpomalují, až potlačují nežádoucí oxidační děje, proto je vhodné tyto látky přijímat v potravě případně jejich obsah doplňovat potravinovými doplňky. Mezi významné antioxidanty patří tokoferoly, kyselina L-askorbová, deriváty kávové kyseliny, thiamin, kataláza, pektiny a mnoho dalších. Tyto látky se vyskytují například v rajčatech, listové zelenině, brusinkách, kiwi, jahodách, broskvích a obilí. Významnými antioxidanty jsou rovněž fenolické látky, které jsou velmi stabilní a nachází se například v obilí, čaji a víně.

Tato práce se zabývá studiem antioxidantů ve víně, protože se zde nachází celá řada těchto fenolických látek tzv. flavonoidů, které jsou významné z hlediska ochrany zdraví. Asi nejzajímavější je resveratrol, který se objevuje v izomerech trans, cis a transcis. Ve víně byly identifikovány také další flavonoidy jako katechin, epikatechin, kvercetin a rutin a významnými fenolovými kyselinami rovněž s antioxidantními účinky jsou kyselina gallová, protokachetová, kumarová, kávová, vanilinová a ferulová atd.

Antioxidanty se v potravinách vyskytují v různých množstvích. Jejich zastoupení a obsah můžeme sledovat pomocí vysokoúčinné kapalínové chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). HPLC je separační a současně analytická fyzikálně-chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, poskytuje tedy kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Je to jedna z nejrozšířenějších metod pro její rychlost, přesnost a malou spotřebu vzorku. HPLC je založena na separaci složek směsi mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází.

Cílem této diplomové práce bylo najít vhodnou metodiku na stanovení antioxidantů ve víně pomocí HPLC – ECD a HPLC – UV.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIOXIDANTY

Jako antioxidanty označujeme všechny látky, přírodní i syntetické, které svou přítomností zpomalují, až potlačují nežádoucí oxidační děje. [1]

Oxidace je chemická reakce, při které dochází k přenosu elektronů z látky na oxidační činidlo. Ačkoliv tato reakce je velmi důležitá pro život, vytváří se při ní veškerá energie potřebná pro naše tělo, mohou se při ní produkovat volné radikály, které odstartují řetězové reakce poškozující buňky. [2]

K nežádoucí oxidaci dochází v organismu vlivem znečištěného vzduchu, vody, potravin, kouření, bifenyly a dalších karcinogenních látek, kterých je kolem nás mnoho. Proto je nutné látky s antioxidačními účinky přijímat stravou v přirozené formě, případně jejich obsah doplňovat potravinovými doplňky. [3]

1.1 Co jsou volné radikály

V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku. Tyto látky mají značný fyziologický i patogenní význam, proto se staly předmětem intenzivního lékařského výzkumu a vědomosti o nich se postupně uplatňují v lékařské praxi. [4] Jedná se o látky, které mohou být produkovány s cílem zabezpečit určité biologické funkce, jako je například funkce mikrobicidní ve fagocytech, jsou významnými prostředníky přenosu energie a signálními molekulami buněčné regulace, za určitých okolností však působí jako toxické látky, které jsou schopné organismus poškodit. [4]

Nejdůležitější reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou uvedeny v tabulce 1. Pouze některé z níže popsaných reaktivních forem kyslíku nebo dusíku patří mezi volné radikály, tedy látky s nepárovým elektronem. [2, 4]

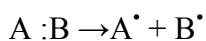
Reaktivní formy kyslíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
superoxid, O_2^{\cdot}	peroxid vodíku, H_2O_2
hydroxylový radikál, HO^{\cdot}	kyselina chlorná, $HOCl$
peroxyl, ROO^{\cdot}	ozon, O_3
alkoxyl, RO^{\cdot}	singletový kyslík, 1O_2
hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}	
Reaktivní formy dusíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
oxid dusnatý, NO^{\cdot}	nitrosyl, NO^+
oxid dusičitý, NO_2^{\cdot}	nitroxid, NO
	kyselina dusitá, HNO_2
	oxid dusitý, N_2O_3
	oxid dusičitý, N_2O_4
	nitronium, NO_2^+
	peroxynitrit, $ONOO$
	alkylperoxynitrit, $ROONO$

Tab. 1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku [4]

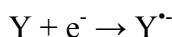
1.2 Vznik volných radikálů

Volné radikály vznikají z molekul trojím způsobem:

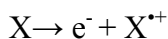
1. homolytickým štěpením kovalentní (dvouelektronové) chemické vazby, kdy každý fragment získá jeden nepárový elektron. K homolytickému štěpení je zapotřebí velké množství energie, získané například vysokou teplotou, ultrafialovým nebo ionizujícím zářením.



2. redukci - přidáním jednoho elektronu k molekule.



3. oxidaci - naopak ztrátou jednoho elektronu.



V biologických systémech volné radikály vznikají energeticky snadnějším způsobem – odejmutím nebo přijetím elektronu.

Radikály mohou být neutrální částice nebo záporně či kladně nabitě ionty. To záleží na tom, zda počet protonů v atomových jádrech radikálu odpovídá počtu elektronů v orbitalech, či nikoli. Vzorce, příp. symboly radikálů se vždy označují tečkou, indikující nepárový elektron, a jsou-li popisované částice zároveň ionty, je vzorec doplněn podle počtu a typu náboje symboly plus nebo minus. [4]

1.3 Funkce volných radikálů

Volné radikály plní v našem organismu řadu důležitých fyziologických funkcí.

Bez radikálových reakcí by se dnešní formy života nevyvinuly, neboť tak velké množství energie, jaké je třeba k jejich výstavbě a funkcím, lze za daných podmínek uvolnit pouze přenosem elektronů ze živin na kyslík. Reaktivní formy kyslíku jsou rovněž součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. [4]

Volné radikály jsou tedy běžné produkty aerobního metabolismu, ale vlivem patofyziologických podmínek mohou být tvořeny ve zvýšené míře. [1]

Tvoří-li se v nadměrném množství nebo nejsou-li dostatečně rychle likvidovány, stávají se pro svou reaktivitu nebezpečné, narušují buněčné membrány a mohou být příčinou rozvoje závažných patologických projevů. [2, 3]

Dochází tak k urychlení procesu degenerace a stárnutí buněk, narušení přirozené obranyschopnosti organismu, případně poškození genetického vybavení buňky, a tím k poruchám mnohdy vedoucím k nastartování velmi složitého a doposud intenzivně vědecky zkoumaného procesu nádorového zvratu v buňce. Rozmnoží-li se takto změněné buňky v důsledku nemoci, stárnutí nebo nadměrného působení slunečního záření, způsobí velké škody na funkci orgánů a zdraví organismu. [3]

1.4 Nemoci způsobené oxidací volnými radikály

Reaktivní formy kyslíku hrají významnou úlohu v rozvoji tak závažných a rozšířených onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus, hypertenze, chronické střevní záněty, některé typy rakoviny, ischemicko-reperfuční poškození srdce a jiných orgánů, mozkové ischemie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc atd. Volné radikály jsou také pravděpodobně příčinou předčasného stárnutí. [5]

Oxidace cholesterolových částic v krvi může způsobit ukládání oxidovaných tukových látek ve stěnách tepen, což může postupně vést k srdečnímu infarktu a cévní mozkové příhodě. Jestliže volné radikály oxidují DNA v buněčném jádru, vyvolávají buněčné mutace, které mohou být počátkem rakoviny. [3]

1.5 Mechanismus účinku antioxidantů

Mechanismus účinku antioxidantů spočívá přednostně v tom, že poskytují atomový vodík k reakci s peroxidovými nebo jinými radikály, které vznikají jako meziprodukty řady oxidačních procesů znehodnocující potraviny. [3, 6]

Volný radikál antioxidantu je poměrně málo reaktivní a není schopen vyvolat další řetězovou reakci. Místo toho se deaktivuje buď spojením s dalším radikálem, nebo se disproportionuje na původní antioxidant a odpovídající chinon. [6]

Je však třeba si uvědomit, že ne každý antioxidant dokáže odstranit každý volný radikál. Rozeznáváme tři základní skupiny antioxidantů:

1. Enzymové antioxidanty – superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza atd. Superoxiddismutáza katalyzuje přeměnu superoxidu. Ten je přeměněn na peroxid vodíku a na následné odstranění je v těle více mechanismů, např. glutathionperoxidáza, která jej zredukuje. [5]
2. Hydrofilní antioxidanty - vitamin C, kyselina močová, selen, bioflavonoidy atd. Tyto antioxidanty rozpustné ve vodě účinkují zejména v extracelulární tekutině.
3. Hydrofobní antioxidanty – vitamin E, ubichinon (koenzym Q 10), b-karoten. V tuku rozpustné antioxidanty pronikají buněčnou membránou a mohou tedy účinkovat intracelulárně.

Nízké hladiny antioxidantů nebo inhibice antioxidantních enzymů mohou způsobit oxidační stres a mohou být příčinou poškození nebo smrti buňky. [7]

Oxidační stres, neboli převaha volných radikálů nad antioxidanty, hraje důležitou roli u mnoha lidských nemocí, použití antioxidantů ve farmakologii je proto intenzivně studováno. [1]

1.6 Výskyt antioxidantů a faktory působící na jejich obsah v potravinách

Antioxidační účinek byl prokázán například u tokoferolů, kyseliny L-askorbové, flavonoidních barviv derivátů kávové kyseliny, thiaminu, katalasy, pektinů a mnoho dalších. [8]

Některé vybrané antioxidanty a potraviny, ve kterých se hojně vyskytují, jsou uvedeny v tabulce 2.

Antioxidant	Potravina
Vitamin A a karotenoidy	mrkev, dýně, brokolice, sladké brambory, rajčata, kapusta, broskve, meruňky
Vitamin C	citrusy (pomeranče a limetka), zelené papriky, brokolice, listová zelenina, jahody a rajčata
Vitamin E	ořechy a semena, celozrnné potraviny, listová zelenina
Selen	ryby, červené maso, vejce, česnek, celozrnné potraviny
Flavonoidy	sója, hroznové víno, granátová jablka, brusinky
Lykopen	rajčata a výrobky z rajčat
Lutein	kapusta, brokolice, kiwi, špenát
Lignan	lněná semínka, ovesné vločky, ječmen, žito

Tab. 2. Antioxidanty a jejich výskyt v potravinách [9]

Antioxidanty jsou obsaženy v potravinách v různých množstvích.

Některé antioxidanty mohou být však zničeny dlouhodobým skladováním nebo varem, jako například lykopen. [10]

Rovněž při zpracování a skladování karotenoidů dochází ke ztrátám, hlavní příčinou je oxidace nenasycených vazeb. [11]

Polyfenolické antioxidanty jsou naopak velmi stabilní, jsou obsaženy například v obilí a čaji a je jim přisuzován významný vliv na zdraví člověka. Fenolické kyseliny obsažené v cereáliích mají vysokou antioxidační aktivitu a to již v koncentracích, které získáme běžnou konzumací obilovin, a pravidelná konzumace čaje vede k významnému zvýšení antioxidační kapacity krve, která vypovídá o schopnosti bránit se působení volných radikálů. [12, 13]

Zpracované potraviny obsahují méně antioxidantů než čerstvé a neuvažené potraviny, protože mohou být během procesu přípravy vystaveny účinkům kyslíku. [14]

1.7 Využití antioxidantů

Antioxidanty jsou hojně využívány jako doplňky výživy při prevenci takových nemocí jako rakovina a srdeční onemocnění. Kromě použití antioxidantů v lékařství mají tyto sloučeniny mnoho průmyslových využití.

V potravinářském průmyslu se nejčastěji používají k ochraně tuků a jiných lipidů nebo látek povahy terpenů před autooxidací. [15]

Některé potraviny jsou na přírodní antioxidanty tak bohaté, že jsou jimi nejen chráněny, ale mohou dokonce chránit ve směsích i potraviny, které vlastní antioxidanty postrádají. V řadě případů je však třeba obsah antioxidantů v potravinách zvyšovat jejich přidavkem. Antioxidanty izolované z přírodních materiálů však většinou nemají konstantní složení, jsou obvykle málo účinné a dosti drahé. Proto se potraviny častěji stabilizují antioxidanty syntetickými, z nichž se používají téměř výhradně alkylsubstituované fenoly. [6]

Antioxidanty své uplatnění nacházejí také v kosmetickém průmyslu pro jejich schopnost zabránit předčasnému stárnutí, dále jako stabilizátory v palivech a mazadlech a jako látky zabraňující degradaci polymerů jako například gumy, plastů apod. [2]

1.8 Doporučená denní dávka antioxidantů

Lidský organismus je vybaven ochrannými antioxidantními systémy, které mohou reaktivní radikály pohlcovat nebo jejich tvorbu brzdit. Mezi tyto systémy patří antioxidantní enzymy, pro jejichž tvorbu a funkci je zapotřebí dostatečné množství některých vitaminů, minerálů, stopových prvků a dalších látek s antioxidantními účinky, které systémy podporují. Tělo si vytváří vlastní antioxidanty, ale vitaminy, minerály a sloučeniny známé jako fotochemické látky (např. flavonoidy), které přijímáme potravou jich poskytují víc.

Velmi důležité je podávání antioxidantů jedincům oslabeným po nemoci, případně starším nebo nezdravě a jednostranně se stravujícím lidem, protože jejich organismus produkuje těchto látek méně.

Podávání antioxidantů má své opodstatnění i v případě obyvatel velkoměst, sportovců a osob náchylných k nádorovému onemocnění.

Dávkování jednotlivých antioxidantů je individuální a konzultace s lékařem je nezbytná. Dávkování preventivní je nižší, dávkování při nemoci nebo při nesprávné stravě je vyšší. Antioxidanty užívané dlouhodobě preventivně zabraňují dalšímu progresivnímu rozvoji aterosklerózy. [3]

1.9 Nové výzkumy vlivu antioxidantů na rychlost stárnutí

Podstatou stárnutí je neschopnost bránit se oxidačnímu poškození a obnovovat pro život důležité makromolekuly neomezeně dlouho. Lidské tělo je schopné z vhodných prekurzorů vytvořit nebo opravit jakoukoliv svoji strukturu. Kdyby systémy antioxidantní ochrany, odbourávání nepotřebných proteinů a opravy DNA byly zcela perfektní, byli bychom nesmrtelní. Tyto systémy však v sobě mají zakódovanou maximální (potenciální) délku našeho života. [5]

V roce 1956 byla zveřejněna studie, která dokazovala vliv velkého množství volných radikálů v těle na stárnutí organismu. Proto byly antioxidanty začleněny do nejrůznějších krémů a přípravků, stejně jako do dietních pilulek a doplňků stravy. V posledních letech byly provedeny nové výzkumy, které zpochybňují tuto studii o volných radikálech.

Například v Institutu Healthy Ageing na University College London (UCL) se prováděly pokusy na háďátku obecném (*Caenorhabditis elegans*). Jedná se o červa z kmene hlístic. Háďátka žije v půdě po celém světě a je významným modelovým organismem a nástrojem

molekulární a vývojové biologie. Hlístice dostaly velké množství volných radikálů, což podle starší teorie mělo zkrátit jejich život. Místo toho však žily stejně dlouho jako běžné hlístice. To dovedlo vědce k závěru, že působení volných radikálů nemusí být hlavní příčinou stárnutí. [9]

Možné vysvětlení přináší rozsáhlá analýza vlivu antioxidantů na snížení úmrtnosti, při níž byly antioxidační potravní doplňky podávány 232 606 účastníkům. Zjistilo se, že vitamin C a selen nemají na mortalitu žádný významný vliv.

Z výsledků provedené studie vyplynulo, že velmi záleží na nutričním stavu populace, která je objektem studie. V případě předchozího deficitu je přídavek antioxidantů prospěšný, jinak je buď neúčinný, nebo dokonce škodí. [16]

2 RÉVOVÉ VÍNO

Víno je alkoholický nápoj vyrobený úplnou nebo částečnou fermentací révového moštu vyrobeného z hroznů. [17]

Chemické složení hroznů umožňuje fermentaci bez přídavku cukru, enzymů, kyselin a jiných živin. Víno je produkováno fermentací rozdrčených hroznů za použití různých druhů kvasnic. Kvasinky spotřebují cukr obsažený v hroznech a přemění jej na alkohol. Ze 100 g cukru vznikne kolem 47 g alkoholu. [18]

Prvotní kvašení moštu způsobuje původní kvasinková flóra hroznů. Ačkoliv tyto kvasinky, které jsou přítomny v půdě, na listech a na plodech, zahajují spontánní kvašení vína, jsou pro řízené kvašení nežádoucí. V přírodě totiž vedle sebe žijí kulturní vinné kvasinky s tzv. divokými kvasinkami, které dělají víno nepoživatelným. Dokvašování se proto provádí ušlechtilými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces oviformis*, které pracují bez kyslíku, čímž dojde k potlačení negativních projevů přírodní mikroflóry a vytvoření většího množství alkoholu. [15, 19]

2.1 Druhy révového vína

Z hlediska barvy rozlišujeme vína na:

1. červená
2. bílá
3. růžová (rosé). [20]

Podle cukernatosti můžeme dělit vína takto:

1. stolní víno - vinné hrozny, z nichž bylo víno vyrobeno, dosáhly cukernatosti alespoň 14°NM (stupňů normalizovaného moštoměru)
2. jakostní víno - vinné hrozny, z nichž bylo víno vyrobeno, dosáhly nejméně 15°NM
3. jakostní vína s přívlastkem - vyrábí se v těchto druzích:
 - kabinetní víno - lze vyrábět pouze z vinných hroznů nejméně 19°NM
 - pozdní sběr - lze vyrábět pouze z vinných hroznů nejméně 21°NM
 - výběr z hroznů - lze vyrábět pouze z vinných hroznů nejméně 24°NM

- výběr z bobulí - je dovoleno vyrábět pouze z vybraných bobulí, které dosáhly nejméně 27°NM
- výběr z cibéb - je dovoleno vyrábět z vybraných bobulí, které dosáhly nejméně 32°NM
- ledové víno – se vyrábí z vinných hroznů, které byly sklizeny při teplotách minus 7°C a nižších a v průběhu sklizně a zpracování zůstaly zamrazeny a získaný mošt vykazoval cukernatost 27°NM
- slámové víno - je dovoleno vyrábět jen z vinných hroznů, které byly před zpracováním skladovány na slámě či rákosu nebo byly zavěšeny ve větraném prostoru po dobu nejméně 3 měsíců, a získaný mošt vykazoval nejméně 27°NM. [21]

2.2 Stavba hroznu

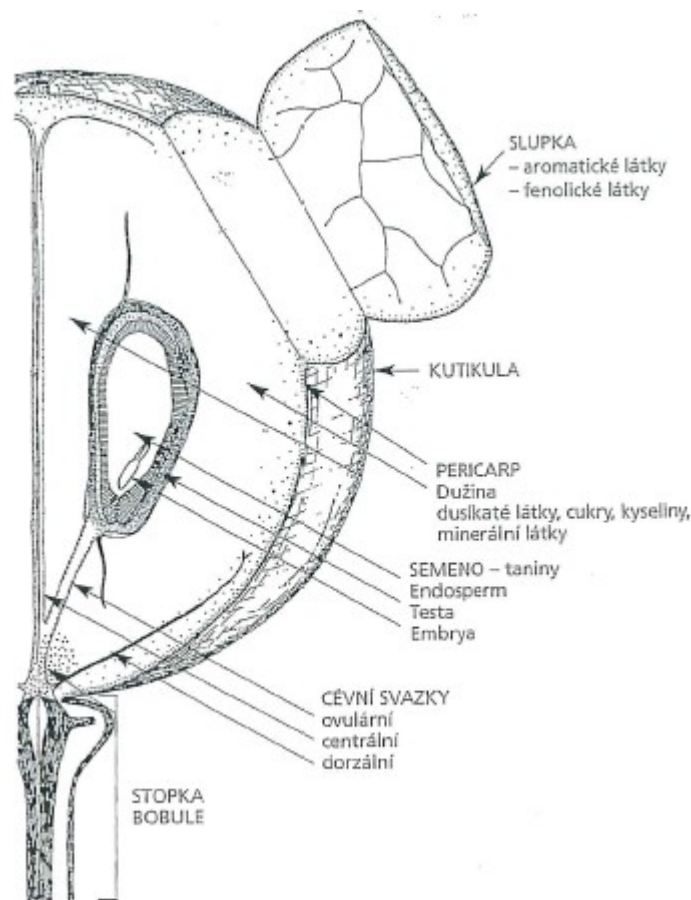
Surovinou na výrobu vína jsou hrozny révy vinné (*Vitis vinifera*), což je liánovitá, světlomilná rostlina, patřící do čeledi *Vitaceae* – révovité. Rod *Vitis* rozdělujeme podle původu do tří ekologických skupin:

- severoamerická skupina
- východoasijská skupina
- euroasijská skupina s jediným druhem *Vitis vinifera*, který se dělí na dva poddruhy, a to révu vinnou lesní (subsp. *sylvestris*) a révu vinnou pravou (subsp. *sativa*). [22]

Hrozen se skládá z bobulí a stopek (třapin). Třapina se až na výjimky k výrobě vína nepoužívá, obsahuje hořké třísloviny. Bobule mají na povrchu slupku, která obsahuje nejjemnější fenoly (barviva, třísloviny, část chuťových látek), uvnitř je dužina, která obsahuje až 37% cukru a 31% kyselin, vinnou a jablečnou. [23]

Tkáň kolem peciček má asi 30% cukrů a 52% kyselin. Pecičky obsahují největší množství fenolů, jejich fenoly však nejsou žádoucí (proto se hrozny odzrňují).

Na obrázku 1 je zobrazen průřez bobulí révy vinné.



Obr. 1. Bobule révy vinné

Po vylisování se z dužiny získává mošt. Bílé víno se obvykle lisuje z hroznů včetně třapin, odtékající mošt se však zkvašuje bez nich. Modré hrozny jsou okamžitě odzrněny a bobule se oddělí od třapiny. Červené zbarvení vzniká tehdy, je-li mošt z modrých hroznů zkvašován společně se slupkami z bobulí. Bílé víno se tedy vyrábí kvašením vylisovaného moštu, zatímco červené víno se vyrábí kvašením rmutu (masa z rozmačkaných bobulí, se stopkami nebo bez nich). [15]

Růžová vína vznikají zásadně z modrých hroznů. Mošt se nechá ale jen zcela krátkou dobu (několik hodin) nakvášet, aby se uvolnila jen část barviva ze slupek. [24]

2.3 Víno a jeho vliv na zdraví člověka

Ačkoliv přílišná konzumace alkoholu má nepříznivé zdravotní účinky, epidemiologická studia současně demonstrovala, že mírná spotřeba alkoholu je spojená s poklesem úmrtí na kardiovaskulární onemocnění. Výsledky studie ukazují, že lidé, kteří konzumují alkohol ve zvýšené míře mají zvýšené riziko onemocnění srdce, zatímco lidé konzumující alkohol v malém množství mají nižší riziko onemocnění než abstinenti. [25]

WHO udává, že ze zdravotního hlediska je bezpečná konzumace asi 20 g čistého alkoholu denně, což odpovídá asi jednomu pivu, 2 dl vína nebo 5 cl 40% destilátu. Některé novodobější prameny uvádí hranici o něco vyšší, a to do 30 g na den. [26]

Výzkumy prokázaly, že po požití dvou skleniček vína denně se zvýší přísun antioxidantů až o 40% ve srovnání s běžnou stravou. [25]

Podle studie kalifornské univerzity může k prevenci onemocnění jater přispět každodenní sklenička vína. Podle průzkumu se riziko onemocnění u osob konzumujících jednu skleničku vína denně snížilo na polovinu proti osobám nekonzumujícím alkohol a u osob s umírněnou konzumací piva nebo lihovin je asi čtyřnásobně vyšší.

Studie se zúčastnilo téměř 12 tis. osob (7 211 abstinentů a 4 543 osob s mírnou konzumací alkoholu). [27]

2.4 Chemické složení vína

Chemický rozbor vína nám ukazuje zastoupení jednotlivých složek vína. Společně s mikrobiologickým rozbohem, kterým zjišťujeme hlavně přítomnost některých mikroorganismů způsobujících nemoci vína a zkoumáme složení zákalů, je chemický rozbor důležitým vodítkem pro vlastní způsoby školení a úpravy jednotlivých druhů vín. Má-li však být posouzena jakost vína, popřípadě jeho odrůdová výraznost a pravost, je nutný subjektivní posudek odborníků, který se vyjadřuje obvykle při degustaci vína počtem bodů podle určité bodovací stupnice.

Na chemické složení vína působí několik zásadních vlivů, podle nichž se mění jednak poměr mezi zastoupením jednotlivých látek, jednak i počet složek utvářejících víno. Největší vliv na chemické složení vína mají čtyři základní činitelé, jsou to odrůda, poloha vinice, půda a počasí během vegetačního období. Kromě nich se může složení měnit podle

zdravotního stavu hroznů, způsobu kvašení a druhu kvasinek, ošetřování, popřípadě i podle jakosti nádob, v nichž se víno přechovává. [23, 28]

Jednotlivé látky určujeme chemickým rozbohem. Podle jejich příbuznosti je řadíme do větších skupin.

Všem netěkavým látkám říkáme souhrnným názvem celkový extrakt vína. Celkový extrakt vína rozdělujeme na bezcukerný extrakt, který může být spalitelný a nespalitelný (tj. popeloviny), a na cukerný extrakt (cukry). [28]

Všechny látky obsažené ve víně jsou rozpuštěny ve vodě. Pro jakost vína je nejdůležitější etylalkohol, kyseliny, celkový extrakt a látky aromatické. [28, 29]

Obecně se má za to, že chemickým rozbohem nelze stanovit vůni, chuť, odrůdový charakter ani celkovou jakost vína. Tyto vlastnosti vyhodnocujeme subjektivním posudkem, tzv. sensorickým rozbohem čili degustací. Chemický rozbor je často nutným doplňkem smyslových posudků, bez nich je však pro celkové posouzení jakosti vína bezcenný. [28]

Srovnání složení jednoho litru vína s litrem moštu kromě vody (vyjádřeno v g) je uvedeno v tabulce 3.

Látka	Mošt	Víno
Etanol	0-5	44-120
Cukr	90-300	2-100
Kyseliny	6-16	4-12
Glycerol	-	5-35
Minerální látky	3-4	2-4
Dusíkaté sloučeniny	3-4	1-3
Barviva a třísloviny	0-4	0-3
Oxid uhličitý	-	0,3-2

Tab. 3. Složení vína a moštu [30]

2.4.1 Voda

Vody je ve víně kolem 85% a jde o biologicky čistou vodu, získanou kořínky révy vinné z hloubi země, a tedy o vodu nejpřirozeněji a nejlépe filtrovanou. Její množství závisí na odrůdě, stupni vyžrání a na klimatických podmínkách během vegetace. [23]

2.4.2 Ethanol

Vína mající pod 10 obj. % alkoholu jsou slabá, nevýrazná. U nás se výjimečně dostávají do prodeje. Jsou to vína z nevyzrálých hroznů, z klimaticky nepříznivého ročníku, ze špatných poloh. Snáze podléhají chorobám než vína s normálním obsahem alkoholu, proto je u nás dovoleno přidávat cukr do moštu, aby obsah alkoholu po vykvášení odpovídal alespoň minimu normy.

Vína prostředně silná mají 10,5 – 12 obj. % alkoholu. Jsou to vína, která se nejčastěji vyskytují v severní oblasti pěstování révy.

Vína mající 12 – 14 obj.% alkoholu jsou silná.

Vína nad 14 obj.% jsou vína velmi silná, těžká.

Vína s vyšším obsahem alkoholu – 16 až 18 i více obj.% jsou obvykle vína, kterým bylo přidáno určité množství vinného destilátu. Patří tedy do kategorie speciálních vín. [20, 29]

2.4.3 Zbytkový cukr

Ve víně najdeme i po přeměně cukrů na alkohol určité zbytkové množství glukózy a fruktózy. Sacharózu pouze tehdy, když byl mošt v méně příznivých ročnících doslazován řepným cukrem. Sacharidy jsou nejdůležitější složkou moštu, výchozí suroviny pro výrobu vína. Ve vínech se nachází také pentózy, zejména L-arabinóza, D-arabinóza a xylóza a z metylpentóz L-rhamnóza, které tvoří cukrovou složku heteroglykosidů. Hrozny také obsahují asi 0,4% pentozanů. [20, 23]

2.4.4 Glycerol

Sladkou chuť dávají vínu i další látky – jako glycerol, vysokomolekulární alkoholy i některé aminokyseliny. Nejdůležitější z nich je však glycerol. Obsah tohoto trojmocného alkoholu ve víně, získaný kvašením, se pohybuje mezi 4 – 10 g/l.

Nasládlejší vína z dobrých, slunných let obsahují více glycerolu než vína z normálních let. Více než 12 g/l glycerolu na 100 g alkoholu mají jen pozdní sběry.

Dobré podmínky pro jeho tvorbu dává zdárný průběh kvašení. Glycerol velmi pomáhá dobré jakosti vína. Dává mu plnost a hladkost.

Mají-li vína větší množství glycerolu a jsou-li velmi plná, s vyšším obsahem alkoholu, charakterizují se jako tučná.

2.4.5 Kyseliny

Z kyselin jsou nejdůležitější kyselina vinná a jablečná.

Obsah kyselin ve víně je pojem relativní. Důležitější pro chuť vína je spíše jejich působení ve víně, než jejich absolutní obsah. Stupeň kyselosti závisí na druhu kyseliny, na obsahu volných kyselin ve víně a na tom, jak dalece jiné látky obsažené ve víně dají kyselinám vyniknout či nikoliv. [29]

Celkový obsah kyselin ve víně je v průměru 5-6 g/l a sestává z různých organických kyselin, z nichž nejdůležitější jsou kyselina vinná, která převládá, dále kyselina jablečná, mléčná a v malých množstvích kyselina jantarová, citrónová, glykolová a glyoxylová.

Kyseliny mají být ve víně s alkoholem a extraktem v harmonickém poměru. Jinak jsou vína tvrdá (s vyšším obsahem kyselin) nebo měkká (s nízkým obsahem kyselin).

Kyselina vinná (dihydroxyjantarová) je dvojsytná kyselina, vyskytující se ve všech částech hroznů i listech. [28]

V době zrání bobulí se kyselina vinná váže na zvyšující se množství draslíku a vzniká hydrogenvinan draselný (vinný kámen). Tento chemický pochod probíhá i během kvašení, zvláště pak vlivem stoupající koncentrace alkoholu. Současně se vylučuje i vinan vápenatý. Oba vinany se po kvašení moštu vylučují jako těžce rozpustné soli. Vyloučením vinného kamene klesá obsah titrovatelných kyselin ve víně průměrně o 2 až 4 g/l. Vinan vápenatý vzniká i při umělém odkyselování vín a moštů. Při tomto technologickém zákroku je třeba dbát na to, aby ve víně zůstalo alespoň 0,5 až 1,0 g/l kyseliny vinné. Jinak by se vápník vázal s jinými kyselinami, hlavně kyselinou jablečnou, s níž tvoří rozpustnou sůl. Tím by zůstal v moště, popřípadě ve víně a způsobil by nepříjemnou zemitou příchuť. [23]

Kyselina jablečná (monohydroxyjantarová) je dvojsytná kyselina, vyskytující se rovněž ve všech částech hroznů. Je méně odolná vůči kyslíku, zvláště při vyšších teplotách. Po dobu zrání hroznů klesá obsah této kyseliny dýcháním. Mošty ze zralých hroznů

obsahují průměrně 3 až 5 % kyseliny jablečné. V nezralých hroznech převládá nad kyselinou vinnou. Kyselost moštu v nepříznivých ročnících závisí tedy do značné míry na kyselině jablečné. [28]

Během kvašení moštu a delším ležením mladého vína na kvasnicích se působením mléčných bakterií štěpí kyselina jablečná na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý, čímž obsah kyselin klesá. [28, 30]

Kyselina citrónová je trojsytná a nachází se jen v nepatrném množství v hroznech i moštech. Při zrání hroznů se její obsah téměř nemění. Účinkem bakterií se však snadno rozkládá, proto ji není možné ve všech vínem dokázat. [23]

2.4.6 Ostatní kyseliny

Kyselina uhličitá působí v mladých vínech příjemně, pokud pochází z vína (vznikla kvašením), nesmí být uměle přidána.

Množství těkavých kyselin – převážně kyseliny octové – od 0,2 do 0,6 g/l nijak neovlivňuje dobrou chuť vína. Méně příjemným dojmem působí vína mající obsah těkavých kyselin mezi 0,8 – 0,9 g/l. Všechna tato vína s maximálním obsahem těkavých kyselin je nutno co nejrychleji zkonsumovat, protože kyselina octová je v nichž již patrná. Při nekontrolovaném kvašení vzniká ve víně i kyselina máselná, která dává vínu nepříjemnou žluklou chuť.

2.4.7 Titrovatelné kyseliny

V chemické analýze je uváděn obsah kyselin v moštu a víně v různých hodnotách – ve volných kyselinách, veškerých kyselinách, titrovatelných kyselinách. Nejčastější je stanovení v titrovatelných kyselinách. Je to souhrn všech volných netěkavých a těkavých kyselin a jejich kyselých solí, které se stanovují titrací hydroxidem sodným nebo draselným. [29]

Titrovatelné kyseliny se u nás přepočítávají a vyjadřují jako kyselina vinná. V některých zemích, např. ve Francii a Rumunsku, se tyto kyseliny udávají jako kyselina sírová. [28]

2.4.8 Stupeň kyselosti vína

Stupeň kyselosti vína je proti stanovení obsahu v titrovatelných kyselinách v g/l pouze výraz pro kyselost prostředí. Stupeň kyselosti je možno také vyjádřit koncentrací vodíkových iontů.

Koncentrace vodíkových iontů závisí nejen na množství volných kyselin ve víně, ale i na jejich disociačních stupních a na množství látek, které váží část vodíkových iontů.

Koncentrace vodíkových iontů se vyjadřuje hodnotami pH. Mošty a vína se pohybují mezi hodnotami 3 – 4. Hodnota pH je velmi důležitým ukazatelem při kontrole stavu vína a pro preventivní nebo akutní zásahy. [29]

2.4.9 Barevné látky v bobulích a ve víně

Z barviv má největší význam červené a modré rostlinné barvivo, patřící do skupiny antokyanu. Sem patří barvivo modrých odrůd – oenin. Toto barvivo je ve vodě nerozpustné, rozpouští se však v alkoholu a vyskytuje se výlučně ve slupkách modrých a červených odrůd. Pouze u odrůdy Inkoustník, dále u některých podnožových odrůd a u přímoploidních hybridů je barvivo i v dužině.

Barvivo získáme nakvašením rmutu na slupkách, čímž se současně vyluhují i třísloviny. Obě složky rozhodují o intenzitě a stálosti barvy červeného vína. Jasně nebo tmavě zbarvení červených vín různých odrůd závisí hlavně na množství barviva ve slupkách a na obsahu kyselin. Vína s vyšším obsahem kyselin mají většinou barvu jasně červenou a jiskrnou, vína s nižším obsahem kyselin pak hnědočervenou a mdlou.

Účinkem většího množství SO_2 se červené barvivo nerozkládá, ale převádí na labilní bezbarvou sloučeninu, která se lehko rozpadá. Víno tím ztrácí barvu. Proudem vzdušného kyslíku nebo po vyprcháání SO_2 se barvivo znovu uvolňuje a barva vína se vrací. [28]

Z ostatních barviv se ve víně setkáváme s chlorofylem, který se nachází s karotenem a xantofylem v chloroplastech rostlinných buněk. [29]

Při dozrávání hroznů v buňkách slupek bobulí dochází k rychlému úbytku chlorofylu. Při delším ležení drti na matolinách se uvedená barviva vyluhují a přechází do moštu včetně tříslovin. Způsobují tak nepříjemnou trávovitou chuť vína. [28]

2.4.10 Třísloviny

Třísloviny v moštích a vínech pocházejí ze semen, slupek a třapin hroznů. Část tříslovin vína může pocházet z dubového dřeva sudů, popřípadě z uměle přidaného taninu při čiření vína. [20]

Třísloviny hroznů se označují jako vinný tanin čili oenotantin. Mají trpkou svíravou příchut', srážejí bílkoviny a chovají se jako slabé kyseliny. [23]

S kovy tvoří soli, zvané tanáty, které jsou převážně barevné.

Podle způsobu zpracování hroznů se třísloviny dostávají v menším či větším množství do vína. Ve větším množství dávají vínu trpkou až svíravou chuť. Tanin je důležitý pro trvanlivost a čištění vína, podporuje rozpouštění červeného barviva při nakvašení a ustaluje je. Přiměřený obsah taninu je podmínkou výrazné a jiskrné barvy červených vín, doplňuje jejich chuť a chrání je proti rozkladným vlivům bakterií. Vyšší obsah taninu u bílých vín zhoršuje jejich kvalitu – víno je drsné. Odzrňováním hroznů se obsah taninu u moštu a bílém vínu dále zmenšuje.

Přebytek tříslovin snížíme čiřením bílkovinnými činidly, které sráží oenotantin v podobě hnědých vloček. [28]

2.4.11 Extrakt

Extrakt je souhrn látek, které zůstávají ve víně po oddestilování alkoholu a ostatních těkavých složek. Jsou to především cukry, netěkavé kyseliny, soli, dusíkaté látky, glycerol, třísloviny, barviva a popel. Obsah extraktu v severních oblastech pěstování révy se pohybuje kolem 23 g/l.

Extrakt dává vínu plnost. Je to důležitý chuťový faktor a znalcem je poměrně lehce zjištělný. Je to velmi důležitá analytická hodnota. Bez cukerný extrakt dostaneme, odečteme-li od veškerého extraktu látky, které přímo nebo po inverzi redukují Fehlingův roztok, tedy odečteme-li z celkového extraktu cukry a netěkavé kyseliny. Extraktový zbytek nám slouží k zjišťování pravosti vína. [20]

2.4.12 Popel

Minerální látky tvoří podstatu popela vína. Popel je souhrn látek, které zůstávají po úplném spálení vína. Jsou to soli tvořeny především kationy draslíku, sodíku, vápníku, hořčíku

a velmi malé množství železa, hliníku a mědi. Z anionů kyselina sírová, fosforečná, solná, křemičitá a uhličítá. Do hroznů se dostávají z půdy ve formě rozpustných solí. [23]

Jsou důležité pro výživu kvasinek, chuť a plnost vína. Množství kolísá od 1,5 do 6,0 g/l podle odrůdy, stupně zralosti, jakosti půdy, počasí a hnojení. Mošty z jižních hroznů mívají minerálních látek více, a to až 10 g/l.

Obsah minerálních látek ve víně se někdy uměle zvyšuje, např. při odkyselování uhličitánem vápenatým, při síření pyrosiřičitanem draselným, při čiření bentonitem apod. [28]

Minerální látky, které jsou obsaženy v bílých a modrých odrůdách révy vinné jsou uvedeny v následující tabulce:

Odrůdy podle barvy bobule		
Minerální látky	Modrá barva bobule	Bílá barva bobule
Sodík (mg)	2	2
Draslík (mg)	320	250
Vápník (mg)	4	19
Hořčík (mg)	4	7
Fosfor (mg)	16	22
Železo (mg)	0,3	0,3
Zinek (mg)	0,1	0,1

Tab. 4. Obsah minerálních látek ve 100 gramech hroznů [31]

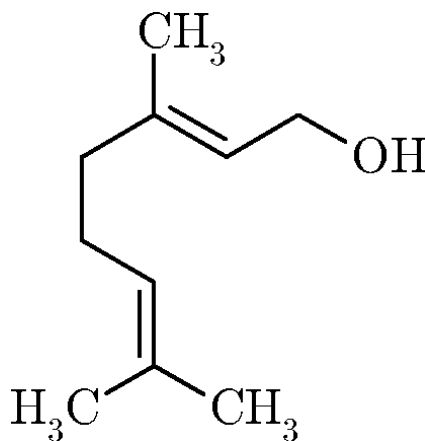
2.4.13 Aromatické látky

Aromatické látky patří mezi nejcennější složky vín, dávají vínu charakteristický výraz a zaručují jakost jemných vín. Jsou rozpustné v alkoholu, na vzduchu se oxidují a ztrácejí charakteristickou vůni. Nalézají se převážně ve slupkách bobulí, odkud přecházejí do moštu. Jejich množství závisí na odrůdě, ročníku, stupni zralosti, způsobu zpracování hroznů i na složení půdy a poloze vinohradu. [20]

Mezi aromatické látky patří směsi aromatických alkoholů, aldehydů, esterů, kyselin, dusíkatých a heterocyklických sloučenin. [25]

V moštu a ve víně různých odrůd révy vinné se nachází stejné aromatické látky, charakteristické aroma vín z různých odrůd révy je způsobeno různým množstvím kombinací těchto látek a také jejich koncentrací. Např. Tramín, Muškát a Ryzlink obsahují vysoké koncentrace terpenů. Charakteristické aroma Muškátu je výsledkem kombinací pouze tří terpenoidních alkoholů: geraniolu, linalolu a nerolu. Mezi jedny z nejdůležitějších aromatických látek ve víně patří také pyraziny. Methoxypyraziny, které mají typický zelený, listnatý až travnatý charakter, jsou charakteristické pro odrůdu Sauvignon. [32]

Vzorec látky, která dává typické aroma odrůdě Muškát je zobrazen níže na obrázku 2.



Obr. 2. Strukturální vzorec geraniolu

Ušlechtilá plíseň *Botrys cinerea* porušuje a často úplně ničí odrůdové aromatické látky a vytváří místo něho úplně jiný víceméně příjemný buket. U mladých vín se setkáváme se specifickými vonnými a chuťovými látkami, které se vytváří během kvašení (kvasné bukety). U vín starších se setkáváme s ležáckým buketem, který při neodborném ošetřování vína přechází v takzvanou stařinu. Specifický je buket vytvořený delším ležením vína, tzv. lahvový buket.

2.4.14 Enzymy

Procesy, které probíhají ve vínech účinkem enzymů mohou být buď pozitivní, nebo negativní. Mezi pozitivní procesy způsobené enzymy patří zejména invertáza sacharózy na invertní cukr a působení pektolytických enzymů, které štěpí pektinové látky. Velmi negativně působí enzymy označované souhrnně jako oxidázy, které katalyzují oxidační procesy vzdušného kyslíku. Z oxidačních enzymů se nejčastěji v moštích vyskytují peroxidáza a polyfenoloxidáza, která je nejaktivnější a rozrušuje barviva a zavinuje hnědnutí vína. [28]

2.4.15 Vitaminy

Ve víně jsou zastoupeny i vitaminy. Čerstvé hrozny obsahují značné množství vitaminů, zejména vitaminů skupiny B. Část vitaminů při zpracování hroznů přejde do moštu, ale značná část zůstane nevyužitá v matolinách. Ve víně najdeme kyselinu askorbovou, thiamin, kyselinu pantotenovou, biotin, kyselinu listovou, vitamin P a kobalamin. Jejich množství v bílých a modrých odrůdách hroznů je uvedeno v tabulce 5. [25]

Odrůdy podle barvy bobule		
Vitaminy	Modrá barva bobule	Bílá barva bobule
Vitamin C (mg)	4	4
Vitamin B1 (mg)	0,04	0,04
Vitamin B2 (mg)	0,02	0,02
Vitamin B6 (mg)	0,10	0,10
Kys. panthotenová (μg)	0,05	0,05
Kys. listová (μg)	6	6
biotin (μg)	0,3	0,3

Tab. 5. Obsah vitaminů ve 100 gramech hroznů [31]

2.4.16 Dusíkaté látky

Ve víně najdeme aminokyseliny a peptidy, v menším množství i bílkoviny, amonné soli, aminy, dusičnany. Dusíkaté látky jsou velmi důležitou skupinou látek v hroznech révy vinné. Nejsou v bobulích rovnoměrně rozmístěny, nejvíce je jich ve vnějších vrstvách slupky. V dužině je jich méně. Rozpustné dusíkaté látky jsou důležitou živinou pro kvasinky. Během kvašení se obsah dusíkatých látek v moště značně snižuje (kvasinky je potřebují pro svou výživu), ale po skončení fermentace se jejich obsah zase pozvolna zvyšuje. Dusíkaté látky mají výrazný vliv na charakter vína. Aminokyseliny se ve víně podílejí na tvorbě aromatických látek, peptidům se přisuzuje pocit plnosti vína a bílkoviny ovlivňují stabilitu vína. [25]

2.4.17 Tuk

V mošttech se nachází asi 10 krát méně tuku než ve vínech (v moště je asi 0,01 g/l a ve víně 0,1 g/l). Na základě této skutečnosti lze předpokládat, že tuk ve víně vzniká až po prokvašení a vzniká pravděpodobně z kvasinek. Výše uvedené množství tuku se skládá z glycerolů kyseliny olejové a myristové.

Nešetrným lisováním může do vína přejít olej, který se nachází v semenech. Ovlivňuje však negativně chuť i vůni vína.

2.4.18 Ostatní látky

Mezi další látky vyskytující se ve víně patří sorbit, inozit a pektinové látky. Sorbit se vyskytuje jen v dobrých ročnících a to ještě v nepatrném množství. Inozit je nezkvasitelný a proto přechází v nezměněné formě do vína.

V nezralých hroznech se nachází protopektin, který se v průběhu zrání hroznů a účinkem kyselin a pektolytických enzymů mění v pektin. Pektiny tvoří podstatnou část koloidních látek ve víně, které působí jako ochrana před sedimentací. [23]

2.4.19 Fenolické látky

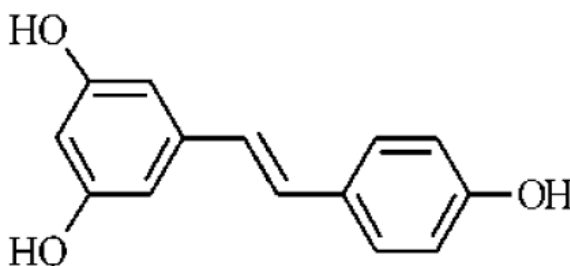
Velkou skupinu ve vinném extraktu představují fenolické látky, které mají rozličné chemické složení. Patří k nim fenolové kyseliny, flavonoidy, antokyaniny a třísloviny. Flavonoidy jsou podle posledních průzkumů z hlediska ochrany zdraví nejdůležitější, protože patří k antioxidantům. Je jich ve víně celá řada. Asi nejzajímavější je resveratrol, který se objevuje v izomerech trans, cis a transcis.

Ve víně byly identifikovány i další flavonoidy jako katechin, epikatechin, kvercetin a rutin a významnými fenolovými kyselinami rovněž s antioxidačními účinky jsou kyselina gallová, protokachetová, kumarová, kávová, vanilinová a ferulová a tento výčet není konečný. [25, 33]

Resveratrol

Vzhledem k tomu, že koncentrace resveratrolu ve většině vín je podstatně nižší ve srovnání s ostatními polyfenoly, zdá se být jeho příspěvek k antioxidačním vlastnostem červeného vína nevýznamný. Je mu však věnována pozornost též v souvislosti s jeho antikancerogenními účinky, které byly popsány v roce 1997. [34]

Strukturní vzorec této látky je zobrazen níže na obrázku 3.



Obr. 3. Strukturní vzorec *trans-resveratrolu*

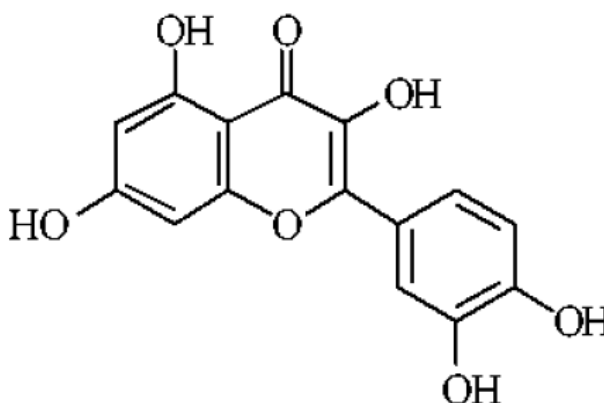
V nejvyšším množství se tato fenolová sloučenina nachází v pokožce hroznového vína. Obecně platí, že červená vína obsahují asi desetkrát více resveratrolu než vína bílá. Resveratrol je produkován jako prostředek k mikrobiální ochraně, jeho výroba však může být uměle povzbuzena ultrafialovým zářením. [35]

V burbundských vínech je obsaženo až 7 miligramů resveratrolu na litr. A obecně platí, že vína ze severnějších zemí, kam patří i naše vinařské oblasti, mají více tohoto flavonoidu než vína ze zemí jižních. Ve vínech z jihu Itálie byly stanoveny průměrně pod 2 miligramy resveratrolu na litr. Ještě hůře dopadly v testech na resveratrol vína z Austrálie, jižní Ameriky a Kalifornie, kde byly naměřeny průměrné hodnoty tohoto antioxidantu pod 1,5 miligramu na litr. U modrých odrůd pěstovaných u nás má Cabernet Sauvignon, Rulandské modré a Zweigeltrebe průměrně ke 4 miligramům resveratrolu na litr. [25]

Kvercetin

Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule (300 mg/kg), jablka (21-72 mg/kg), kapusta (100mg/kg), červené víno (4-16mg/l) a zelený a černý čaj (10-25 mg/l). V těchto zdrojích se nachází jednak ve formě volné, jednak vázán s cukernými jednotkami, např. jako *kvercetin-3-O-glukosid*, *kvercetin-4'-O-glukosid*, *kvercetin-3-O-rhamnosid*. [34]

Na obrázku níže je zobrazen strukturní vzorec této fenolické látky.



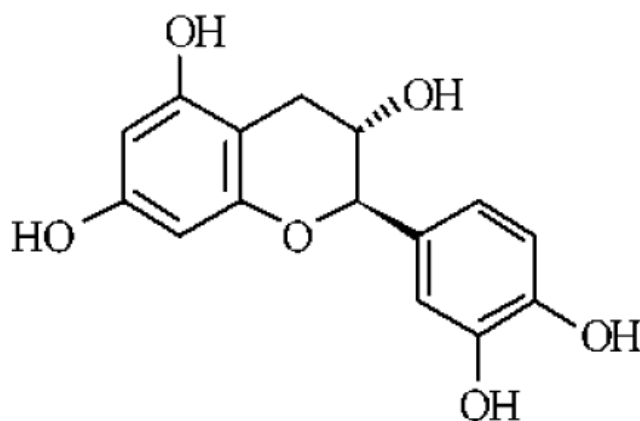
Obr.4. Strukturní vzorec kvercetinu

Katechiny

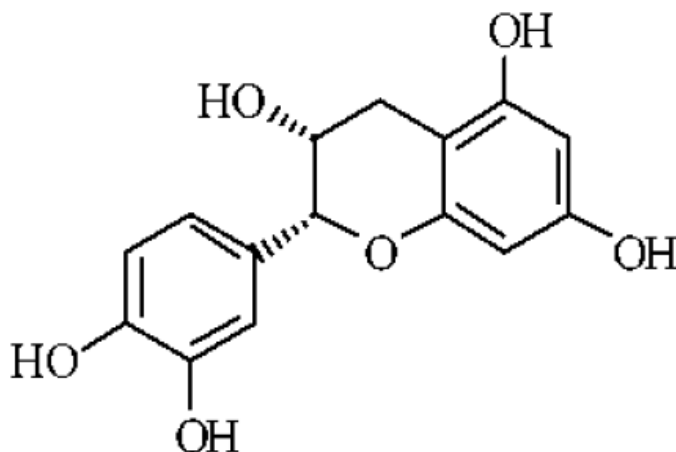
Katechiny jsou složitější fenolické látky, jejichž základní struktura je zobrazena vzorcem. Patří k nim např. katechin, epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou galovou. Jsou hlavně přítomné v čaji. Nálev ze zeleného čaje obsahuje kolem 1g/l katechinů. Další zdroje jsou červené víno (270 mg/l) a čokoláda. [34]

Nachází se ve vysokých koncentracích v semenech hroznů, ale přítomny jsou i v pokožce a ve stopkách. Katechiny hrají důležitou roli v ochraně hroznů před mikroorganismy. Jsou produkovány ve vyšší míře v případě napadení révy vinné například plísněmi. [35]

Na obrázcích 5 a 6 jsou zobrazeny vzorce nejznámějších katechinů.



Obr.5. Strukturní vzorec (+) – katechinu



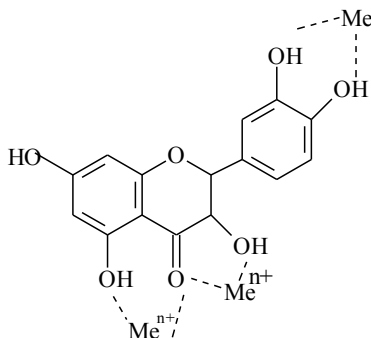
Obr.6. Strukturní vzorec (-) – epikatechinu

Antioxidační účinky polyfenolů

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům:

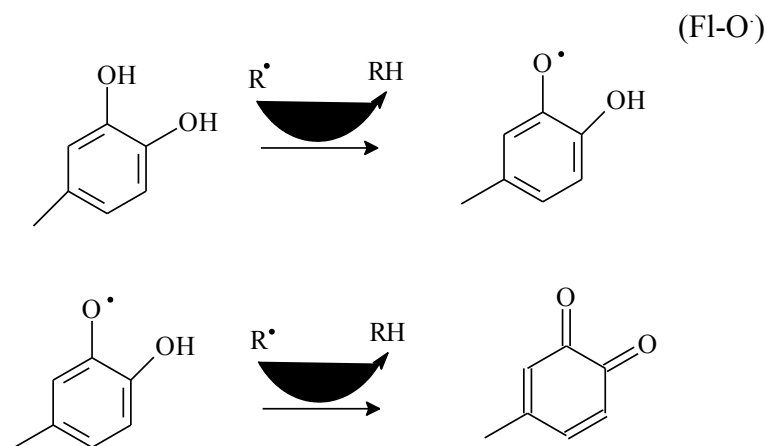
1. Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidázu, proteinkinázu C). Inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenáza, lipooxygenáza, mikrosomální monooxygenázy ad.)

2. Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účastní při tvorbě reaktivních kyslíkových forem např. při Fentonově reakci.



Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů

3. Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná. Snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu. Látky s nízkou hodnotou redox potenciálu ($< 0,75$ V) jsou schopny redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík a samy se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxylový radikál (FI-O \cdot) nebo neradikálové chinoidní struktury. Význam reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve, než reagují s dalšími buněčnými komponentami.



Je však třeba poznamenat, že za určitých okolností mohou některé fenolické látky působit i jako prooxidanty. Za přítomnosti zvýšeného množství přechodných kovů může aroxylový radikál (FI-O \cdot) reagovat i s kyslíkem za vzniku superoxidu a chinonu. [34]

3 STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ VE VÍNĚ

3.1 Podmínky pro stanovení obsahu celkových fenolických látek (CP)

Pro stanovení celkové koncentrace fenolických látek můžeme použít následující kolorimetrickou metodu s Folin-Ciocalteuovým činidlem:

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 1 ml vína a následně se zředí 5 ml destilované vody. K zředěnému vzorku se přidá 2,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a 7,5 ml 20% roztoku Na_2CO_3 . Poté se vzorek doplní po rysku destilovanou vodou a po promíchání se nechá stát 2 hodiny k vybarvení. Stejným postupem se připraví slepý pokus s destilovanou vodou a kalibrační graf se standardními roztoky gallové kyseliny. Absorbance se změří na spektrofotometru proti slepému pokusu při vlnové délce 765 nm. Hodnoty celkových polyfenolů se vyjádří jako mg gallové kyseliny v 1 litru vína. [36]

3.2 Podmínky pro stanovení některých fenolických sloučenin pomocí HPLC

Stanovovaná látka	Kolony	Rozpouštědlové soustavy – mobilní fáze	Detektor
Kyselina gallová	VARIAN C18 (5 μm , 25 cm x 4,6 mm)	A: voda:kyselina mravenčí B: methanol	UV model 996
	NovaPak C18 průměr částic 4 μm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
Katechin	VARIAN C18 (5 μm , 25 cm x 4,6 mm)	A: voda:kyselina mravenčí B: methanol	UV model 996

	Kromasil 100 C18 (5 µm, 25 cm x 4 mm)	voda:kyselina octová:methanol	HP 1100 UV-vis
	Chromolith performance RP-18e	A:methanol:kyselina octová:voda B:voda:kyselina octová:methanol	PAD 100, RF 2000
	Tr-015605 ODS 2 (5 µm, 25 cm x 4 mm)	A:voda:acetonitril:kyselin a octová B: voda:kyselina octová	UV HP 1100, fluorescenční HP 1100
	NovaPak C18 průměr částic 4 µm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
Epikatechin	VARIAN C18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm)	A:voda:kyselina mravenčí B: methanol	UV model 996
	Kromasil 100 C18 (5 µm, 25 cm x 4 mm)	voda:kyselina octová:methanol	HP 1100 UV-vis
	Chromolith performance RP-18e	A:methanol:kyselina octová:voda B:voda:kyselina octová:methanol	PAD 100, RF 2000
	Tr-015605	A:voda:acetonitril:kyselin	UV HP 1100,

	ODS 2 (5 μm, 25 cm x 4 mm) NovaPak C18 průměr částic 4 μm	a octová B: voda:kyselina octová A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	fluorescenční HP 1100 UV-vis
Antokyany	VARIAN C18 (5 μm, 25 cm x 4,6 mm)	A:voda:kyselina mravenčí B: methanol	UV model 996
Antokyanidiny	VARIAN C18 (5 μm, 25 cm x 4,6 mm)	A:voda:kyselina mravenčí B: methanol	UV model 996
Resveratrol	Kromasil 100 C18 (5 μm, 25 cm x 4 mm) Tr-015605 ODS 2 (5 μm, 25 cm x 4 mm) ODS Hypersil (5 μm, 25 cm x 4 mm)	voda:kyselina octová:methanol A:voda:acetonitril:kyselin a octová B: voda:kyselina octová A:acetonitril B:vodný roztok kyseliny chloristé	HP 1100 UV-vis UV HP 1100, fluorescenční HP 1100 DAD

	C18 Brownlee (5 µm, 25 cm)	voda:acetonitril	UV-vis Perkin- Elmer 785A
	RP Fluorid 120 E (5 µm, 25 cm x 4,6 mm)	A:kyselina octová:voda B: A:acetonitril	DAD Merck LaChrom L-7210
	Hypersil H5 ODS C18 (250 x 4,6 mm)	A: acetonitril: 5% vodného roztoku kyseliny octové B: acetonitril: 5% vodného roztoku kyseliny octové C: acetonitril:5% vodného roztoku kyseliny octové	Fluorometrický HP, 61321 A
	Shim-pack C8 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm)	A: 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí B: acetonitril	DAD
Kvercetin	Kromasil 100 C18 (5 µm, 25 cm x 4 mm)	voda:kyselina octová:methanol	HP 1100 UV-vis
	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV

	(10 mm x 4.0 mm)		
	NovaPak C18 průměr částic 4 µm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
	Shim-pack C8 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm)	A: 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí B: acetonitril	DAD
Rutin	Kromasil 100 C18 (5 µm, 25 cm x 4 mm)	voda:kyselina octová:methanol	HP 1100 UV-vis
	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Myricetin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV

Kvercetrin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Rhamnetin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Kaempferol	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Isorhamnetin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV

Fisetin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Apigenin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Luteolin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Galantin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV

Morin	Merc Lichrospher 100 RP-18e (5 µm, 25 cm x 4 mm), Merc RP-18 (10 mm x 4.0 mm)	A:acetonitril:methanol: tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě B:acetonitril:methanol ve vodě	UV-vis SPD- 6AV
Flavonoly	Tr-015605 ODS 2 (5 µm, 25 cm x 4 mm)	A:voda:acetonitril:kyselin a octová B: voda:kyselina octová	UV HP 1100, fluorescenční HP 1100
Prokyanidiny	Tr-015605 ODS 2 (5 µm, 25 cm x 4 mm)	A:voda:acetonitril:kyselin a octová B: voda:kyselina octová	UV HP 1100, fluorescenční HP 1100
Kyselina vanilová	NovaPak C18 průměr částic 4 µm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
Kyselina káвовá	NovaPak C18 průměr částic 4 µm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
Kyselina syringová	NovaPak C18 průměr částic 4 µm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
Hydroxytyrosol	NovaPak C18 průměr částic 4 µm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis

Kyselina ferulová	NovaPak C18 průměr částic 4 μm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
Kyselina kumarová	NovaPak C18 průměr částic 4 μm	A: ocet:voda B: ocet:voda C:ocet:acetonitril:voda	UV-vis
Flavan-3-ol	Hypersil H5 ODS C18 (250 x 4,6 mm)	A: acetonitril: 5% vodného roztoku kyseliny octové B: acetonitril: 5% vodného roztoku kyseliny octové C: acetonitril:5% vodného roztoku kyseliny octové	Fluorometrický HP, 61321 A
Fenolické látky	Nova-Pak C18	A:methanol:kyselina octová:voda B:methanol:kyselina octová:voda	Absorpční 486 Fluorescenční 470 DAD 168 Beckman

Tab. 6. Souhrn podmínek pro stanovení antioxidantů ve víně

3.2.1 Stanovení kyseliny gallové, katechinu, epikatechinu, antokyanů a antokyanidinů

Chemikálie a vzorky:

- Kyselina mravenčí
- Methanol
- Vzorky vína

HPLC zařízení Waters:

- Čerpadlo Model 626
- Automatický regulátor Model 600 S
- Automatický vstřikovač WATERS 717
- Detektor UV Model 996
- Kolona VARIAN C18 (5 μm , 25 cm x 4,6 mm)

Chromatografické podmínky:

- Kolona: VARIAN C18 (5 μm , 25 cm x 4,6 mm)
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- Mobilní fáze: A: voda:kyselina mravenčí (95:5)
B: methanol
- Teplota kolony: 25°C
- Objem dávkovací smyčky: 50 μl
- Vlnová délka při UV detekci: $\lambda = 280 \text{ nm}$ (kyselina gallová, katechin a epikatechin)
a $\lambda = 520 \text{ nm}$ (antokyaniny a antokyanidiny)

Postup:

Vzorky se rozdělí na alikvotní podíly 50 ml, odstraní se kyslík a poté se pod atmosférou dusíku skladují při 4°C v tmavých lahvích. Testují se ihned po otevření láhve.

Nejprve se kolona promývá mobilní fází A po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby se pokračuje gradientovou elucí, čas a množství použité mobilní fáze udává následující tabulka:

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)
5	5 až 8
45	8 až 27
25	27 až 50
10	50 až 100
5	100
2	5
8	5

Tab. 7. Podmínky pro gradientovou eluci pro stanovení antioxidantů [37]

3.2.2 Stanovení katechinu, epikatechinu, resveratrolu, kvercetinu a rutinu v červeném víně

Chemikálie a vzorky:

- Kyselina octová
- Methanol
- Vzorky vína

HPLC zařízení Hewlett-Packard (HP):

- Detektor HP 1100 UV-vis
- Injekční ventil model 7725I se smyčkou o objemu 20 μ l
- Kolona Kromasil 100, C18 (5 μ m, 25 cm x 4 mm)
- Software HP Chem-Station 5.01

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Kromasil 100, C18 (5 μ m, 25 cm x 4 mm)
- Mobilní fáze: směs vody, kyseliny octové a methanolu
- Teplota kolony: 30°C
- Objem dávkovací smyčky: 20 μ l.

- Detekce se provádí pomocí následujících absorbancí a časů:
 - 0 min. při 280 nm,
 - 22.min. při 257 nm,
 - 23,5.min. při 306 nm,
 - 32.min. až do konce při 257 nm.

Postup:

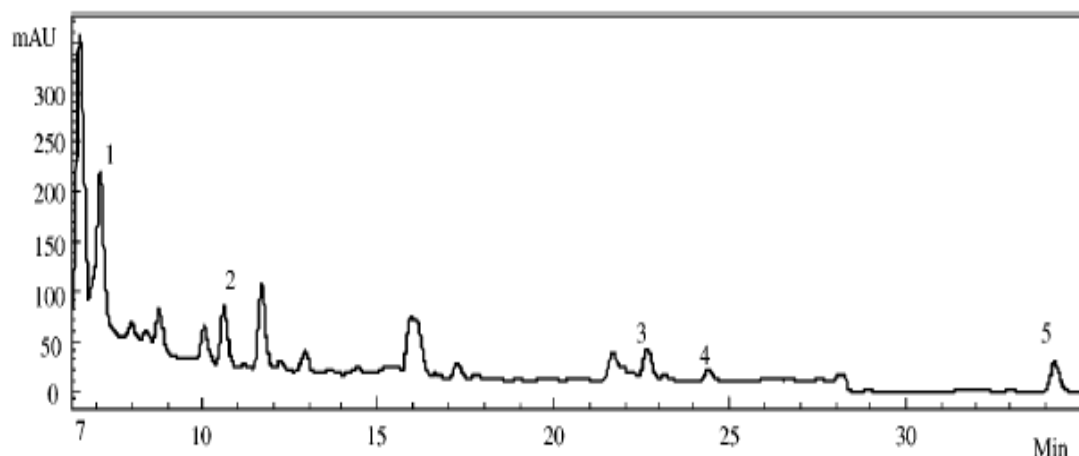
Všechny vzorky se musí skladovat při teplotě 4°C pod argonovou atmosférou v tmavých láhvích, aby byly chráněny před slunečním zářením.

Jako mobilní fáze se používá směs vody, kyseliny octové a methanolu podle následujících pravidel uvedených v tabulce 8:

Čas (min)	Voda:kyselina octová:methanol (%)	Rychlost průtoku (ml/min)
0-5	80:5:15	0,6
5-30	75:5:20	0,7
30-35	50:5:45	0,7
35-42	40:5:55	0,7

Tab. 8. Podmínky pro mobilní fázi pro stanovení antioxidantů

Před použitím dalšího vzorku se kolona promývá 30 minut složením mobilní fáze jako v čase 0-5 minut.



Obr. 7. Chromatogram zobrazující píky 5 fenolických látek, 1: (+) – katechin, 2: (-) – epikatechin, 3: rutin, 4: trans-resveratrol, 5: kvercetin [38]

3.2.3 Stanovení katechinu a epikatechinu v červeném víně

Chemikálie a vzorky:

- Kyselina octová
- Methanol
- Vzorky vína

HPLC zařízení Dionex:

- Automatický vzorkovač ASI-100
- Čerpadlo P-680
- Detektor diodového pole PAD 100
- Detektor fluorescenční RF 2000
- Software Chromeleon 6.60
- Kolona Chromolith performance RP-18e (100mm × 4.6 mm)

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Chromolith performance RP-18e (100mm × 4.6 mm)
- Rychlost průtoku mobilní fáze: 1,0 ml/min.
- Mobilní fáze: A: methanol:kyselina octová:voda (90:8:2)

B: voda:kyselina octová:methanol (10:2:88)

- Vlnová délka pro UV detekci je 200-400 nm
- Vlnová délka pro fluorescenční detekci: excitační: 280 nm, emisní: 310 nm

Postup:

Stanovení katechinu a epikatechinu se provádí reverzní HPLC s detekcí pomocí fluorescence.

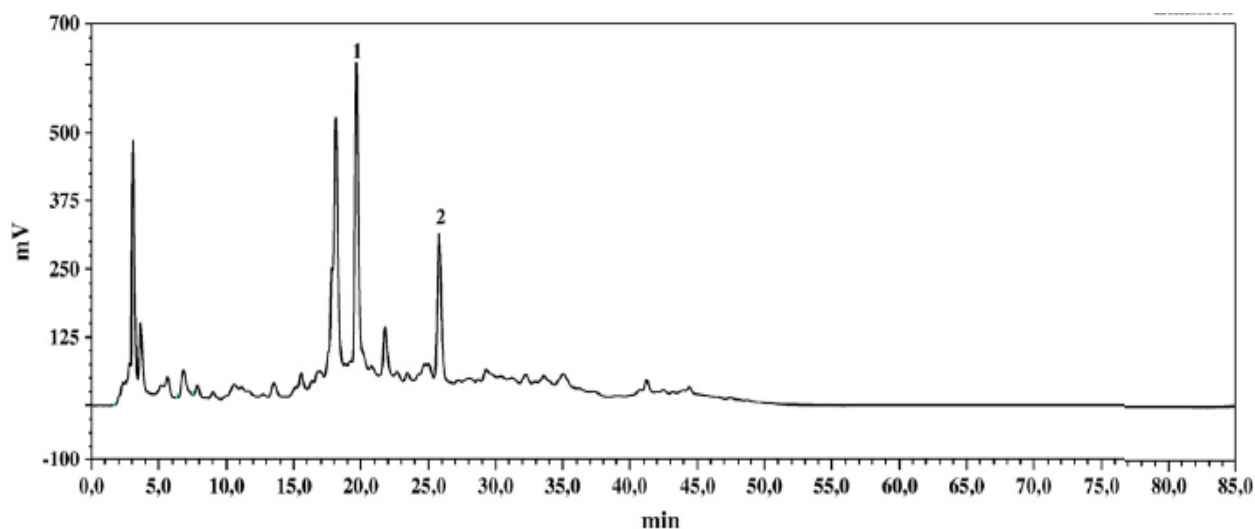
Standardní roztoky katechinu a epikatechinu o koncentraci 100 mg/l se připraví rozpuštěním ve směsi o složení methanol a voda (1:1). Připravené standardy se zředí na potřebné koncentrace.

Všechna vína se před analýzou uloží v temnu při 4°C. Před analýzou se provede filtrace pomocí 0,45 µm membrány.

Mobilní fáze B se dávkuje podle následující tabulky:

Čas (min)	B (%)
1–10	5
10–15	15
15–30	30
30-35	30
35-45	50

Tab. 9. Podmínky pro mobilní fázi B (voda:kyselina octová:metanol)



Obr. 8. Chromatogram brazilského vína Cabernet Sauvignon. Píky: 1. katechin, 2. Epikatechin [39]

3.3 Stanovení flavonoidů v červeném víně

Princip:

Tato metoda HPLC slouží ke stanovení 10 flavonolů a 2 flavonů. Mezi identifikované látky patří kvercetin, myricetin, kvercetrin, rhamnetin, kaempferol, isorhamnetin, rutin, fisetin, apigenin, luteolin, galantin a morin.

Chemikálie a vzorky:

- Methanol
- Acetonitril
- Tetrahydrogenfuran (THF)
- Vzorky vína

HPLC zařízení:

- Kolona Merck LiChrospher 100RP-18e (5 μm , 25 cm x 4 mm) (Merck, Germany)
- Kolona Merck RP-18 (10 mm x 4.0 mm)
- Čerpadlo Shimadu LC-6A series (Japan)
- Injekční ventil SIL-6A

- Detektor UV–vis SPD-6AV
- Software CR6A

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Merck RP-18 (10 mm x 4.0 mm)
- Rychlost průtoku mobilní fáze: 1,0 ml/min.
- Mobilní fáze: A: 19% acetonitril: 5% methanol: 1% tetrahydrogenfuran (THF) ve vodě (pH=3)
B: 55% acetonitril: 15% methanol ve vodě (pH=3)
- Objem dávkovací smyčky: 50 μ l
- Vlnová délka při UV detekci: 360 nm

Postup:

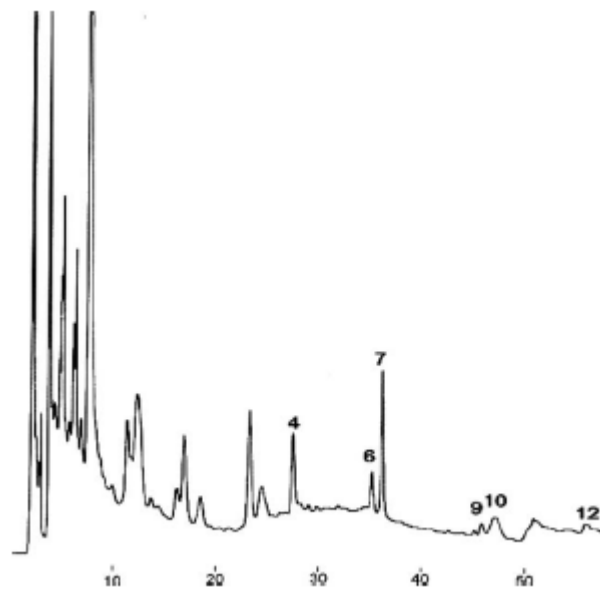
Všech 12 standardů se rozpustí v methanolu tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml, a uloží se do tmy při -20 °C. Všechny tyto standardy jsou při takových podmínkách skladování stabilní po dobu více než 3 měsíců.

Vzorky vína se bez jakékoliv extrakce přefiltrují přes filtr pro organická rozpouštědla s velikostí pórů 0,45 μ m. Vstříkuje se objem 40 μ l takto získaného vzorku přímo do kolony.

Chromatografická separace těchto flavonoidů probíhá pomocí mobilních fází gradientovou elucí podle následujících podmínek uvedených v tabulce:

Čas (min)	B (%)
0-15	2
15-28	2-28
28-40	28-36
40-44	36
44-45	36-80
45-52	80

Tab. 10. Podmínky pro mobilní fázi pro stanovení flavonoidů



Obr. 9. Flavony a flavonoly ve víně: 4.myricetin, 6.luteolin, 7.kvercetin, 9.kaempferol, 10.isorhamnetin, 12.galanin. [40]

3.3.1 Stanovení fenolických látek v červeném víně s UV a fluorescenční detekcí

Pomocí HPLC s UV a fluorescenční detekcí lze rovněž stanovit fenolické látky ve víně.

Chemikálie a vzorky:

- Ethanol
- Kyselina vinná
- Kyselina chlorovodíková
- Diethylether
- Methanol
- Kyselina octová

HPLC zařízení Waters:

- 2 čerpadla (Model 510)
- Automatický vzorkovač (Model 680)
- Injekční ventil Rheodyne Model 7125 se smyčkou 20 μ l
- Software Baseline Workstation 810 (Waters)

- Kolona Nova-Pak C18 (4 μm , 150 mm x 3.9 mm) (Waters)
- Předkolona A Nova-Pak C18
- Absorpční detektor (Model 486)
- Fluorescenční detektor (model 470)
- Detektor DAD model 168 Beckman (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Nova-Pak C18 (4 μm , 150 mm x 3.9 mm) (Waters)
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- Mobilní fáze: A:methanol:kyselina octová:voda (10:2:88)
B:methanol:kyselina octová:voda (90:2:8)
- Objem dávkovací smyčky: 20 μl
- Vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 278 nm, emisní: 360 nm po dobu 17,5 min a excitační: 330 nm, emisní: 374 nm po dobu 16,5 min.
- Vlnová délka při absorpční detekci: 280 nm

Postup:

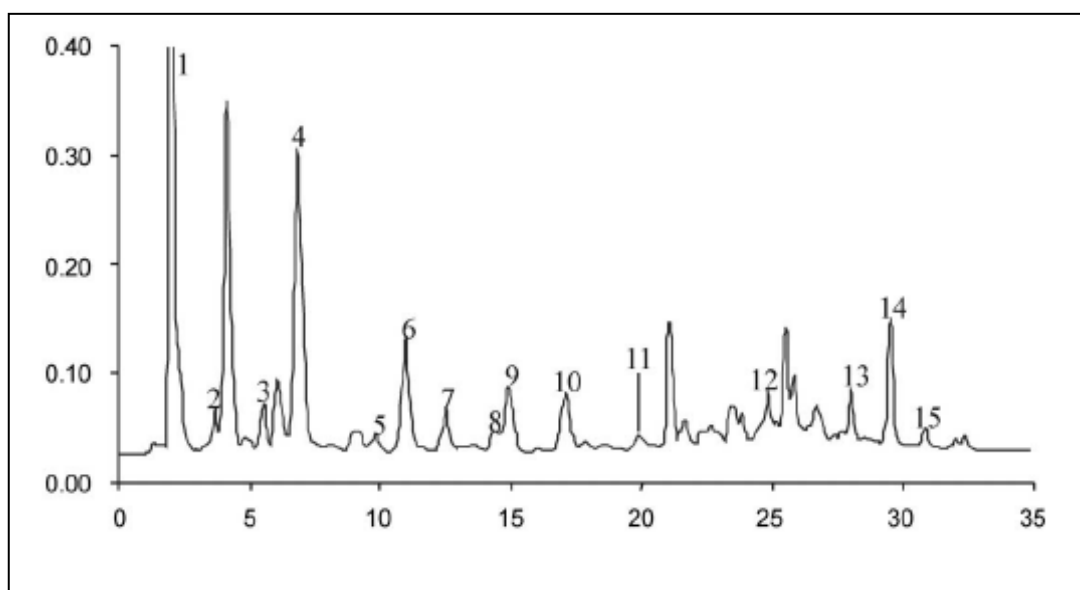
Pro účely kalibrace se připraví standardní roztoky rozpuštěním v rozpouštědle, který připravíme smícháním 15% ethanolu a 3 g/l kyseliny vinné ve vodě. Standardy se připraví o koncentracích v rozmezí 1,8–3,6 mg/l a uchovávají se při $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve tmě.

pH vzorků vín se upraví na pH = 2 přidáním malého množství 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Poté se 5 ml vína extrahuje dvakrát s diethyletherem (5 ml) po dobu 20 minut za použití odstředivky při 180 otáčkách/minutu. Organická fáze se oddělí a vysuší proudem dusíku. Suchý odparek se rozpustí ve směsi methanolu a vody (1/1) a alikvotní podíl se vstříkuje do kolony. Všechny vzorky se zfiltrují přes 0,45 μm celulózový filtr.

Před vlastní analýzou se kolona promývá mobilní fází A po dobu 10 minut. Fenolické sloučeniny se stanoví třístupňovou gradientovou elucí za následujících podmínek uvedených v tabulce:

Čas (min)	A (%)
15	100-85
10	85-50
9	50-30

Tab. 11. Podmínky pro mobilní fázi A pro stanovení fenolických látek



Obr.10. Chromatogram červeného vína za použití absorpčního detektoru. Píky:
 1.kyselina gallová, 2.protokatechová kyselina, 3.aldehyd k. protokatechové,
 4.katechin, 5. vanilinová kyselina, 6.kyselina kávová, 7.kyselina syringová,
 8.epikatechin, 9.aldehyd k.syringové, 10.kyselina kumarová, 11.kyselina ferulová,
 12.myricetin, 13.kvercetrin, 14.kvercetin a 15.kaempferol. [41]

3.3.2 Stanovení 11 fenolických látek ve víně s UV a fluorescenční detekcí

Princip:

Tato metoda HPLC spojená s UV a fluorescenčními detektory je vyhlášena, pomocí ní se dá identifikovat 11 fenolických sloučenin.

Chemikálie a vzorky:

- Methanol
- Acetonitril
- Kyselina octová

HLPC zařízení HP1100 Hewlett-Packard:

- Kvartérní čerpadlo HP1100
- Odplyňovací zařízení HP1100
- Injekční smyčka Rheodyne (Cotati, CA, USA)
- UV Detektor HP1100
- Fluorescenční detektor HP1100
- Software HP Chem Station
- Termostat Spectra Physics 8792 (San José, CA, USA)
- Spektrofotometr Cary 3E UV-Vis (Varian, Australia).

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Tr-015605 TRACER EXTRASIL ODS2 (5 μm , 25cm x 0,4 cm)
- Rychlost průtoku mobilní fáze: 0,8 ml/min.
- Mobilní fáze: A: voda:acetonitril:kyselina octová (67:32:1)
B: voda:kyselina octová (99:1)
- Teplota kolony: 28°C
- Objem dávkovací smyčky: 20 μl
- Vlnová délka při UV detekci: 280 nm (pro flavonoly, procyanidiny a trans-resveratrol)

- Vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 278 nm, emisní: 360 nm (pro stanovení (+)-katechinu, (-)-epikatechinu, prokyanidinu B1 a prokyanidinu B2) a excitační: 300 nm, emisní: 392 nm (pro trans-resveratrol). [5]

Postup:

Standardní zásobní roztoky polyfenolů se připraví rozpuštěním v methanolu a je nutné je skladovat při teplotě 4°C ve tmě. Polyfenoly se identifikují na základě srovnání jejich retenčních časů s retenčními časy standardních vzorků.

Průběh separace je vyjádřen v následující tabulce:

Čas (min)	A (%)	B (%)
0	20	80
4	30	70
8	40	60
12	65	35
16	80	20
20	95	5
21,8	97	3
24	100	-
30	100	-

Tab. 12. Podmínky pro mobilní fáze pro stanovení fenolických látek[42]

3.3.3 Stanovení fenolických látek s detekcí pomocí diodového pole

Princip:

Pro analýzu fenolických látek se používá reverzní fáze vysoko-účinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) ve spojení s detekcí pomocí diodového pole.

Chemikálie a vzorky:

- Ocet
- Acetonitril
- Vzorky vína

HPLC zařízení Jasco CG-1580-02:

- Čerpadlo Jasco PU-980
- Detektor UV/vis nastavený na 250 až 400 nm s rozlišením 4 nm
- Software Jasco DP-L910 / V
- Kolona Nova Pak (Waters, USA) , C18 s průměrem částic 4 μm
- Injekční ventil Rheodyne model 7725i se smyčkou o objemu 20 μl

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Nova Pak (Waters, USA) , C18 s průměrem částic 4 μm
- Rychlost průtoku mobilní fáze: 0,5 ml/min.
- Teplota kolony: 22,5°C
- Mobilní fáze: A: ocet:voda (1:99)
B: ocet:voda (6:94)
C: ocet:acetonitril:voda (5:30:65)
- Objem dávkovací smyčky: 20 μl
- Vlnová délka při UV detekci: 278 nm

Postup:

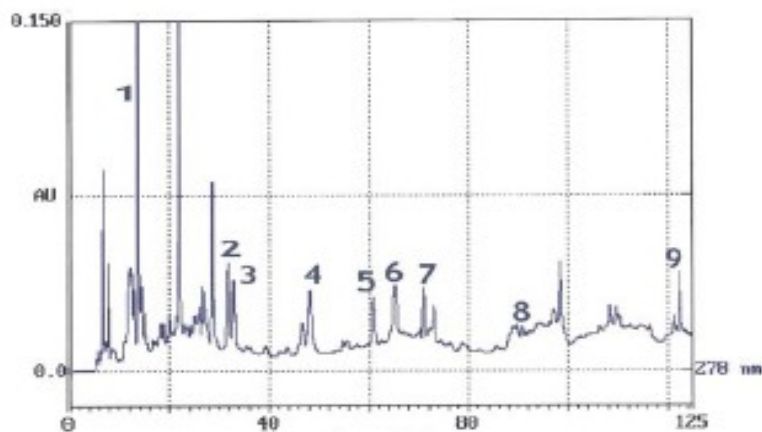
Vzorky vína pro analýzu se upravují pouze filtrací přes membránové filtry 0,45 μm (Millex-HV).

Pracovní standardy se připravují ředěním ve stejném rozpouštědle a jsou skladovány při teplotě -18°C .

Nejdříve se kolona promývá mobilní fází A, ostatní mobilní fáze se gradientovou elucí čerpají do kolony podle následujících podmínek uvedených v tabulce:

Čas (min)	Mobilní fáze (%)
0-15	100 B
15-30	100 B
30-50	90 B + 10 C
50-60	80 B + 20 C
60-80	70 B + 30 C
80-120	100 C
120-140	100 C

Tab. 13. Podmínky pro použití mobilních fází pro stanovení fenolický látek



Obr. 11. Chromatogram červeného vína. Píky: 1.kyselina gallová, 2. (+) – katechin, 3.hydroxytyrosol, 4.kyselina kávová a vanilinová, 5.kyselina syringová, 6.(–) – epikatechin, 7.kyselina kumarová, 8.kyselina ferulová a 9.kvercetin [43]

3.4 Podmínky pro stanovení resveratrolu a jeho izomerů

3.4.1 Stanovení trans-resveratrolu ve víně pomocí HPLC

Princip:

Tato metoda stanovení trans-resveratrolu ve víně je rychlá a citlivá. Spočívá v extrakci pevnou fází následovanou kvantifikací pomocí HPLC. Zlepšení této metody spočívá v odstranění rušivých fenolických sloučenin. Výhodou je také možnost použití malého objemu testovaného vzorku.

Chemikálie a vzorky:

- Ethylacetát
- Ethanol
- Oxid křemičitý
- Methanol
- Pufr (1M K₂HPO₄ : 1M KH₂PO₄)
- Destilovaná voda
- Vzorky vína

Chromatografické podmínky:

- Kolona: ODS Hypersil (5 μm, 250 mm x 4mm)
- Rychlost průtoku mobilní fáze: 1,0 ml/min.
- Teplota kolony: 40°C
- Mobilní fáze: A:acetonitril
B:vodný roztok kyseliny chloristé (0,6 ml/l)
- Objem dávkovací smyčky: 10 μl
- Detekce pomocí diodového pole (310 nm pro detekci trans-resveratrolu)

Postup:

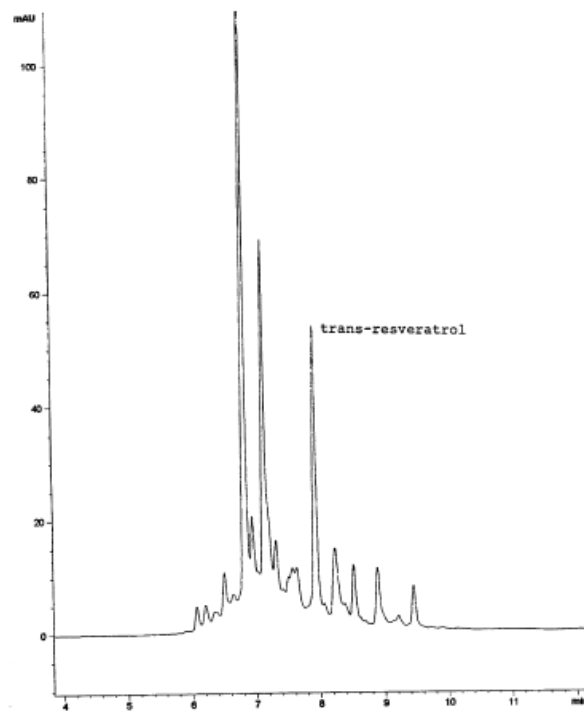
K analýze musí dojít ihned po otevření láhve s vínem. Vzorek vína se promyje 3 ml ethylacetátu, následovně 3 ml 96% ethanolu a nakonec ještě dvakrát 5 ml 12% ethanolu. Poté se 2 ml vzorku vlijí do zásobníku s oxidem křemičitým (500 mg), kde proběhne přečištění na pevné fázi. Následně se vzorek promyje 10 ml destilované vody a 10 ml 12% ethanolu a pH se upraví na 8 pomocí pufru o složení 94:6 1M K₂HPO₄ : 1M KH₂PO₄. Zásobník se poté vysuší pomocí proudu dusíku po dobu 15 minut. Absorbovaný resveratrol se eluuje pomocí 10 ml ethylacetátu a zkoncentruje na rotační vakuové odparce při 30°C a poté rozpustí v 1 ml methanolu. Následně se vstříkuje do kolony, podmínky pro mobilní fázi jsou uvedeny v následující tabulce:

Čas (min)	A (%)
5	5-50
10	60

Tab.14. Podmínky pro mobilní fázi A pro stanovení trans-resveratrolu

Patnáct minut promýváme kolonu s následovným vrácením do původní polohy (5% po dobu 5 minut).

Píky byly identifikovány porovnáním s píky standardů. Pro vyhotovení kalibrační křivky se používá sedm standardů trans-resveratrolu rozpuštěných v methanolu s koncentracemi v rozmezí 0,72-18 mg / l.



Obr. 12. Chromatogram vzorku vína [44]

3.4.2 Stanovení trans-resveratrolu ve víně pomocí HPLC

Chemikálie a vzorky:

- Acetonitril
- Kyselina fosforečná
- Destilovaná voda
- Vzorky vín

HPLC zařízení:

- Detektor Perkin-Elmer 785A UV/VIS nastaven pro skenování 190-360 nm
- Software 4.0 TurboChrom™
- Čerpadlo PE Series 200

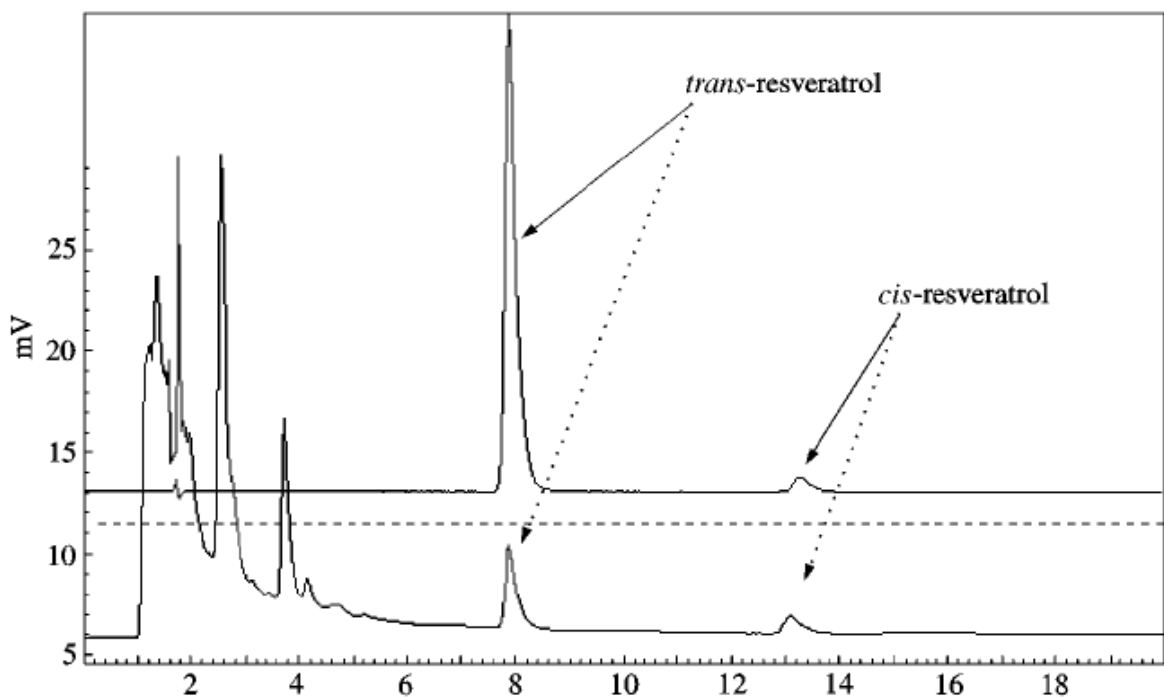
Chromatografické podmínky:

- Kolona: C18 (5 μ m , 250 mm) (Brownlee, Norwalk, U.S.A.)
- Rychlost průtoku mobilní fáze: 1,5 ml/min.

- Teplota kolony: 24°C
- Mobilní fáze: voda: acetonitril (75:25)
- Vlnová délka při detekci: 306 nm

Postup:

Před vlastní analýzou se vzorky vína uchovávají při teplotě 4°C. Po filtraci pomocí membránového filtru 0,45 µm se vzorky 6x zředí pomocí eluátu, jejich pH se upraví na 3 pomocí koncentrované H₃PO₄ a poté se vzorky přímo vstříkují do kolony.



Obr. 13. HPLC chromatogram standardů resveratrolu. [45]

3.4.3 Stanovení derivátů resveratrolu

Chemikálie a vzorky:

- Standardy resveratrolu
- Vzorky vína
- Kyselina octová
- Destilovaná voda

HPLC zařízení Merck-Hitachi L-6200A:

- Automatický dávkovač Merck-Hitachi AS-2000
- Termostat (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany)
- Detektor diodového pole Merck LaChrom L-7210 (Merck, Darmstadt, Germany).

Chromatografické podmínky:

- Kolona: RP-Fluorid 120 E (NEOS Copany Ltd., Kobe/Japan) (5 μ m, 250 mm x 4,6 mm)
- Teplota kolony: 20°C
- Mobilní fáze: A:kyselina octová:voda (56,2:900)
B: A:acetonitril (20:80)
- Vlnová délka při detekci: 310 nm pro identifikaci trans-isomerů a 286 nm pro identifikaci cis-isomerů

Postup:

Standardy cis-resveratrol a cis-piceid se získají z trans izomerů po ozáření UV zářením.

Všechny vzorky se zfiltrují přes filtry Schleicher & Schuell Brown Rim L (Spartan 30/0.45 RC) o velikosti pórů 0,45 μ m a poté se přímo vstříkují do kolony.

Pro mobilní fáze platí následující podmínky uvedené v tabulce 15:

Čas (min)	A (%)	B(%)
0	82	18
10	82	18
17	77	23
21	75	25
27	68	32
30	0	100
40	0	100
40,1	82	18
55	82	18

Tab.15. Podmínky pro mobilní fáze A a B pro stanovení derivátu resveratrolu[46]

3.4.4 Stanovení 4 různých izomerů resveratrolu pomocí HPLC

Princip:

Tato jednoduchá metoda slouží ke stanovení 4 forem resveratrolu (cis- a trans-resveratrolu a jeho dvou glukosidů cis- a trans-piceidu).

Analýza se provádí s použitím dvou HPLC kolon a detekce s diodovým polem. Práce se provádí pomocí série kolon, aby došlo k dostatečnému oddělení 4 forem resveratrolu. Metoda poskytuje spolehlivé separace při nízkém tlaku za krátkou dobu.

Chemikálie a vzorky:

- Methanol
- Standardy trans-resveratrolu
- Vzorky vína
- Kyselina octová
- Acetonitril

- Destilovaná voda

HPLC zařízení Waters (Milford, MA, USA):

- Čerpadlo Model 600
- Automatický dávkovač Model 717
- Detektor fotodiodového pole Model 996
- Software Millenium (Waters)

Chromatografické podmínky:

- Série 2 kolon Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm)
- Mobilní fáze: A: voda:kyselina octová (94:6)
B: voda:acetonitril:kyselina octová (65:30:5)
- Vstřikovaný objem: 20 µl.
- Vlnová délka při detekci: 285 a 306 nm (pro stanovení cis- a trans-isomerů)

Postup:

Kalibrační křivky pro trans-resveratrol se vypracují pomocí standardních roztoků, které se připraví z roztoku 200 mg/l trans-resveratrolu v methanolu. Z něj se připraví roztoky v rozmezí 0,1 mg/l až 10 mg/l. Všechny roztoky se skladují při 4°C a chrání se před slunečním světlem.

Víno se před analýzou skladuje v tmavých lahvích při 15°C, po otevření je nutné ihned vzorky zpracovat. Vzorky vína se zfiltrují přes celulózový filtr s velikostí pórů 0,2 µm a poté se ihned vstřikují do kolony.

Pro kalibraci cis-resveratrolu se nechají standardní roztoky trans-resveratrolu vystavit účinku denního světla po dobu 1 hodiny (pomocí světla dojde k přeměně 80-90% trans-resveratrolu na cis-resveratrol).

Pro analýzu se využívá gradientová eluce. V následující tabulce jsou uvedeny podmínky:

Čas (min)	Rychlost průtoku (ml/min)	A %	B %
-	4,00	85	15
10	7,00	70	30
17	7,00	20	80
18	7,00	0	100
20	4,00	85	15

Tab.16. Mobilní fáze a rychlost průtoku pro stanovení izomerů resveratrolu[47]

3.4.5 Stanovení trans-resveratrolu a flavan-3-olů ve víně pomocí HPLC s fluorescenční detekcí

Princip:

Pomocí této metody lze analyzovat koncentrace trans-resveratrolu, katechinu a epicatechinu.

Chemikálie a vzorky:

- Methanol
- Acetonitril
- Vodný roztok kyseliny octové
- Destilovaná voda
- Vzorky vín

HPLC zařízení HP 1100 series:

- Kvartérní čerpadlo HP, G1311A
- Fluorometrický detektor HP, G1321 A
- Automatický dávkovač vzorku HP, G1329 A

Chromatografické podmínky:

- Kolona: C18 Hypersil H5 ODS (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (250 x 4,6 mm)
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min.
- Mobilní fáze: A: acetonitril: 5% vodného roztoku kyseliny octové (9:91)
B: acetonitril: 5% vodného roztoku kyseliny octové (25:75)
C: acetonitril: 5% vodného roztoku kyseliny octové (70:30)
- Vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 324 nm, emisní: 370 nm po dobu 10 min pro stanovení trans-resveratrolu

Postup:

Zásobní roztoky (1 mg/ml) se připraví rozpuštěním 2,5 mg komerčních produktů v 2,5 ml methanolu. Uchovávají se v tmavých lahvích při 4°C. Pracovní roztoky každého standardu se připraví zředěním destilovanou vodou (1:10) těsně před analýzou.

0,5 ml vzorku vína se centrifuguje při otáčkách 10.000 po dobu 5 minut a poté se umístí do termostatu (+4° C). Poté se vzorek dávkuje přímo do kolony. Gradientová eluce probíhá pomocí 3 mobilních fází. Pro stanovení trans-resveratrolu se používá mobilní fáze A po dobu 10 minut .Pro přípravu kolony k dalšímu vstříkovaní se kolona promývá mobilní fází C a poté mobilní fází A po dobu 5-15 minut. [48]

3.4.6 Stanovení kvercetinu a cis- a trans-resveratrolu ve víně

Chemikálie a vzorky:

- Acetonitril
- Vodný roztok kyseliny mravenčí
- Vzorky vína

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Shim-pack C8 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm) (Shimadzu, Japan)
- Rychlost průtoku mobilní fáze: 1,0 ml/min.
- Mobilní fáze: A: 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí

B: acetonitril

- Vlnová délka při detekci: 370 nm pro stanovení kvercetinu a 285 nm pro cis- a trans-resveratrol.

Postup:

Vzorky vína se přefiltrují přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a poté se objem 20 μl vstříkují přímo do kolony. Izokratická eluce probíhá s použitím 25% mobilní fáze B.

[49]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODIKA PRÁCE

4.1 Stanovení antioxidantů ve víně metodou HPLC – ECD

4.1.1 Chemikálie

- Acetonitril čistoty pro HPLC (dodavatel – Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Kyselina trifluoroctová (dodavatel – Fischer scientific s.r.o., Praha)
- Standardy antioxidantů: katechin, epikatechin, epigallokatechin, monohydrát kyseliny gallové (Labicom s.r.o., Olomouc)
- Redestilovaná voda
- Vzorky vín: Modrý Portugal, Frankovka, Svatovavřínecké, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe rosé (Templářské sklepy, Čejkovice)

4.1.2 Použité pomůcky a přístroje

- Analytické váhy (Adam equipment)
- Laboratorní sklo a pomůcky
- Dávkovací stříkačka (objem 50 µl, Hamilton, Schweiz)
- Mikrofiltry 0,45 µm, nylon (13 mm x 0,45 mm, UK)
- Filtrační aparatura na mobilní fázi (Supelco)
- Mikrofiltry na mobilní fázi LUT Syringe Filters PTFE (25 mm x 0,45 mm, Labicom, s.r.o., Olomouc)
- Aparatura pro HPLC-ECD (ESA – Coulochem III, model 582 Soluent)
 - detektor Coulochem III
 - analytická cela 5010 A
 - guard cela 5020
 - dávkovací ventil (objem dávkovací smyčky 20 µl)
 - PC s vyhodnocovacím programem Clarity
 - kolona ACCLAIM 120 C18 (5 µm, 2,1 x 150 mm), (Dionex corporation, Kanada)

4.1.3 Postup pro naměření kalibračních křivek epigallokatechinu, katechinu, kyseliny gallové a epikatechinu

S přesností na 0,0001g bylo naváženo 0,0002g epigallokatechinu, katechinu, kyseliny gallové a epikatechinu. Navážky byly rozpuštěny v 1 ml 20% roztoku acetonitrilu. Koncentrace zásobního roztoku byla $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze zásobního roztoku epigallokatechinu, katechinu, kyseliny gallové a epikatechinu byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 5, 10, 20, 40 a $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ředěním zásobního roztoku 20% roztokem acetonitrilu. Chromatografická separace probíhala na koloně ACCLAIM C18, $5 \mu\text{m}$ ($2,1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$). Eluce proběhla pomocí mobilní fáze voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová ($\text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_3\text{N} : \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$) v poměru 95: 49,65: 0,35 při 30°C a průtoku $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Kalibrační křivka byla sestavena jako závislost plochy píku [$\text{mV}\cdot\text{s}$] na koncentraci epigallokatechinu, katechinu, kyseliny gallové a epikatechinu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]. K měření bylo použito napětí $K_1 = 700 \text{ mV}$ a $K_2 = 800 \text{ mV}$.

4.1.4 Postup pro stanovení antioxidantů ve víně

Vzorky vín Modrý Portugal, Frankovka, Svatovavřínecké, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe rosé byly testovány ihned po otevření láhve a dále po 10 dnech skladování těchto již otevřených láhví v lednici. Jednotlivé vzorky vín byly přefiltrovány přes mikrofiltry o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$ a vstříkovány do kolony. Jako mobilní fáze byl použit roztok voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová ($\text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_3\text{N} : \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$) v poměru 95: 49,65: 0,35. Chromatografická separace probíhala na koloně ACCLAIM C18, $5 \mu\text{m}$ ($2,1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$). Eluce probíhala při 30°C a průtoku $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Detekce antioxidantů byla provedena pomocí potenciálů na dvou kanálech $K_1=700 \text{ mV}$ a $K_2=800 \text{ mV}$. Tlak při měření byl 188 bar. Každý vzorek byl naměřen třikrát.

4.2 Stanovení antioxidantů ve víně metodou HPLC - UV

4.2.1 Chemikálie

- Acetonitril čistoty pro HPLC (dodavatel – Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Kyselina trifluoroctová (dodavatel – Fischer scientific s.r.o., Praha)
- Redestilovaná voda
- Vzorky vín: Modrý Portugal, Frankovka, Svatovavřínecké, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe rosé (Templářské sklepy, Čejkovice)

4.2.2 Použité pomůcky a přístroje

- Laboratorní sklo a pomůcky
- Aparatura pro HPLC - UV Dionex 3000
 - detekce pomocí diodového pole
 - pumpa Ultimate 300 RS
 - dávkovací ventil Ultimate 300 RS
 - kolona ASCENTIS TM C18 (15 μ m, 15 x 4,6 mm) (SUPELCO, USA)
 - PC s vyhodnocovacím programem Hy Star

4.2.3 Postup pro stanovení antioxidantů ve víně

Vzorky vín Modrý Portugal, Frankovka, Svatovavřínecké, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe rosé byly testovány po 10 dnech skladování otevřených láhví v lednici.

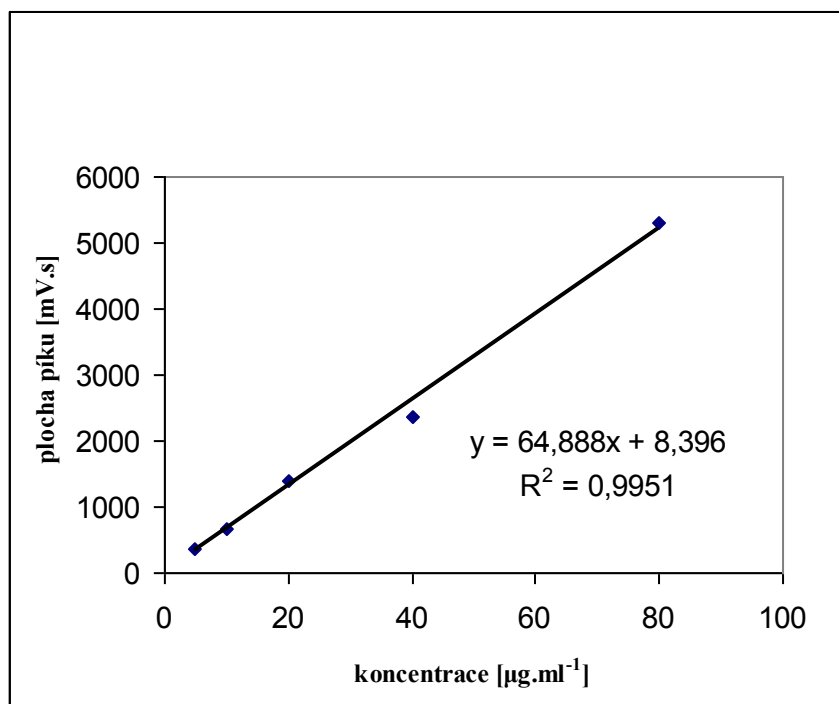
Jako mobilní fáze A byla použita směs voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová (H_2O : C_2H_3N : $C_2HF_3O_2$) v poměru 95: 49,65: 0,35 a jako mobilní fáze B byla použita směs voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová (H_2O : C_2H_3N : $C_2HF_3O_2$) v poměru 50: 49,75: 0,25. Chromatografická separace probíhala na HPLC – UV Dionex 3000 podle následujících podmínek: A:B 90:10 po dobu 10 minut, v 10.minutě 20 % B, v 16.minutě 40 % B, 50% B do 20 minuty a nakonec 40 % B od 25 do 27 minuty. Mezi jednotlivými vstřiky byla pauza 3 minuty a vstřikovaný objem byl 10 μ l. Teplota použitá pro měření byla 30°C a nastavený průtok mobilní fáze byl 1,0 ml.min⁻¹. Měření probíhalo při vlnových délkách 205, 210, 275 a 375 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení epigallokatechinu

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]
5	452,38	20	1490,70
5	300,04	40	2691,90
5	346,23	40	2111,63
10	714,55	40	2287,34
10	689,21	80	5655,63
10	620,79	80	5087,41
20	1488,39	80	5129,49
20	1233,36		

Tab.17. Hodnoty ploch píků pro kalibraci epigallokatechinu

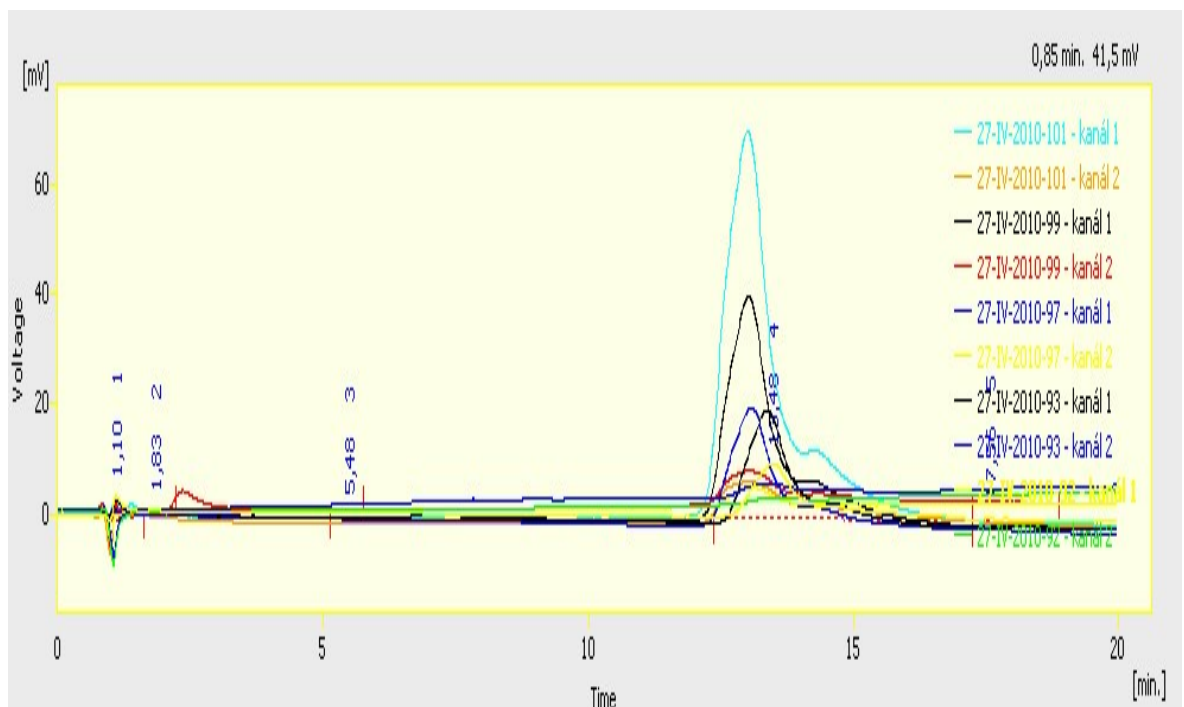


Obr.14. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení epigallokatechinu

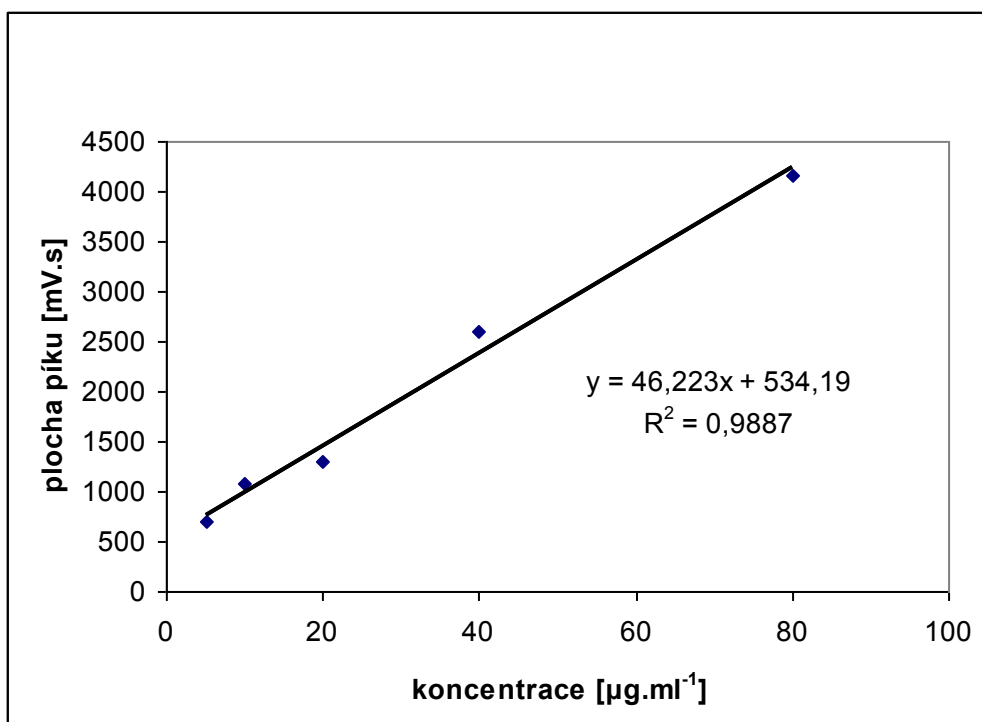
5.2 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení katechinu

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]
5	696,51	20	1299,25
5	720,27	40	2203,93
5	668,98	40	2820,51
10	1167,98	40	2275,13
10	973,19	80	4266,64
10	1102,47	80	4072,01
20	1225,91	80	4127,84
20	1377,93		

Tab.18. Hodnoty ploch píků pro kalibraci katechinu



Obr.15. Záznam signálů pro sestavení kalibrační křivky katechinu

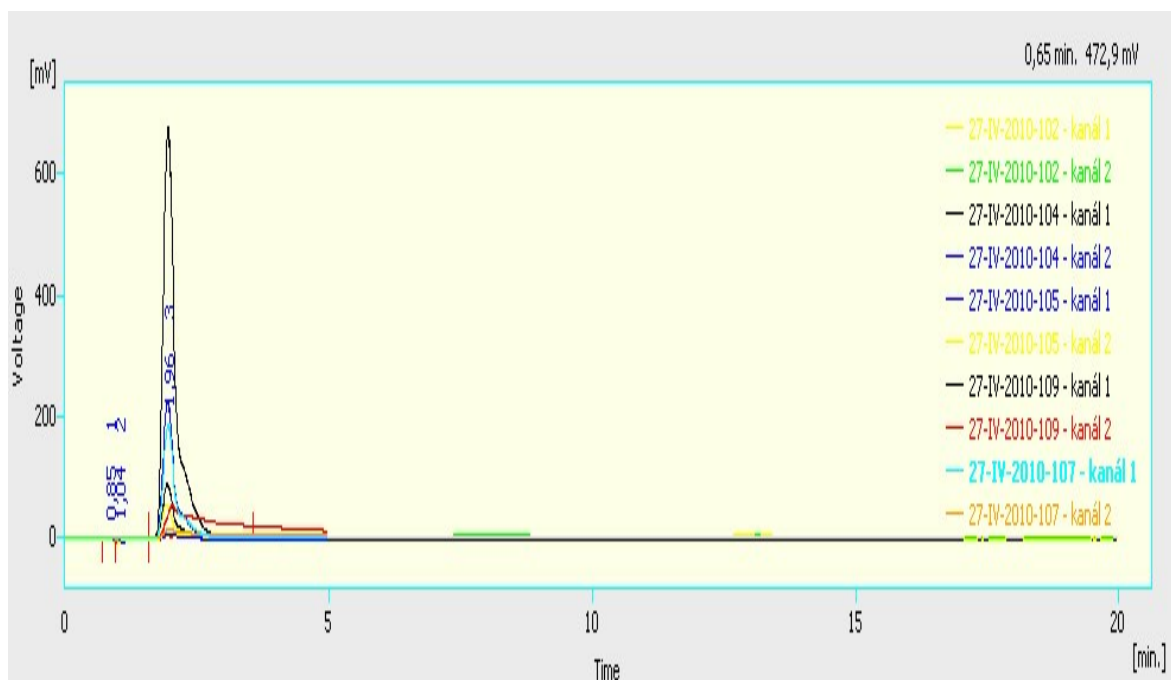


Obr.16. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení katechinu

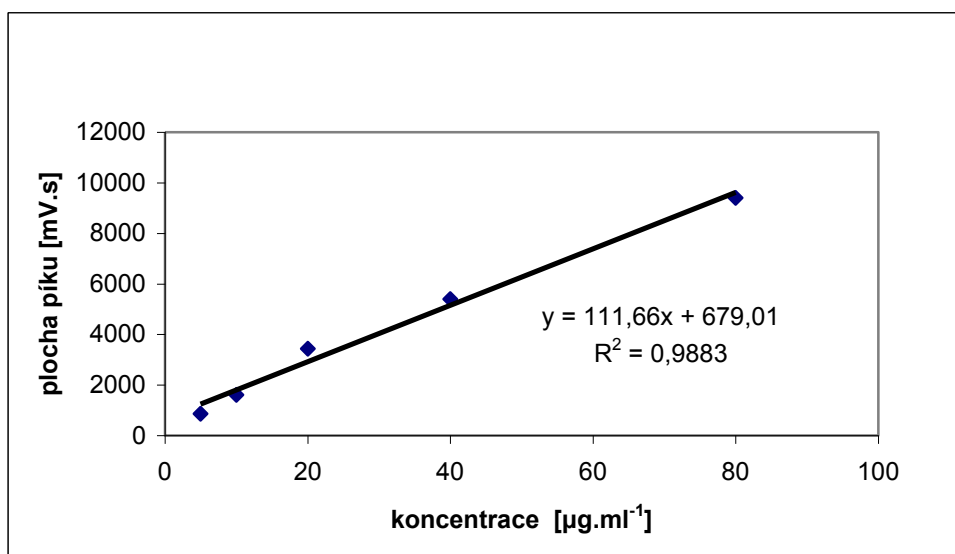
5.3 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny gallové

Koncentrace [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]
5	906,74	20	3386,17
5	839,58	40	5093,83
5	852,75	40	5725,31
10	1507,95	40	5373,94
10	1686,95	80	10413,88
10	1621,89	80	8640,81
20	3771,54	80	9156,27
20	3131,25		

Tab.19. Hodnoty ploch píků pro kalibraci kyseliny gallové



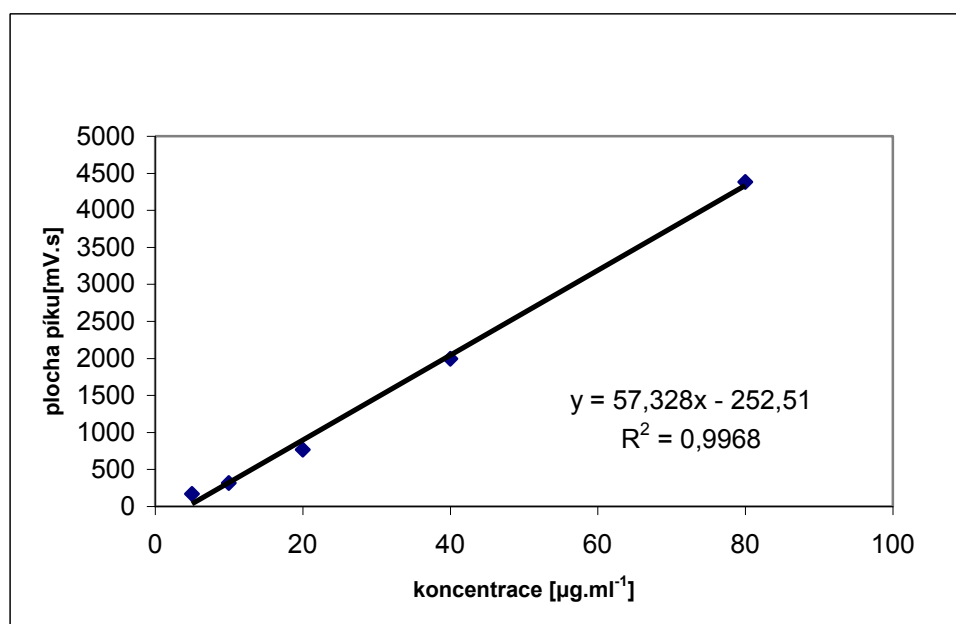
Obr.17. Záznam signálů pro sestavení kalibrační křivky kyseliny gallové



Obr.18. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení kyseliny gallové

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mV.s]
5	163,53	20	759,36
5	171,28	40	1952,95
5	166,75	40	1995,88
10	306,01	40	2035,46
10	317,03	80	1952,95
10	321,69	80	1995,88
20	746,89	80	2035,46
20	789,13		

Tab.20. Hodnoty ploch píků pro kalibraci epikatechinu



Obr.19. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení epikatechinu

5.4 Stanovení obsahu antioxidantů ve vzorcích vína metodou HPLC – ECD

Ke statistickému zpracování výsledků byly použity tyto vzorce:

$$\text{Aritmetický průměr, který se nejvíce blíží skutečné hodnotě: } \bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad (1)$$

$$\text{Směrodatná odchylka pro odhad nahodilých chyb: } s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \right)} \quad (2)$$

Průměrný obsah jednotlivých antioxidantů byl vypočten podle vzorce (1). Podle vzorce (2) byl vypočítán odhad směrodatné odchylky.

5.4.1 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Cabernet Sauvignon po otevření láhve

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
10170,34	85,00	0,85	0,027	0,00070
9856,23	82,19	0,82	-0,0017	0,000028
9597,63	79,87	0,80	-0,025	0,00062

Tab.21. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Cabernet Sauvignon

Obsah kyseliny gallové ve víně Cabernet Sauvignon je 0,82 ± 0,03 mg.100g⁻¹ .
--

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
3256,64	50,06	0,50	-0,0013	0,0000017
3156,87	48,52	0,49	-0,017	0,00028
3381,70	51,99	0,52	0,018	0,00032

Tab.22. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Cabernet Sauvignon

Obsah epigallokatechinu ve víně Cabernet Sauvignon je $0,50 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
3046,96	57,55	0,58	-0,039	0,0015
2867,54	54,42	0,54	-0,071	0,0050
3902,58	72,48	0,73	0,11	0,012

Tab.23. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Cabernet Sauvignon

Obsah epikatechinu ve víně Cabernet Sauvignon je $0,62 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
8591,76	197,39	1,97	0,030	0,00093
8359,55	192,37	1,92	-0,020	0,00039
8401,92	193,28	1,93	-0,011	0,00011

Tab.24. Hodnoty pro katechin ve vzorku Cabernet Sauvignon

Obsah katechinu ve víně Cabernet Sauvignon je $1,94 \pm 0,03 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.2 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1316,58	5,71	0,057	0,0085	0,000073
1145,14	4,18	0,042	-0,0068	0,000046
1201,84	4,68	0,047	-0,0017	0,0000030

Tab.25. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování

Obsah kyseliny gallové ve víně Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování je $0,049 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
461,59	12,46	0,13	0,0069	0,000048
398,49	11,36	0,11	-0,0041	0,000017
405,99	11,49	0,12	-0,0028	0,0000078

Tab.26. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování

Obsah kyseliny epikatechinu ve víně Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování je $0,12 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Stanovení obsahu epigallokatechinu a katechinu není možné z důvodu překrývajících se píků.

5.4.3 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Modrý Portugal

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
26618,55	232,31	2,32	0,18	0,03252048
24083,43	209,60	2,10	-0,047	0,0022
23112,83	200,91	2,01	-0,13	0,018

Tab.27. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Modrý Portugal

Obsah kyseliny gallové ve víně Modrý Portugal je $2,14 \pm 0,16 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
26657,72	410,70	4,11	0,20	0,040
24339,96	374,98	3,75	-0,16	0,025
25102,37	386,73	3,87	-0,041	0,0017

Tab.28. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Modrý Portugal

Obsah epigallokatechinu ve víně Modrý Portugal je $3,91 \pm 0,18 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
23265,67	410,24	4,10	0,35	0,12
19879,26	351,17	3,51	-0,24	0,060
20697,27	365,44	3,65	-0,10	0,010

Tab.29. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Modrý Portugal

Obsah epikatechinu ve víně Modrý Portugal je $3,76 \pm 0,31 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
2502,05	65,67	0,66	0,068	0,0046
1902,33	52,70	0,53	-0,062	0,0038
2158,61	58,24	0,58	-0,006	0,000039

Tab.30. Hodnoty pro katechin ve vzorku Modrý Portugal

Obsah katechinu ve víně Modrý Portugal je $0,59 \pm 0,07 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.4 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Modrý Portugal po 10 dnech skladování

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1667,41	8,85	0,089	0,012	0,00014
1429,36	6,72	0,067	-0,0096	0,000091
1511,23	7,45	0,075	-0,0022	0,0000049

Tab.31. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Modrý Portugal po 10 dnech skladování

Obsah kyseliny gallové ve víně Modrý Portugal po 10 dnech skladování je **0,077 \pm 0,01 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1466,43	22,47	0,23	0,0012	0,0000015
1391,86	21,32	0,21	-0,010	0,00011
1516,99	23,25	0,23	0,0090	0,000081

Tab.32. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Modrý Portugal po 10 dnech skladování

Obsah epigallokatechinu ve víně Modrý Portugal po 10 dnech skladování je **0,22 \pm 0,01 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
915,13	20,37	0,20	-0,010	0,00011
1021,40	22,22	0,22	0,0082	0,000067
986,58	21,61	0,22	0,0021	0,0000045

Tab.33. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Modrý Portugal po 10 dnech skladování

Obsah epikatechinu ve víně Modrý Portugal po 10 dnech skladování je **0,21 \pm 0,01 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

V retenčním čase pro katechin nebyl zobrazen žádný pik.

5.4.5 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Svatovavřínecké

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
33247,70	291,68	2,92	0,21	0,046
28776,32	251,63	2,52	-0,19	0,035
30569,74	267,69	2,68	-0,026	0,00070

Tab.34. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Svatovavřínecké

Obsah kyseliny gallové ve víně Svatovavřínecké je **2,70 \pm 0,20 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
26302,81	405,23	4,052	-0,0053	0,000028
26605,78	409,90	4,099	0,041	0,0017
26103,55	402,16	4,022	-0,036	0,0013

Tab.35. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Svatovavřinecké

Obsah epigallokatechinu ve víně Svatovavřinecké je $4,06 \pm 0,04 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
12847,31	228,51	2,29	0,43	0,19
8840,56	158,62	1,59	-0,27	0,071
9427,57	168,85	1,69	-0,16	0,027

Tab.36. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Svatovavřinecké

Obsah epikatechinu ve víně Svatovavřinecké je $1,85 \pm 0,38 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
3932,67	96,62	0,97	0,12	0,015
3156,53	79,83	0,80	-0,046	0,0021
3014,51	76,76	0,77	-0,076	0,0058

Tab.37. Hodnoty pro katechin ve vzorku Svatovavřinecké

Obsah katechinu ve víně Svatovavřinecké je $0,84 \pm 0,11 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.6 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Svatovavřinecké po 10 dnech skladování

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1667,41	8,85	0,089	0,012	0,00013
1493,07	7,29	0,073	-0,0042	0,000017
1457,93	6,98	0,070	-0,0073	0,000053

Tab.38. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Svatovavřinecké po 10 dnech skladování

Obsah kyseliny gallové ve víně Svatovavřinecké po 10 dnech skladování je $0,077 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
915,13	13,97	0,14	-0,0009	0,00000078
869,19	13,27	0,13	-0,0080	0,000063
978,30	14,95	0,15	0,0089	0,000078

Tab.39. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Svatovavřínecké po 10 dnech skladování

Obsah epigallokatechinu ve víně Svatovavřínecké po 10 dnech skladování je **0,14 \pm 0,01 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
966,32	21,26	0,21	0,013	0,00016
870,47	19,59	0,20	-0,0040	0,000016
843,58	19,12	0,19	-0,0087	0,000076

Tab.40. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Svatovavřínecké po 10 dnech skladování

Obsah epikatechinu ve víně Svatovavřínecké po 10 dnech skladování je **0,20 \pm 0,01 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1266,43	38,95	0,39	0,024	0,00056
1041,92	34,09	0,34	-0,025	0,00062
1162,83	36,71	0,37	0,0010	0,0000020

Tab.41. Hodnoty pro katechin ve vzorku Svatovavřinecké po 10 dnech skladování

Obsah katechinu ve víně Svatovavřinecké po 10 dnech skladování je $0,37 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.7 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Frankovka

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
19508,97	168,64	1,69	0,13	0,016
17653,78	152,02	1,52	-0,041	0,0017
17159,93	147,60	1,48	-0,085	0,0072

Tab.42. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Frankovka

Obsah kyseliny gallové ve víně Frankovka je $1,56 \pm 0,11 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
15842,28	244,02	2,44	0,034	0,0012
15240,68	234,75	2,35	-0,059	0,0035
15783,52	243,11	2,43	0,025	0,00062

Tab.43. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Frankovka

Obsah epigallokatechinu ve víně Frankovka je $2,41 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
9071,99	162,65	1,63	0,017	0,00030
8893,42	159,54	1,60	-0,014	0,00019
8951,83	160,56	1,61	-0,0036	0,000013

Tab.44. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Frankovka

Obsah epikatechinu ve víně Frankovka je $1,61 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1640,49	47,04	0,47	-0,035	0,0012
1826,89	51,07	0,51	0,0060	0,000032
1935,14	53,41	0,53	0,029	0,00084

Tab.45. Hodnoty pro katechin ve vzorku Frankovka

Obsah katechinu ve víně Frankovka je $0,51 \pm 0,03 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.8 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Frankovka po 10 dnech skladování

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1645,66	8,66	0,087	-0,022	0,00050
1951,67	11,40	0,11	0,0051	0,000026
2087,55	12,62	0,13	0,017	0,00030

Tab.46. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování

Obsah kyseliny gallové ve víně Frankovka po 10 dnech skladování je $0,11 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
489,76	7,42	0,074	-0,0079	0,000062
637,67	9,70	0,097	0,015	0,00022
495,24	7,50	0,075	-0,0070	0,000050

Tab.47. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování

Obsah epigallokatechinu ve víně Frankovka po 10 dnech skladování je **0,082 \pm 0,01 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1964,87	38,68	0,39	0,017	0,00029
1878,61	37,17	0,37	0,0021	0,0000044
1756,29	35,04	0,35	-0,019	0,00037

Tab.48. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování

Obsah epikatechinu ve víně Frankovka po 10 dnech skladování je **0,037 \pm 0,02 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
921,75	31,49	0,32	0,018	0,00033
761,32	28,02	0,28	-0,016	0,00027
829,37	29,49	0,30	-0,0020	0,0000030

Tab.49. Hodnoty pro katechin ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování

Obsah katechinu ve víně Frankovka po 10 dnech skladování je $0,30 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.9 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Rulandské modré

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
18803,89	162,32	1,62	0,010	0,00011
18446,30	159,12	1,59	-0,022	0,00047
18816,06	162,43	1,62	0,011	0,00013

Tab.50. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Rulandské modré

Obsah kyseliny gallové ve víně Rulandské modré je $1,61 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
11460,19	176,49	1,77	-0,13	0,017
12453,84	191,80	1,92	0,024	0,00057
12983,55	199,96	2,00	0,11	0,011

Tab.51. Hodnoty epigallokatechin ve vzorku Rulandské modré

Obsah epigallokatechinu ve víně Rulandské modré je $1,89 \pm 0,12 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
16111,94	285,45	2,86	-0,031	0,00094
16453,84	291,42	2,91	0,029	0,00084
16298,23	288,70	2,89	0,0018	0,0000032

Tab.52. Hodnoty epikatechin ve vzorku Rulandské modré

Obsah epikatechinu ve víně Rulandské modré je $2,89 \pm 0,03 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
54408,72	1188,39	11,88	-0,19	0,036
56471,14	1233,00	12,33	0,26	0,065
54986,29	1200,88	12,01	-0,065	0,0043

Tab.53. Hodnoty katechin ve vzorku Rulandské modré

Obsah katechinu ve víně Rulandské modré je $12,07 \pm 0,23 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.10 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Rulandské modré po 10 dnech skladování

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1716,28	9,29	0,093	0,0035	0,000012
1612,25	8,36	0,084	-0,0058	0,000034
1702,60	9,17	0,092	0,0023	0,0000052

Tab.54. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování

Obsah kyseliny gallové ve víně Rulandské modré po 10 dnech skladování je $0,089 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1216,07	18,61	0,19	-0,013	0,00018
1434,50	21,98	0,22	0,020	0,00041
1259,06	19,27	0,19	-0,0068	0,000046

Tab.55. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování

Obsah epigallokatechinu ve víně Rulandské modré po 10 dnech skladování je $0,20 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1042,43	22,59	0,23	0,00090	0,0000089
1045,05	22,63	0,23	0,0014	0,0000020
1023,59	22,26	0,22	-0,0023	0,0000055

Tab.56. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování

Obsah epikatechinu ve víně Rulandské modré po 10 dnech skladování je **0,23 \pm 0,002 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
2434,50	64,21	0,64	-0,055	0,0030
2857,42	73,36	0,73	0,037	0,0014
2769,36	71,45	0,72	0,018	0,00032

Tab.57. Hodnoty pro katechin ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování

Obsah epikatechinu ve víně Rulandské modré po 10 dnech skladování je **0,70 \pm 0,05 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

5.4.11 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Zweigeltrebe rosé

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
12399,43	104,97	1,05	0,016	0,00024
12185,41	103,05	1,03	-0,0037	0,000014
12095,85	102,25	1,02	-0,012	0,00014

Tab.58. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Zweigeltrebe rosé

Obsah kyseliny gallové ve víně Zweigeltrebe rosé je $1,03 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
5153,54	94,30	0,94	0,0032	0,000010
4986,98	91,40	0,91	-0,026	0,00067
5265,00	96,25	0,96	0,023	0,00051

Tab.59. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Zweigeltrebe rosé

Obsah epikatechinu ve víně Zweigeltrebe rosé je $0,94 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

5.4.12 Stanovení obsahu antioxidantů ve víně Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
1024,88	3,10	0,031	0,0030	0,0000091
959,85	2,52	0,025	-0,0028	0,0000079
988,72	2,77	0,028	-0,00020	0,000000050

Tab.60. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování

Obsah kyseliny gallové ve víně Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování je **$0,028 \pm 0,003 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
261,68	3,90	0,039	-0,0058	0,000033
328,75	4,94	0,049	0,0046	0,000021
306,82	4,60	0,046	0,0012	0,0000014

Tab.61. Hodnoty pro epigallokatechin vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování

Obsah epigallokatechinu ve víně Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování je **$0,045 \pm 0,005 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
248,83	8,75	0,087	0,0010	0,00000096
239,75	8,59	0,086	-0,00060	0,00000036
241,06	8,61	0,086	-0,00040	0,00000014

Tab.62. Hodnoty pro epikatechin vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování

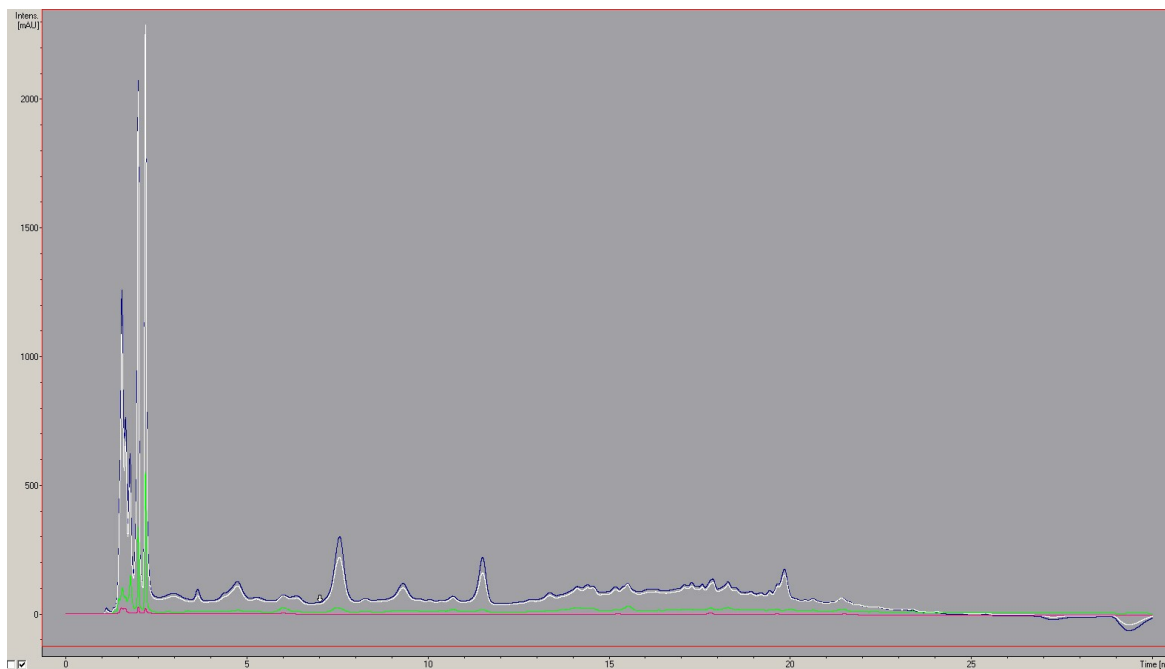
Obsah epikatechinu ve víně Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování je **0,086 \pm 0,001 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

Plocha píku [mV.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
925,31	31,57	0,32	0,0010	0,000000
938,61	31,86	0,32	0,0030	0,000012
904,79	31,13	0,31	-0,0040	0,000015

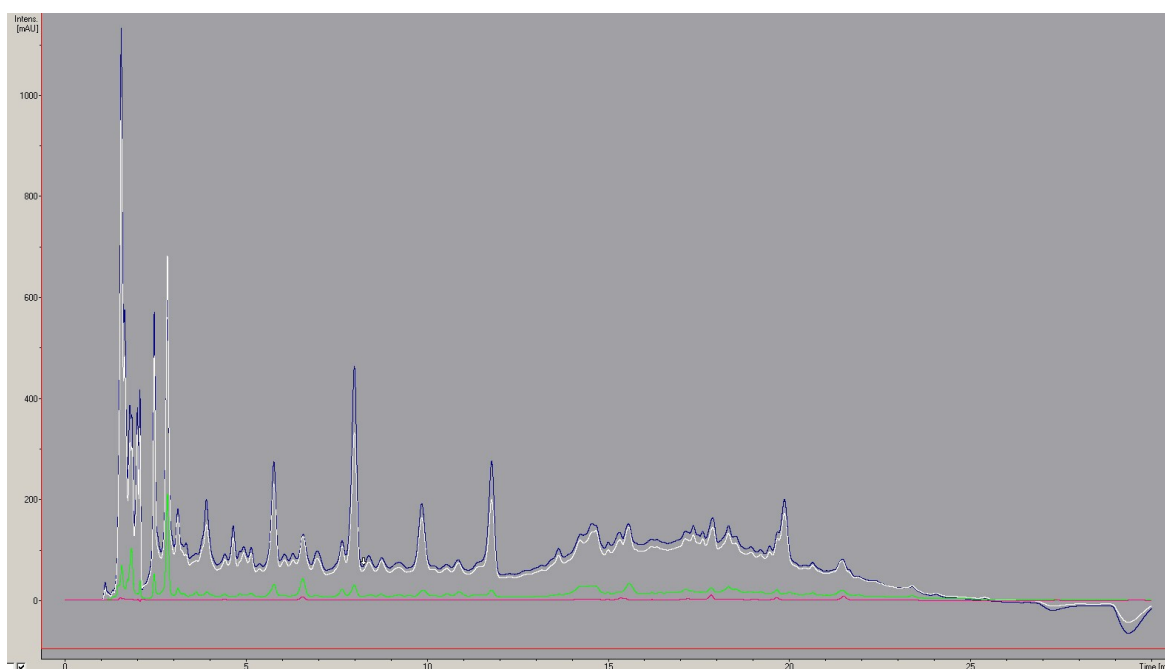
Tab.63. Hodnoty pro katechin vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování

Obsah katechinu ve víně Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování je **0,32 \pm 0,004 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$** .

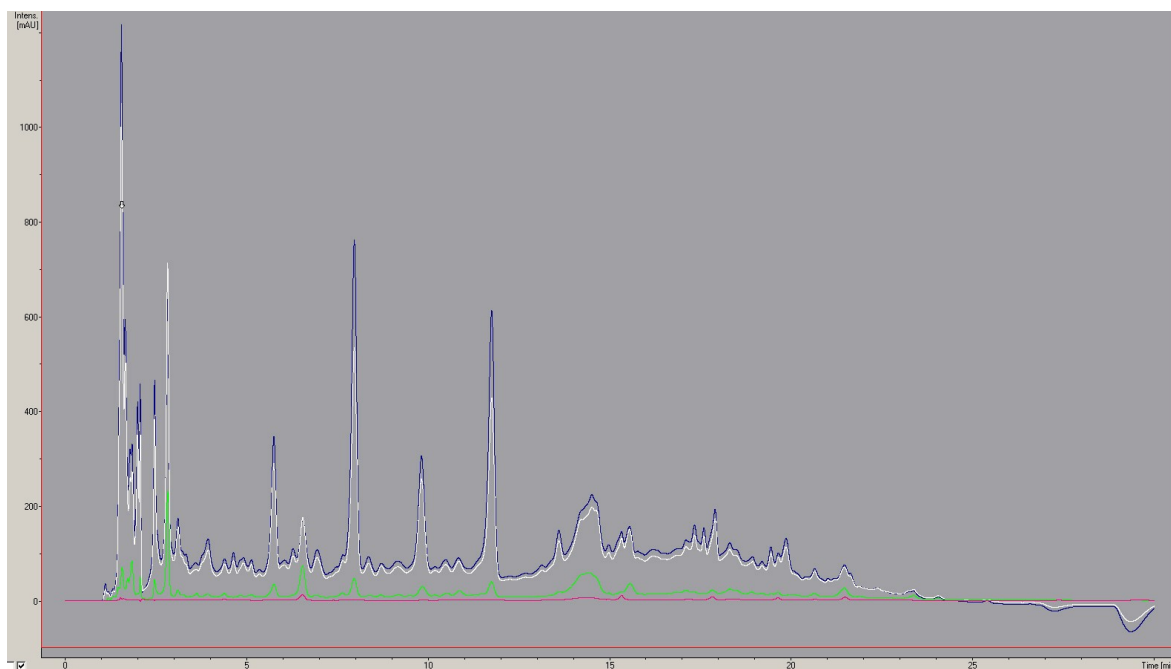
5.5 Stanovení antioxidantů ve víně po 10 dnech skladování metodou HPLC - UV



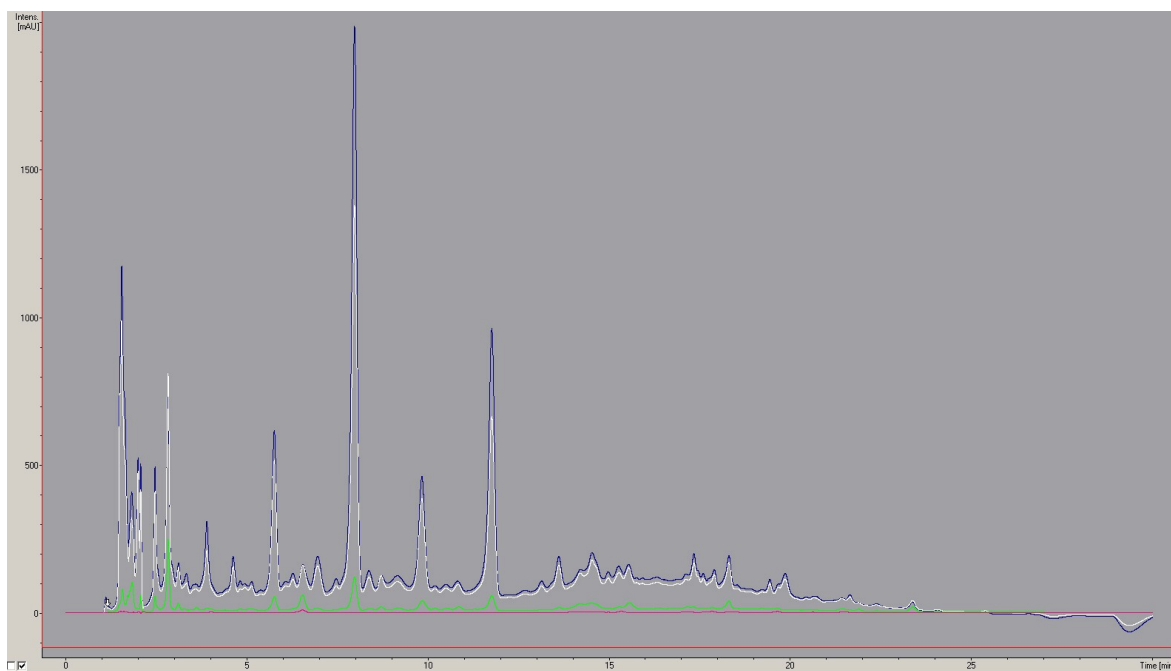
Obr.20. Chromatogram vzorku vína Cabernet Sauvignon. Píky: 1. Kyselina gallová (2.min), 2. Katechin (7,5.min), 3. Cis-piceid (11,5.min)



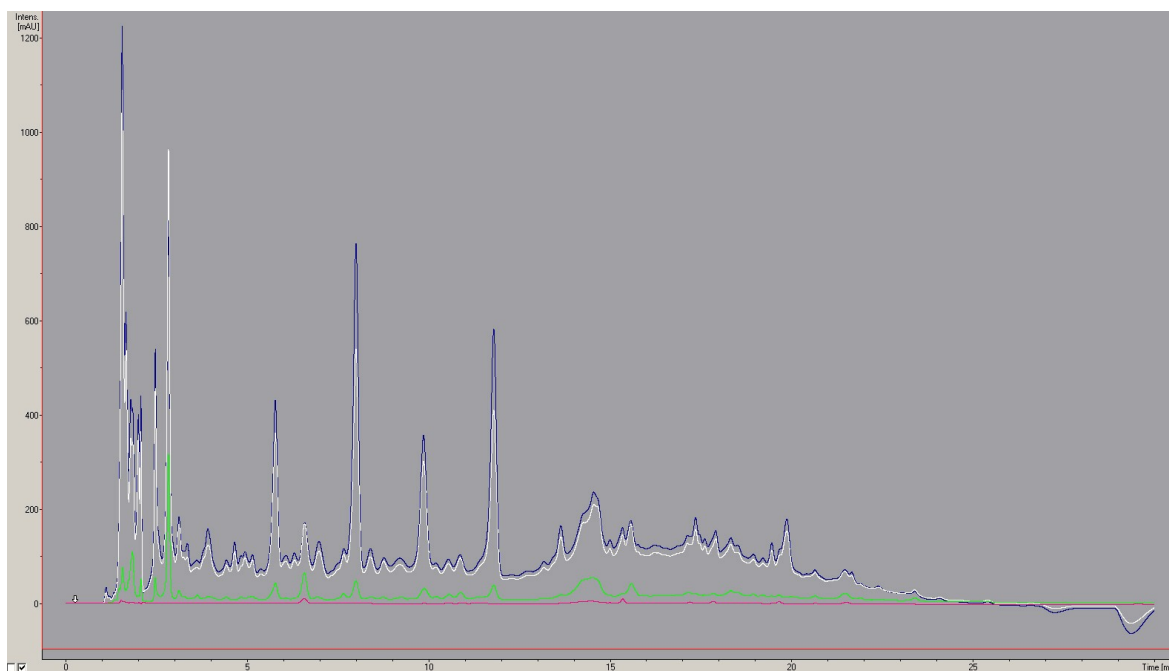
Obr.21. Chromatogram vzorku vína Frankovka. Píky: 1. Kyselina gallová (1,75.min), 2. Katechin (8.min), 3. Cis-piceid (11,5.min)



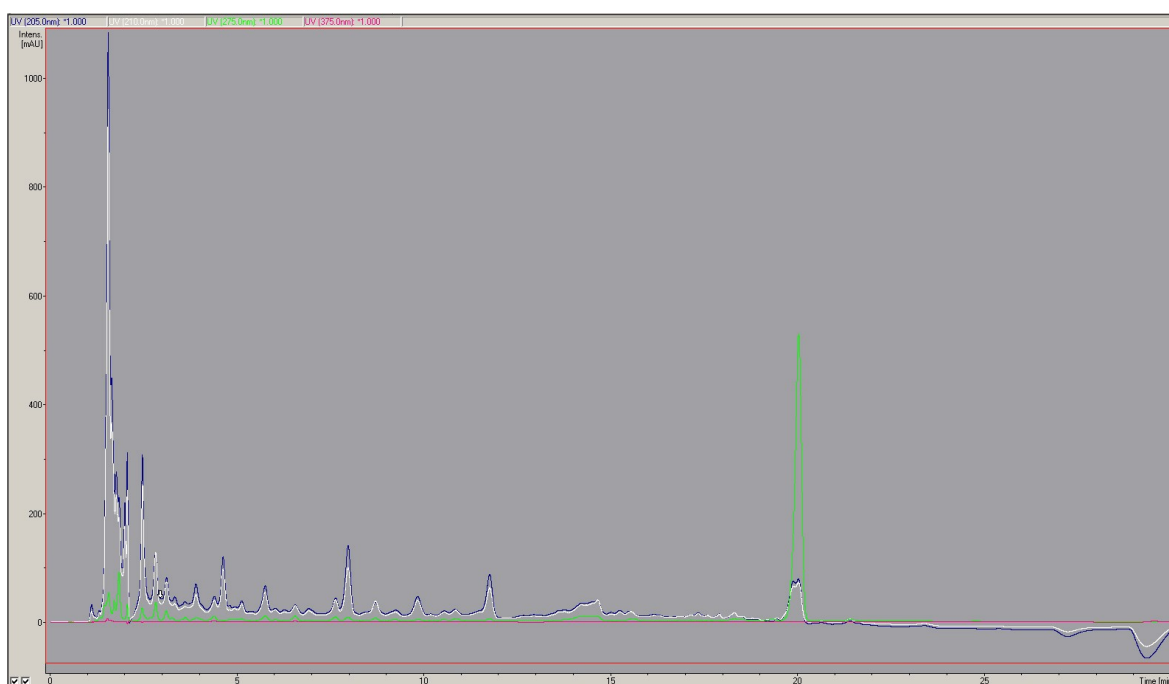
Obr.22. Chromatogram vzorku vína Modrý Portugal. Píky: 1. Kyselina gallová (2.min), 2. Katechin (7,5.min), 3. Cis-piceid (11,5.min), 4. Epikatechin (14,5.min)



Obr.23. Chromatogram vzorku vína Rulandské modré. Píky: 1. Kyselina gallová (1,5.min), 2. Katechin (8.min), 3. Cis-piceid (11,5.min), 4. Epikatechin (14,5.min)



Obr.24. Chromatogram vzorku vína Svatovavřinecké. Píky: 1. Kyselina gallová (1,5.min), 2. Katechin (8.min), 3. Cis-piceid (11,5.min), 4. Epikatechin (14,5.min)



Obr.25. Chromatogram vzorku vína Zweigeltrebe rosé. Píky: 1. Kyselina gallová (1,5.min), 2. Katechin (8.min), 3. Cis-piceid (11,5.min), 4. Epikatechin (14,5.min)

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovení antioxidantů ve víně. Obsah antioxidantů byl testovaný ihned po otevření láhve a po 10 dnech uchovávání této již otevřené láhve v lednici.

Pro stanovení antioxidantů ve víně byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC – ECD a HPLC - UV.

Pro stanovení pomocí HPLC – ECD byla použita kolona ACCLAIM C18, 5 μm (2,1 mm x 150mm). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril: kyselina trifluoroctová ($\text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_3\text{N} : \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$) v poměru 95: 49,65: 0,35. Teplota použitá pro měření byla 30°C a nastavený průtok mobilní fáze byl 0,7 ml.min⁻¹. Detekce antioxidantů byla provedena pomocí potenciálů na dvou kanálech $K_1=700$ mV a $K_2=800$ mV a guard cela byla nastavená na 900 mV. Měření bylo vyhodnoceno pomocí chromatografického programu Clarity. Na měření kalibračních křivek byly použity standardy antioxidantů: katechin, epikatechin, epigallokatechin, monohydrát kyseliny gallové (Labicom s.r.o., Olomouc). Uvedená metodika byla aplikována na vybraných 6 vzorků vína: Modrý Portugal, Frankovka, Svatovavřínecké, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe rosé (Templářské sklepy, Čejkovice).

Ve víně Modrý Portugal byly zjištěny ihned po otevření láhve následující hodnoty antioxidantů: kyselina gallová $2,14 \pm 0,16$ mg.100g⁻¹, epigallokatechin $3,91 \pm 0,18$ mg.100g⁻¹, epikatechin $3,76 \pm 0,31$ mg.100g⁻¹ a katechin $0,59 \pm 0,07$ mg.100g⁻¹. Po 10 denním skladování láhve v lednici byly naměřeny tyto hodnoty: kyselina gallová $0,077 \pm 0,01$ mg.100g⁻¹, epigallokatechin $0,22 \pm 0,01$ mg.100g⁻¹, epikatechin $0,21 \pm 0,01$ mg.100g⁻¹ a obsah katechinu byl nulový.

Ve víně Frankovka byly naměřeny ihned po otevření láhve následující hodnoty antioxidantů: kyselina gallová $1,56 \pm 0,11$ mg.100g⁻¹, epigallokatechin $2,41 \pm 0,05$ mg.100g⁻¹, epikatechin $1,61 \pm 0,02$ mg.100g⁻¹ a katechin $0,51 \pm 0,03$ mg.100g⁻¹. Po 10 denním skladování láhve v lednici byly naměřeny tyto hodnoty: kyselina gallová $0,11 \pm 0,02$ mg.100g⁻¹, epigallokatechin $0,082 \pm 0,01$ mg.100g⁻¹, epikatechin $0,037 \pm 0,02$ mg.100g⁻¹ a katechin $0,30 \pm 0,02$ mg.100g⁻¹.

Ve víně Svatovavřínecké byly naměřeny ihned po otevření láhve tyto hodnoty antioxidantů: kyselina gallová $2,70 \pm 0,20$ mg.100g⁻¹, epigallokatechin $4,06 \pm 0,04$

mg.100g⁻¹, epikatechin 1,85 ± 0,38 mg.100g⁻¹ a katechin 0,84 ± 0,11 mg.100g⁻¹. Po 10 denním skladování láhve v lednici byly naměřeny tyto hodnoty: kyselina gallová 0,077 ± 0,01 mg.100g⁻¹, epigallokatechin 0,14 ± 0,01 mg.100g⁻¹, epikatechin 0,20 ± 0,01 mg.100g⁻¹ a katechin 0,37 ± 0,02 mg.100g⁻¹.

Ve víně Cabernet Sauvignon byly naměřeny ihned po otevření láhve tyto hodnoty antioxidantů: 0,82 ± 0,03 mg.100g⁻¹, epigallokatechin 0,50 ± 0,02 mg.100g⁻¹, epikatechin 0,62 ± 0,10 mg.100g⁻¹ a katechin 1,94 ± 0,03 mg.100g⁻¹. Po 10 denním skladování láhve v lednici byly naměřeny tyto hodnoty: kyselina gallová 0,049 ± 0,01 mg.100g⁻¹ a epikatechin 0,12 ± 0,01 mg.100g⁻¹. Obsah epigallokatechinu a katechinu nelze určit z důvodu překrývajících se píků.

Ve víně Rulandské modré byly naměřeny ihned po otevření láhve tyto hodnoty antioxidantů: kyselina gallová 1,61 ± 0,02 mg.100g⁻¹, epigallokatechin 1,89 ± 0,12 mg.100g⁻¹, epikatechin 2,89 ± 0,03 mg.100g⁻¹ a katechin 12,07 ± 0,23 mg.100g⁻¹. Po 10 denním skladování láhve v lednici byly naměřeny hodnoty: kyselina gallová 0,089 ± 0,01 mg.100g⁻¹, epigallokatechin 0,20 ± 0,02 mg.100g⁻¹, epikatechin 0,23 ± 0,002 mg.100g⁻¹ a katechin 0,70 ± 0,05 mg.100g⁻¹.

Ve víně Zweigeltrebe rosé byly naměřeny po otevření láhve tyto hodnoty antioxidantů: kyselina gallová 1,03 ± 0,01 mg.100g⁻¹, epikatechin 0,94 ± 0,02 mg.100g⁻¹. V retenčních časech pro epigallokatechin a katechin nebyl zobrazen žádný pík. Po 10 denním skladování láhve v lednici byly naměřeny hodnoty: kyselina gallová 0,028 ± 0,003 mg.100g⁻¹, epigallokatechin 0,045 ± 0,005 mg.100g⁻¹, epikatechin 0,086 ± 0,001 mg.100g⁻¹ a katechin 0,32 ± 0,004 mg.100g⁻¹.

Z výsledků analýzy vyplývá, že po 10 denním skladování již otevřených lahví v lednici dochází k výraznému snížení obsahu antioxidantů z důvodu vystavení vzorků vín účinkům kyslíku.

Pro stanovení pomocí HPLC – UV byla použita kolona ASCENTIS TM C18 (15 μm, 15 x 4,6 mm). Jako mobilní fáze A byla použita směs voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová (H₂O : C₂H₃N: C₂HF₃O₂) v poměru 95: 49,65: 0,35 a jako mobilní fáze B byla použita směs voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová (H₂O : C₂H₃N: C₂HF₃O₂) v poměru 50: 49,75: 0,25. Teplota použitá pro měření byla 30°C a nastavený průtok mobilní fáze byl 1,0 ml.min⁻¹. Pro detekci antioxidantů byly použity tyto vlnové délky: 205, 210, 275 a 375 nm.

Modrý Portugal, Frankovka, Svatovavřínecké, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe rosé

Ze získaných chromatogramů vzorků vín metodou HPLC – UV byly určeny podle retenčních časů antioxidanty. Ve víně Modrý Portugal: kyselina gallová, katechin, cis-piceid a epikatechin, ve víně Cabernet Sauvignon: kyselina gallová, katechin a cis-piceid, ve víně Svatovavřínecké: kyselina gallová, katechin, cis-piceid a epikatechin, ve víně Rulandské modré: kyselina gallová, katechin, cis-piceid a epikatechin, ve víně Modrý Portugal: kyselina gallová, katechin, cis-piceid a epikatechin, ve víně Frankovka: kyselina gallová, katechin a cis-piceid ve víně Zweigeltrebe rosé: kyselina gallová, katechin, cis-piceid a epikatechin.

Ze získaných chromatogramů je zřejmé, že nejvhodnější vlnová délka pro stanovení antioxidantů ve víně pomocí této metody byla 205 a 210 nm.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Sies, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, p.291-295, 1997.
- [2] YOUNGSON, R. *Antioxidanty cesta ke zdraví*. 1 vyd. Brno: nakladatelství Jota, 1995. 143 s. ISBN 80-85617-56-0
- [3] JORDÁN, V., HEMZALOVÁ, M. *Antioxidanty zázračné zbraně*. 1 vyd. Brno: nakladatelství Jota, 2001. 153 s. ISBN 80-7217-156-9
- [4] ŠÍPEK, S. a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1 vyd. Praha 7: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4
- [5] Dostupné na: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2009/01/06.pdf>
- [6] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2 vyd. Praha 2: Academia, 2002. 191 s. ISBN 80-200-0600-1
- [7] Dostupné na: http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/FTK.../Antioxidanty.ppt
- [8] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie II*. 1. vyd. Zlín: UTB, 2006. ISBN 80-7318-395-1.
- [9] Dostupné na: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=147&ch=13&typ=1&val=88040>
- [10] Xianquan, S. et al. Stability of Lycopene During Food Processing and Storage, p.413-422, 2005.
- [11] Amaya, R. Food carotenoids: analysis, composition and alterations during storage and processing of foods, p.35-37, 2003.
- [12] Rietveld, A. et al. Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials, p.3285-3292, 2003.
- [13] Baublis, A. J. PhD et al. Potential of Wheat-Based Breakfast Cereals as a Source of Dietary Antioxidants, p.308-311, 2000.
- [14] Henry, C. J. K. et al. Nutritional losses and gains during processing: future problems and issues, p. 145-148, 2002.
- [15] ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*. 1 vyd. Brno: Mikadapress s.r.o., 2006. 164 s. ISBN 80-7013-435-6.
- [16] Bjelakovic, G. et al. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention, p.842-857, 2007.

- [17] KUTTELVAŠER, Z. *Abeceda vína*. 1 vyd. Praha 3: Radix, 2003. 280 s. ISBN 80-86031-43-8
- [18] IRWIN, J. *Výroba domácích vín*. 1 vyd. Praha 4: agentura Cesty, 1994. ISBN 80-7181-017-7
- [19] KRAUS, V. *Nová encyklopedie vína*. 2 vyd. Praha 1: Praga Mystica, 2008. ISBN 978-80-86767-09-3
- [20] LÁNSKÁ, D. *Víno, hrozny, rozinky*. 1 vyd. Praha: nakladatelství Práce, 1990. 29 s. ISBN 80-208-0067-0
- [21] Dostupné na: <http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb04321&cd=76&typ=r>
- [22] ROP, O., HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1 vyd. Zlín: UTB, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [23] ŠVEJCAR, V., MINÁRIK, E. *Vinařství Biochemie vína*. 1 vyd. Brno: Vysoká škola zemědělská, 1976. 77 s.
- [24] SCHWEIZER, U. *Jak poznat dobré víno*. 1 vyd. Filip Trend Publishing, 2002. 79 s. ISBN 80-86282-24-4
- [25] ŠEVČÍK, L. *Červená vína*. 1 vyd. Praha 7: Grada publishing, 1999. 144 s. ISBN 80-7169-840-7
- [26] NOVÁK, V., BUŇKA, F. *Základy ekonomiky výživy*. 1 vyd. Zlín: UTB, 2005. 119 s. ISBN 80-7318-262-9
- [27] Dostupné na:
<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=147&ch=13&typ=1&val=84756>
- [28] MUSIL, S., MENŠÍK, J. *Vinařství*. 3 vyd. Praha: SZN, 1970. 439 s.
- [29] KOHOUT, F. *O víně*. 2 vyd. Praha: Merkur, 1986. 265 s.
- [30] VOGEL, W. *Vyrábíme domácí vína z hroznů, ovoce, šumivá*. 1.vyd. Praha 1: nakladatelství a vydavatelství Ivo Železný, 2002. ISBN 80-237-3662-0
- [31] PAVLOUŠEK, P. *Pěstujeme stolní odrůdy révy vinné*. 1 vyd. Praha: GRADA, 2009. ISBN 978-80-247-2787-5
- [32] Dostupné na:
<http://www.enolog.cz/.../odrudove-aroma-utopie-nebo-hyckana-vlastnost-vina-0fa1d.doc>
- [33] Dostupné na: http://ach.upol.cz/ulohy/fenolicke_kyseliny.pdf

- [34] Dostupné na: <http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>
- [35] Dostupné na: http://en.wikipedia.org/wiki/Phenolic_compounds_in_wine
- [36] Dostupné na: http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_27C.doc
- [37] Majo, D. D. et al. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents, p.45-49, 2008.
- [38] Sakkiadi, A. V. et al. Direct HPLC Assay of Five Biologically Interesting Phenolic Antioxidants in Varietal Greek Red Wines, p.410-413, 2001.
- [39] Dias, F. et al. Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence, p.4, 2010.
- [40] Fang, F. et al. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging, p.428-433, 2007.
- [41] Delgado, M. A. R. et al. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines, p.523-532, 2002.
- [42] Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A. et al. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay, p.1018-1022, 2009.
- [43] Proestos, CH. et al. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines, p.319-323, 2005.
- [44] Kallithraka, S. et al. The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines, p.355-363, 2001.
- [45] Souto, A. A. et al. Determination of trans-Resveratrol Concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC, p.441-445, 2001.
- [46] Nikfardjam, M. S. et al. Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from botrytized grapes, p.74-79, 2006.
- [47] Vian, M. A. et al. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns, p.224-229, 2005.
- [48] Gurbuz, O. et al. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection, p.518-525, 2007.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
UCL	University College London
°NM	Stupně normalizovaného moštoměru
WHO	Světová zdravotnická organizace
CP	Celkové fenolické látky
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HP	Hewlett-Packard
THF	Tetrahydrogenfuran
DAD	Diode Array Detector, detektor diodového pole
ECD	Elektrochemical detection, elektrochemická detekce
UV-VIS	Ultraviolet-Visible, ultrafialová a viditelná oblast světla
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Bobule révy vinné.....	24
Obr. 2. Strukturní vzorec geraniolu	33
Obr. 3. Strukturní vzorec trans-resveratrolu	36
Obr.4. Strukturní vzorec kvercetinu	37
Obr.5. Strukturní vzorec (+) – katechinu.....	38
Obr.6. Strukturní vzorec (-) – epikatechinu.....	38
Obr. 7. Chromatogram zobrazující píky 5 fenolických látek.	52
Obr. 8. Chromatogram brazilského vína Cabernet Sauvignon.	54
Obr. 9. Flavony a flavonoly ve víně.	56
Obr.10. Chromatogram červeného vína za použití absorpčního detektoru.	58
Obr. 11. Chromatogram červeného vína.....	62
Obr. 12. Chromatogram vzorku vína	65
Obr. 13. HPLC chromatogram standardů resveratrolu.	66
Obr.14. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení epigallokatechinu.....	77
Obr.15. Záznam signálů pro sestavení kalibrační křivky katechinu	78
Obr.16. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení katechinu	79
Obr.17. Záznam signálů pro sestavení kalibrační křivky kyseliny gallové	80
Obr.18. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení kyseliny gallové.....	80
Obr.19. Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro stanovení epikatechinu.....	81
Obr.20. Chromatogram vzorku vína Cabernet Sauvignon.	103
Obr.21. Chromatogram vzorku vína Frankovka.	103
Obr.22. Chromatogram vzorku vína Modrý Portugal.	104
Obr.23. Chromatogram vzorku vína Rulandské modré.....	104
Obr.24. Chromatogram vzorku vína Svatovavřínecké.	105
Obr.25. Chromatogram vzorku vína Zweigeltrebe rosé.	105

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku	15
Tab. 2. Antioxidanty a jejich výskyt v potravinách	18
Tab. 3. Složení vína a moštu	26
Tab. 4. Obsah minerálních látek ve 100 gramech hroznů	32
Tab. 5. Obsah vitaminů ve 100 gramech hroznů	34
Tab. 6. Souhrn podmínek pro stanovení antioxidantů ve víně	48
Tab. 7. Podmínky pro gradientovou eluci pro stanovení antioxidantů	50
Tab. 8. Podmínky pro mobilní fázi pro stanovení antioxidantů	51
Tab. 9. Podmínky pro mobilní fázi B (voda:kyselina octová:metanol).....	53
Tab. 10. Podmínky pro mobilní fázi pro stanovení flavonoidů	55
Tab. 11. Podmínky pro mobilní fázi A pro stanovení fenolických látek.....	58
Tab. 12. Podmínky pro mobilní fáze pro stanovení fenolických látek	60
Tab. 13. Podmínky pro použití mobilních fází pro stanovení fenolických látek.....	62
Tab.14. Podmínky pro mobilní fázi A pro stanovení trans-resveratrolu	64
Tab.15. Podmínky pro mobilní fáze A a B pro stanovení derivátu resveratrolu	68
Tab.16. Mobilní fáze a rychlost průtoku pro stanovení izomerů resveratrolu.....	70
Tab.17. Hodnoty ploch píků pro kalibraci epigallokatechinu	77
Tab.18. Hodnoty ploch píků pro kalibraci katechinu	78
Tab.19. Hodnoty ploch píků pro kalibraci kyseliny gallové.....	79
Tab.20. Hodnoty ploch píků pro kalibraci epikatechinu	81
Tab.21. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Cabernet Sauvignon.....	82
Tab.22. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Cabernet Sauvignon	83
Tab.23. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Cabernet Sauvignon	83
Tab.24. Hodnoty pro katechin ve vzorku Cabernet Sauvignon	83
Tab.25. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování.....	84
Tab.26. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Cabernet Sauvignon po 10 dnech skladování.....	84
Tab.27. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Modrý Portugal	85
Tab.28. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Modrý Portugal	85
Tab.29. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Modrý Portugal	86
Tab.30. Hodnoty pro katechin ve vzorku Modrý Portugal	86

Tab.31. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Modrý Portugal po 10 dnech skladování.....	87
Tab.32. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Modrý Portugal po 10 dnech skladování.....	87
Tab.33. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Modrý Portugal po 10 dnech skladování	88
Tab.34. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Svatovavřínecké.....	88
Tab.35. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Svatovavřínecké.....	89
Tab.36. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Svatovavřínecké.....	89
Tab.37. Hodnoty pro katechin ve vzorku Svatovavřínecké.....	90
Tab.38. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Svatovavřínecké po 10 dnech skladování.....	90
Tab.39. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Svatovavřínecké po 10 dnech skladování.....	91
Tab.40. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Svatovavřínecké po 10 dnech skladování	91
Tab.41. Hodnoty pro katechin ve vzorku Svatovavřínecké po 10 dnech skladování.....	92
Tab.42. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Frankovka	92
Tab.43. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Frankovka	93
Tab.44. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Frankovka	93
Tab.45. Hodnoty pro katechin ve vzorku Frankovka	94
Tab.46. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování ...	94
Tab.47. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování.....	95
Tab.48. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování.....	95
Tab.49. Hodnoty pro katechin ve vzorku Frankovka po 10 dnech skladování	96
Tab.50. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Rulandské modré	96
Tab.51. Hodnoty epigallokatechin ve vzorku Rulandské modré.....	97
Tab.52. Hodnoty epikatechin ve vzorku Rulandské modré.....	97
Tab.53. Hodnoty katechin ve vzorku Rulandské modré.....	97
Tab.54. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování.....	98
Tab.55. Hodnoty pro epigallokatechin ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování.....	98
Tab.56. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování.....	99

Tab.57. Hodnoty pro katechin ve vzorku Rulandské modré po 10 dnech skladování	99
Tab.58. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Zweigeltrebe rosé.....	100
Tab.59. Hodnoty pro epikatechin ve vzorku Zweigeltrebe rosé.....	100
Tab.60. Hodnoty pro kyselinu gallovou ve vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování.....	101
Tab.61. Hodnoty pro epigallokatechin vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování.....	101
Tab.62. Hodnoty pro epikatechin vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování.....	102
Tab.63. Hodnoty pro katechin vzorku Zweigeltrebe rosé po 10 dnech skladování.....	102

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Optimalizace podmínek stanovení antioxidantů

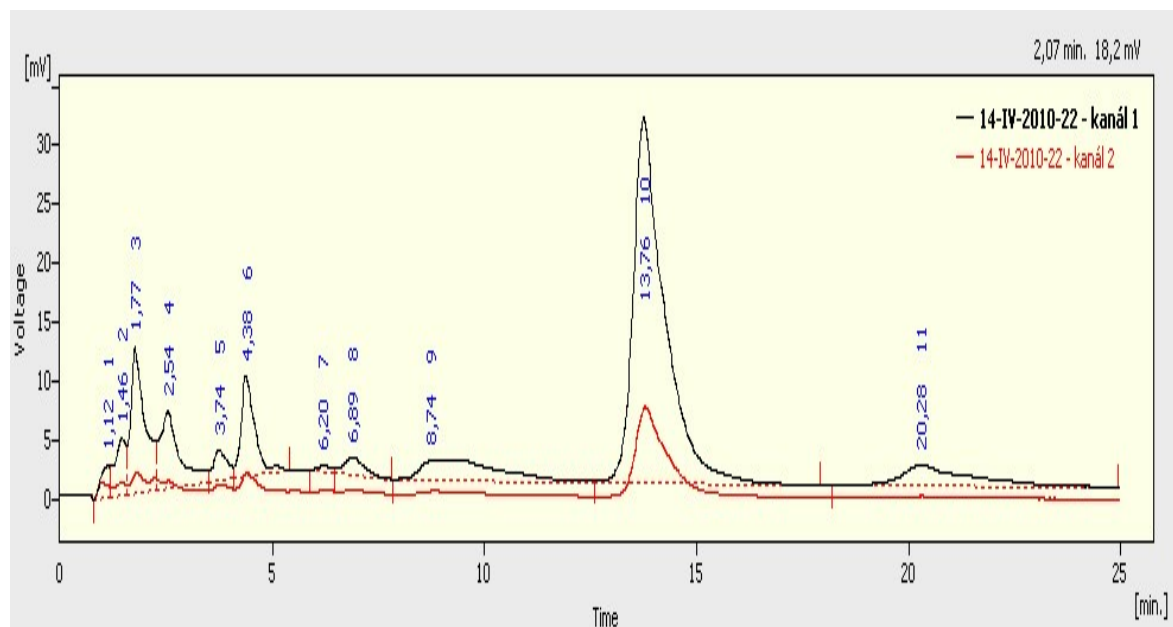
PŘÍLOHA P II: Kalibrace standardů

PŘÍLOHA P III: Stanovení antioxidantů ve víně ihned po otevření láhve

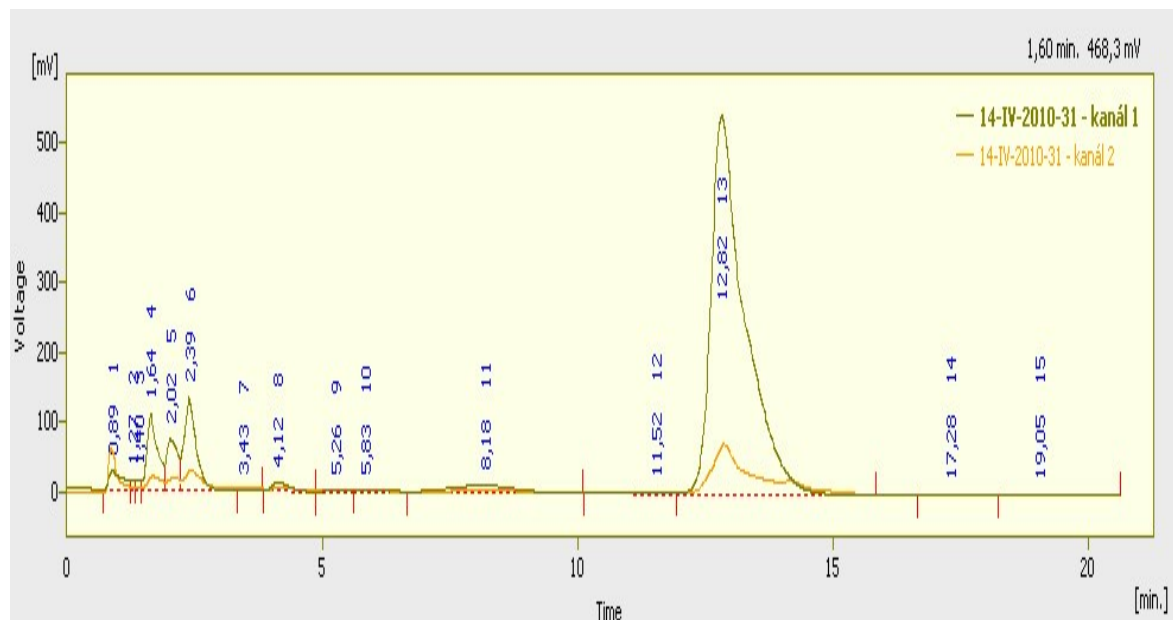
PŘÍLOHA P IV: Stanovení antioxidantů ve víně po 10 dnech skladování v lednici

PŘÍLOHA P I: OPTIMALIZACE PODMÍNEK STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ

Epigallokatechin:

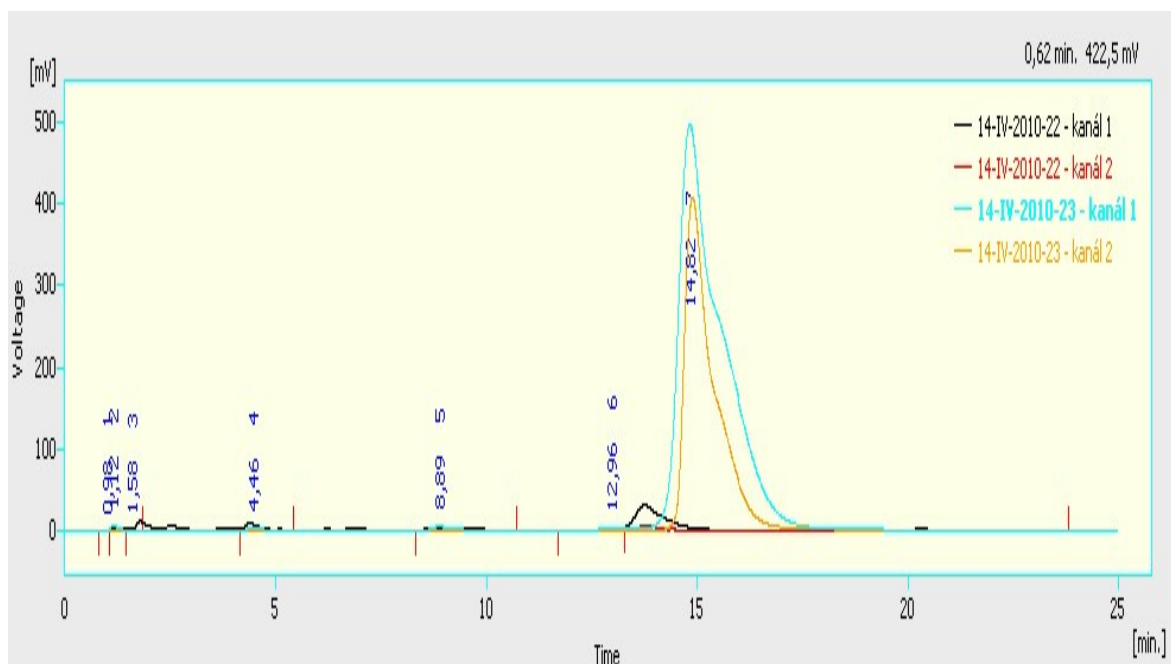


Obr.26. Stanovení epigallokatechinu při $K_1=400$ mV a $K_2=500$ mV

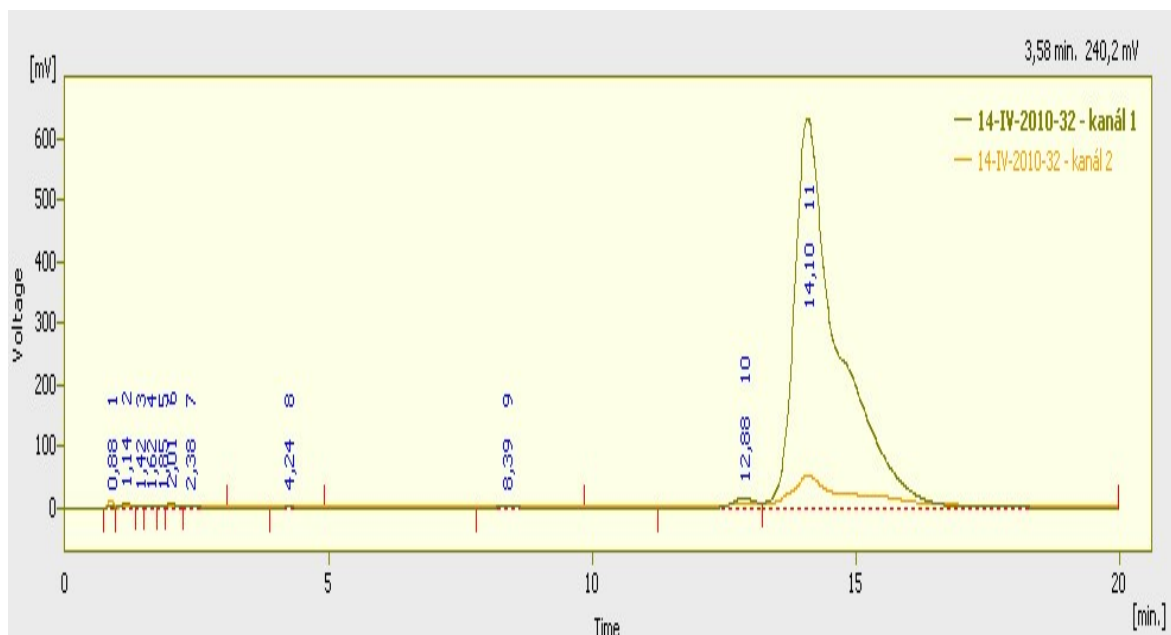


Obr.27. Stanovení epigallokatechinu při $K_1=700$ mV a $K_2=800$ mV

Katechin:

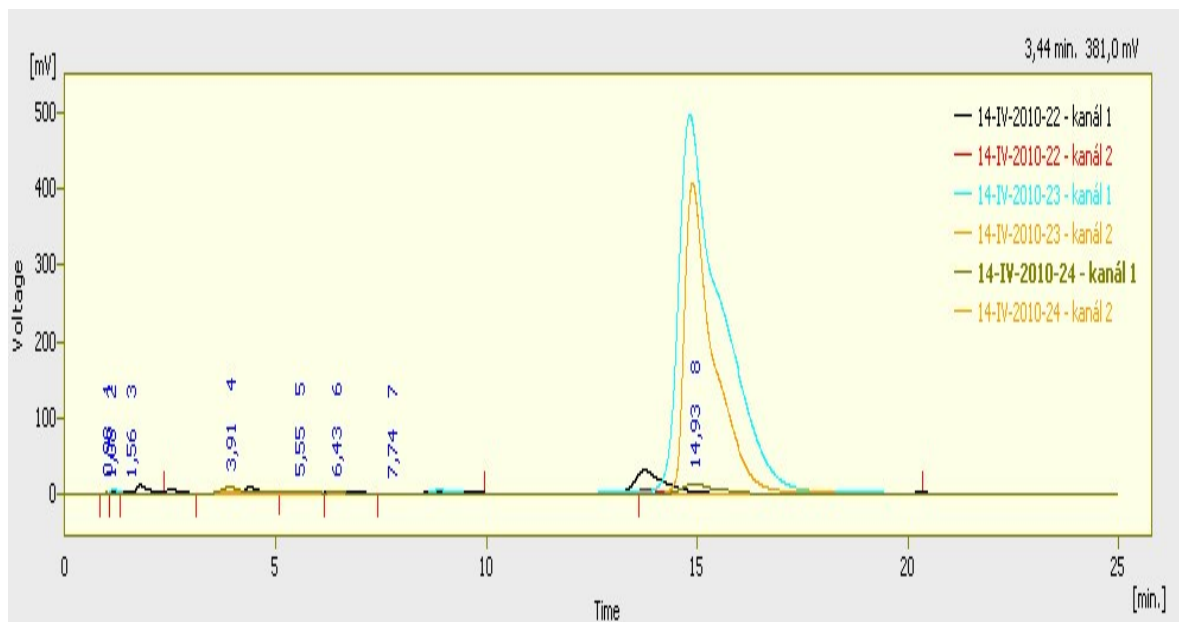


Obr.28. Stanovení katechinu při $K_1=400$ mV a $K_2=500$ mV

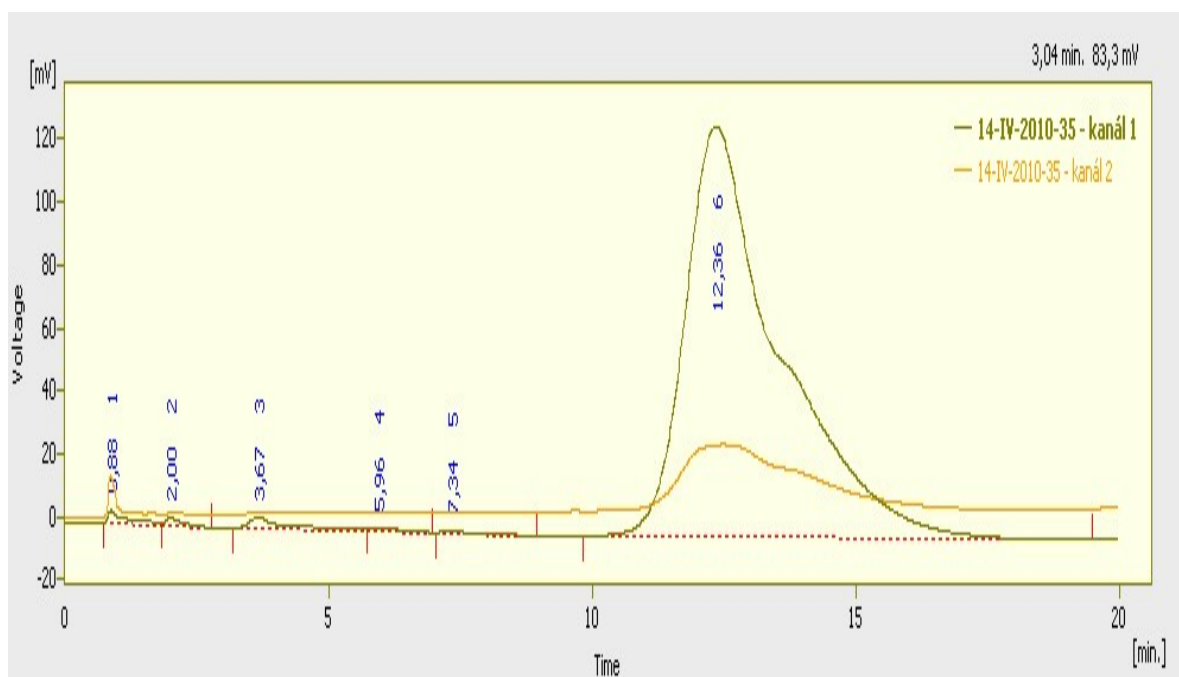


Obr.29. Stanovení katechinu při $K_1=700$ mV a $K_2=800$ mV

Epikatechin:

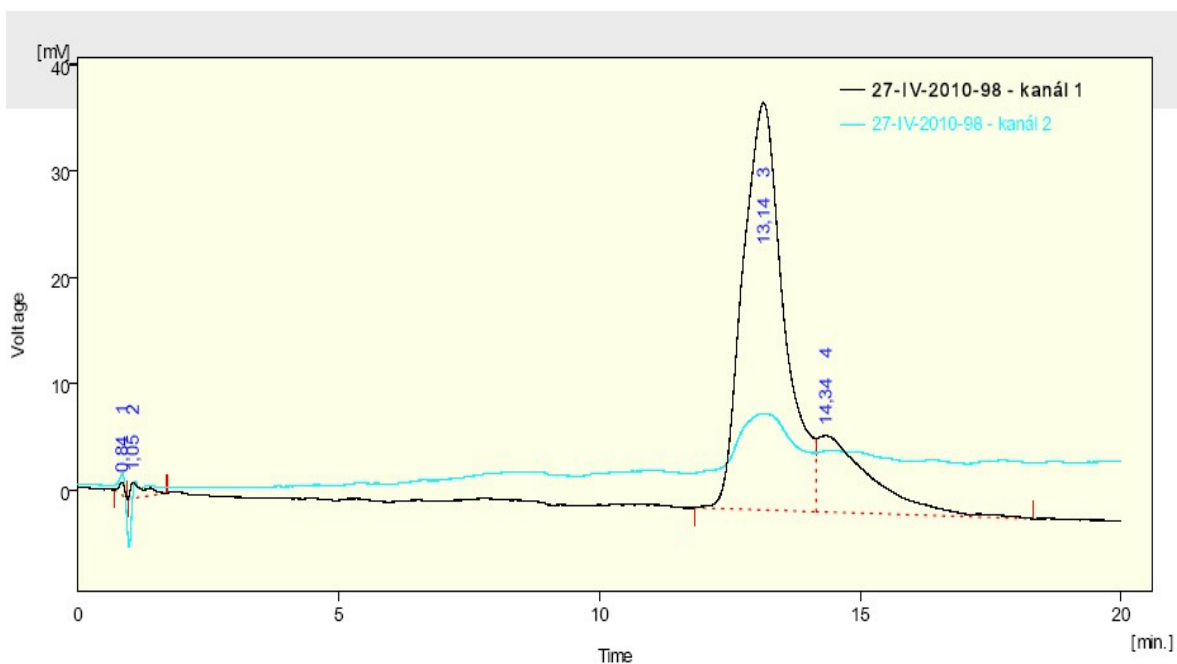


Obr.30. Stanovení epikatechinu při $K_1=400\text{ mV}$ a $K_2=500\text{ mV}$

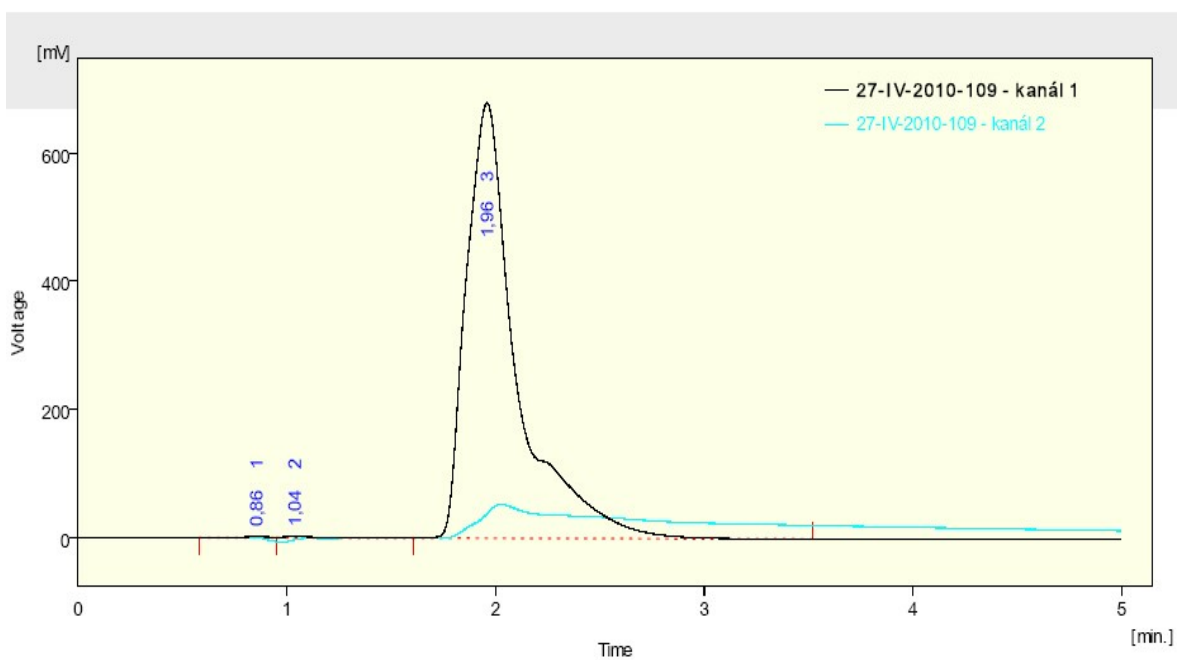


Obr.31. Stanovení epikatechinu při $K_1=700\text{ mV}$ a $K_2=800\text{ mV}$

PŘÍLOHA P II: KALIBRACE STANDARDŮ

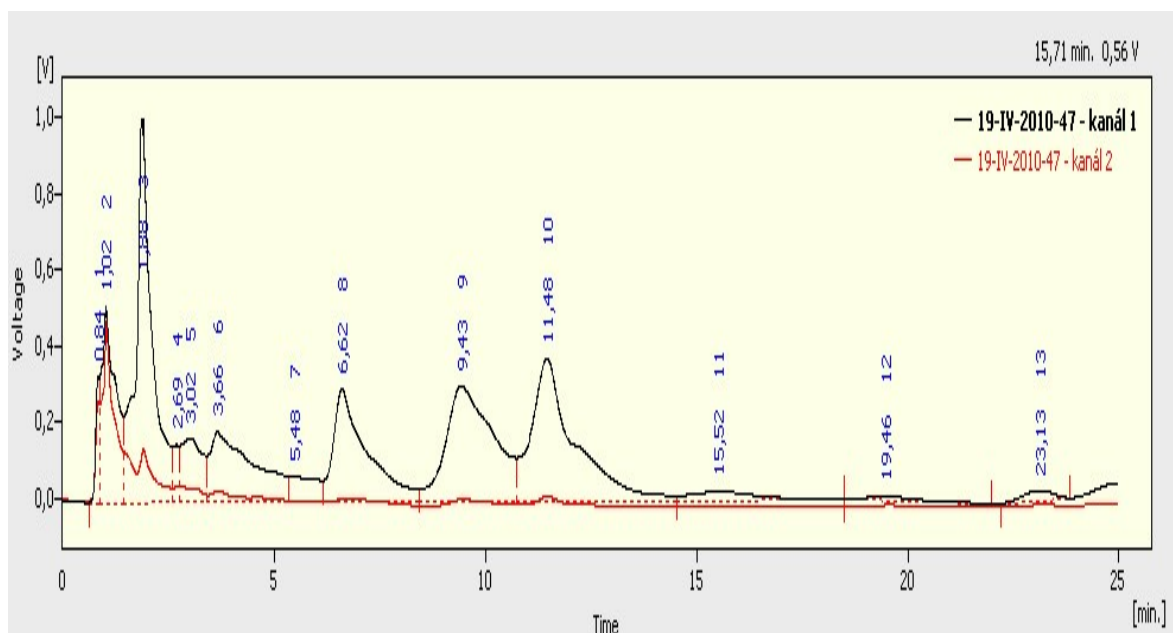


Obr.32. Stanovení katechinu o koncentraci $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ při $K_1=700 \text{ mV}$ a $K_2=800 \text{ mV}$

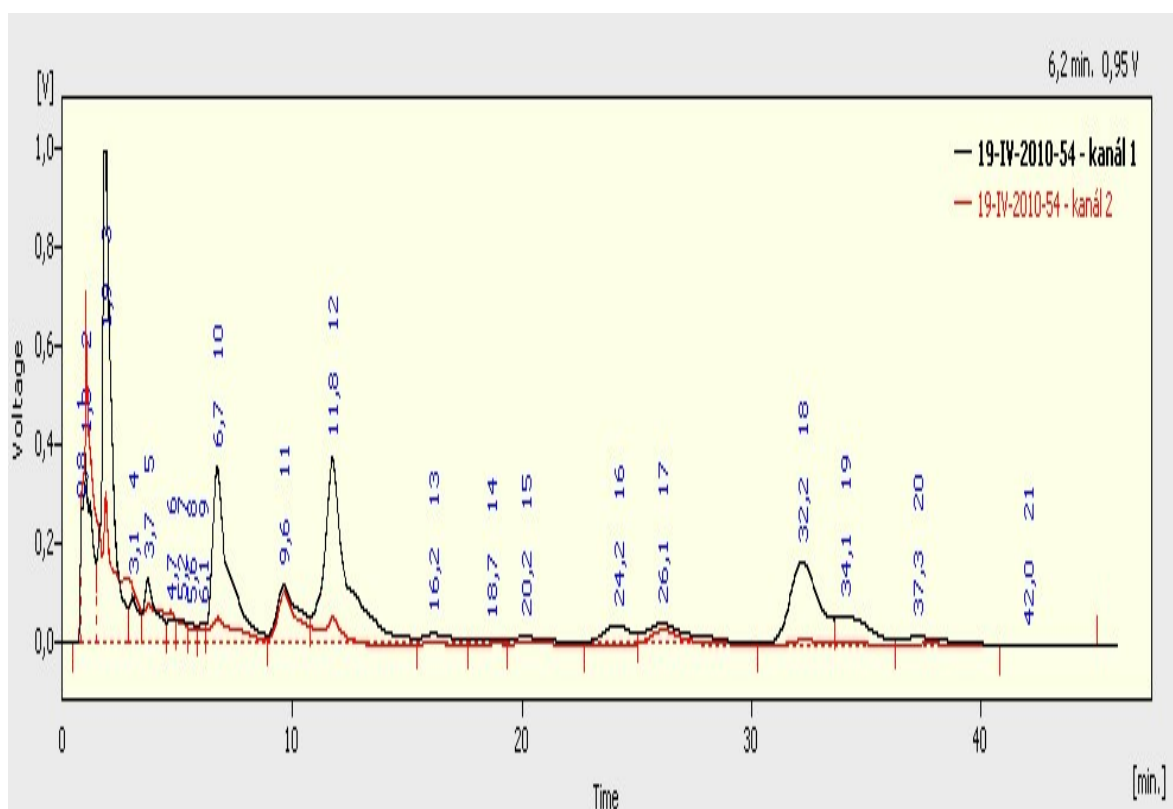


Obr.33. Stanovení kyseliny gallové o koncentraci $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ při $K_1=700 \text{ mV}$ a $K_2=800 \text{ mV}$

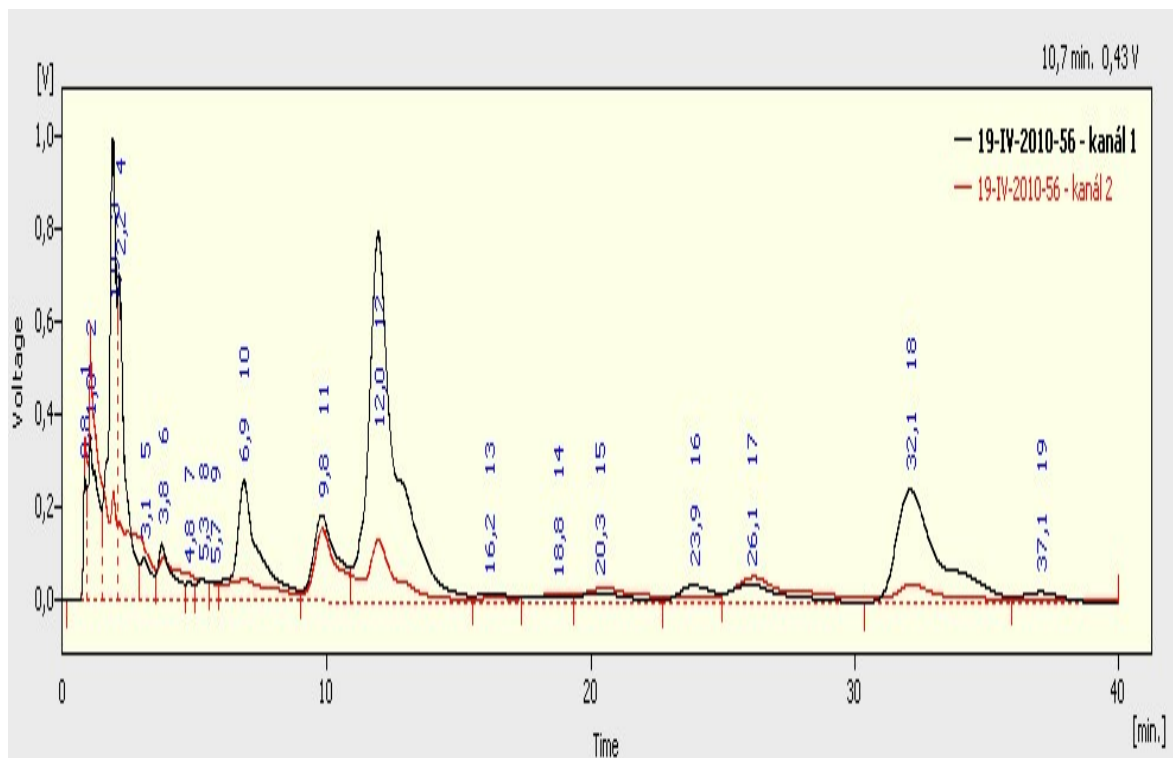
PŘÍLOHA P III: STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ VE VÍNĚ IHNED PO OTEVŘENÍ LÁHVE



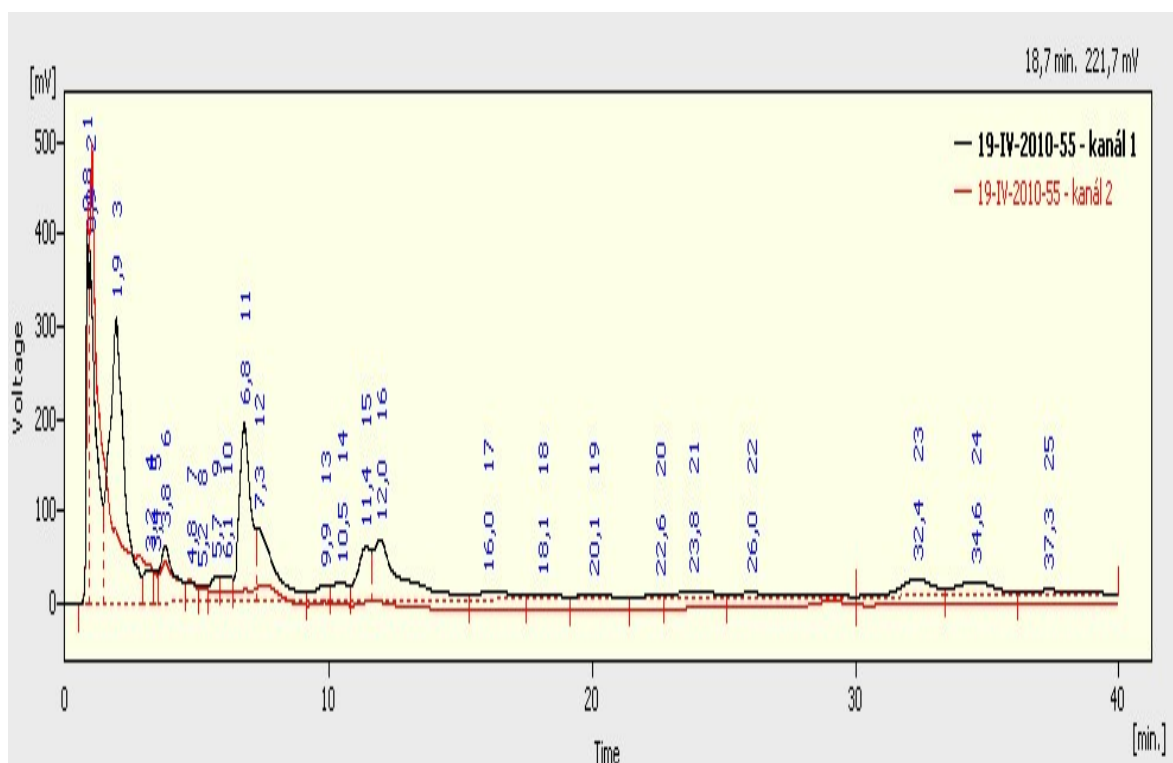
Obr.34. Stanovení antioxidantů ve víně Modrý Portugal



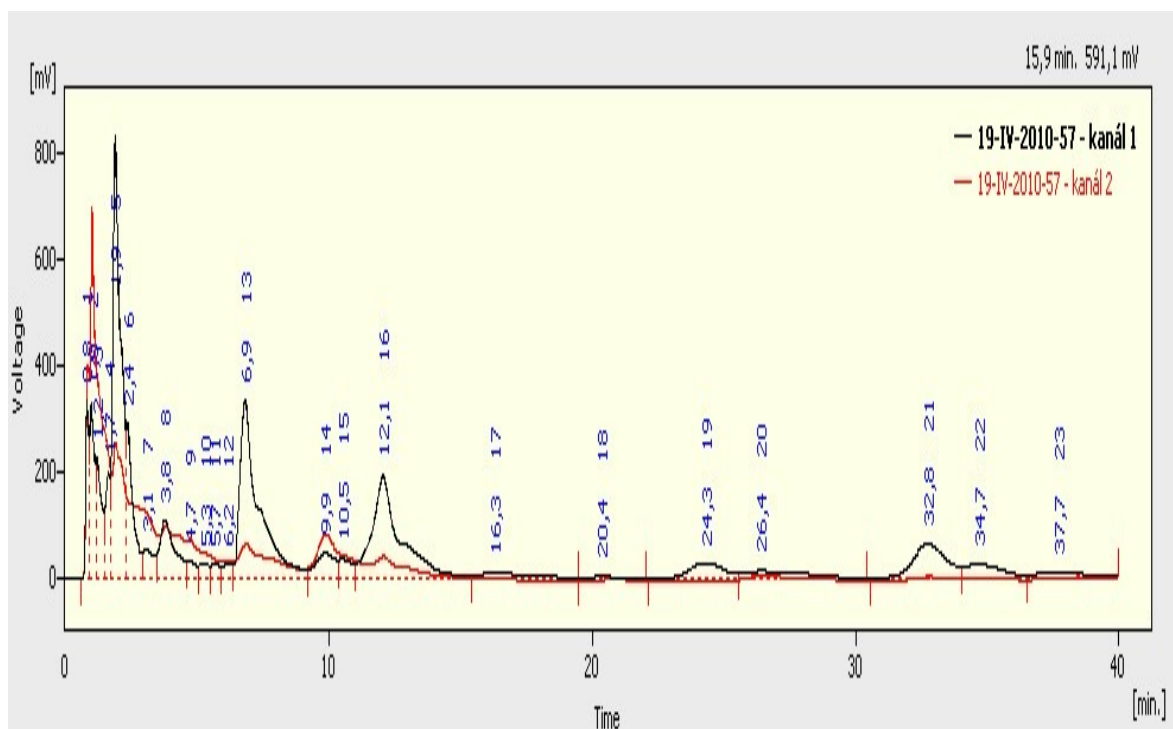
Obr.35. Stanovení antioxidantů ve víně Svatovavřínecké



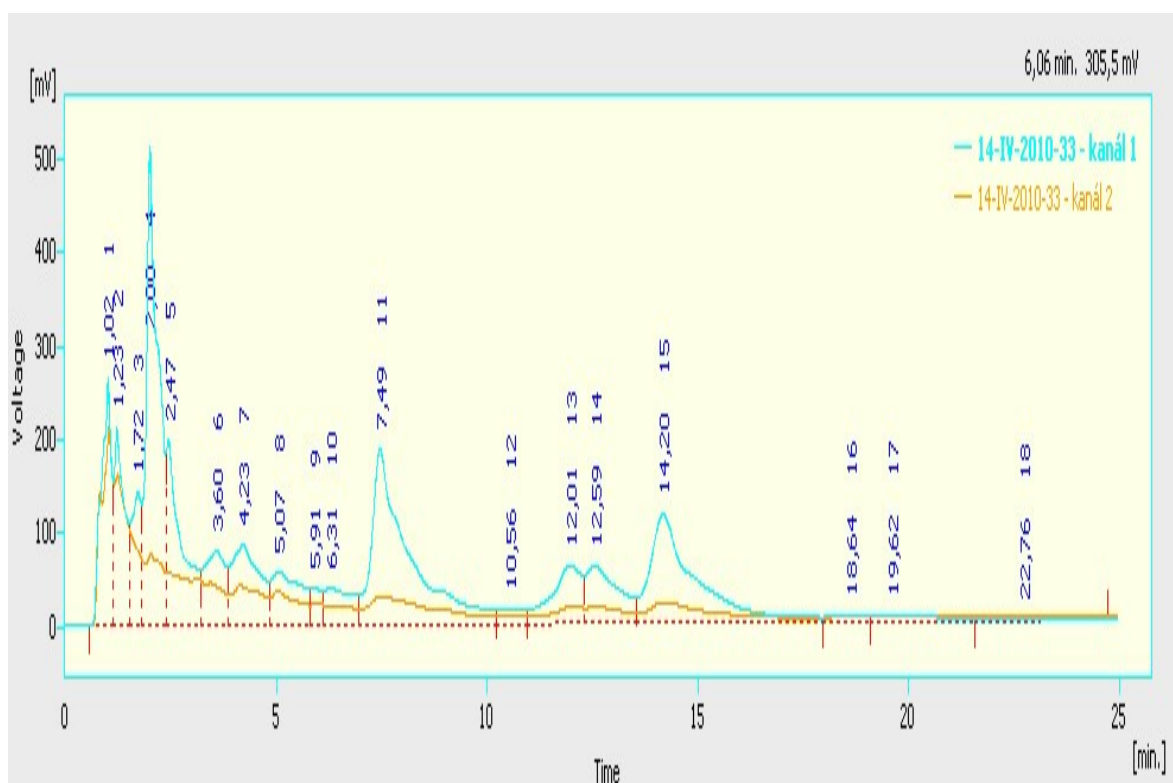
Obr.36. Stanovení antioxidantů ve víně Rulandské modré



Obr.37. Stanovení antioxidantů ve víně Zweigeltrebe rosé

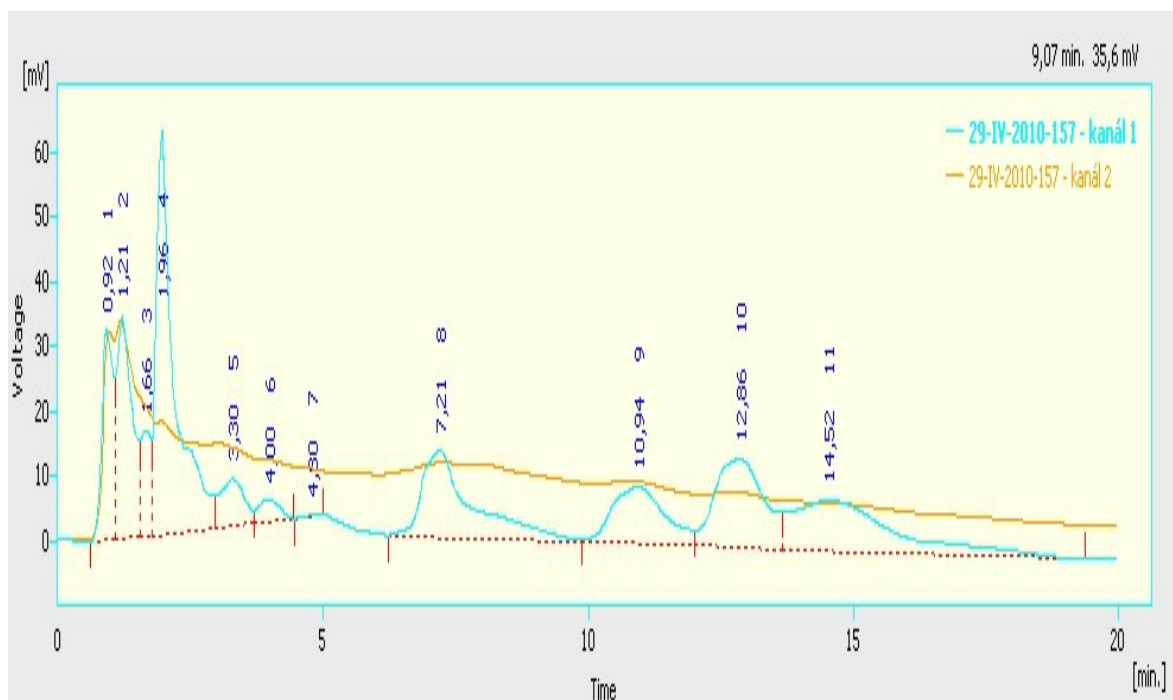


Obr.38. Stanovení antioxidantů ve víně Frankovka

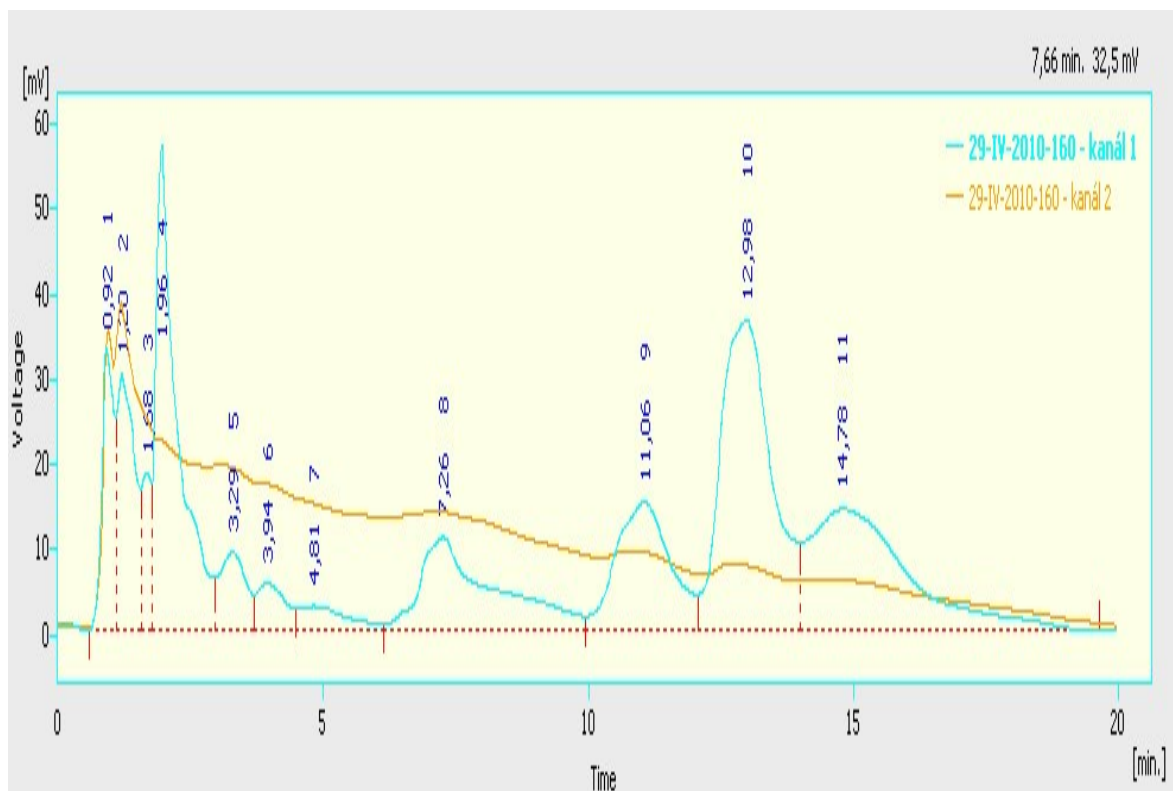


Obr.39. Stanovení antioxidantů ve víně Cabernet Sauvignon

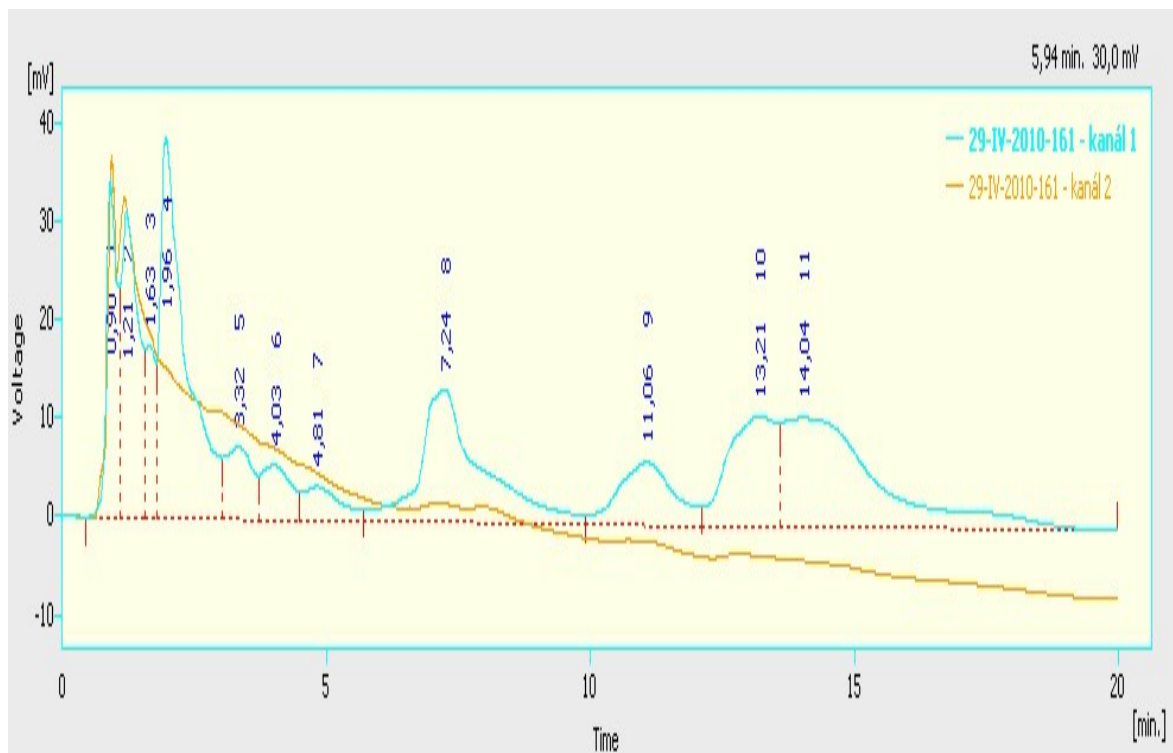
PŘÍLOHA P IV: STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ VE VÍNĚ PO 10 DNECH SKLADOVÁNÍ V LEDNICI



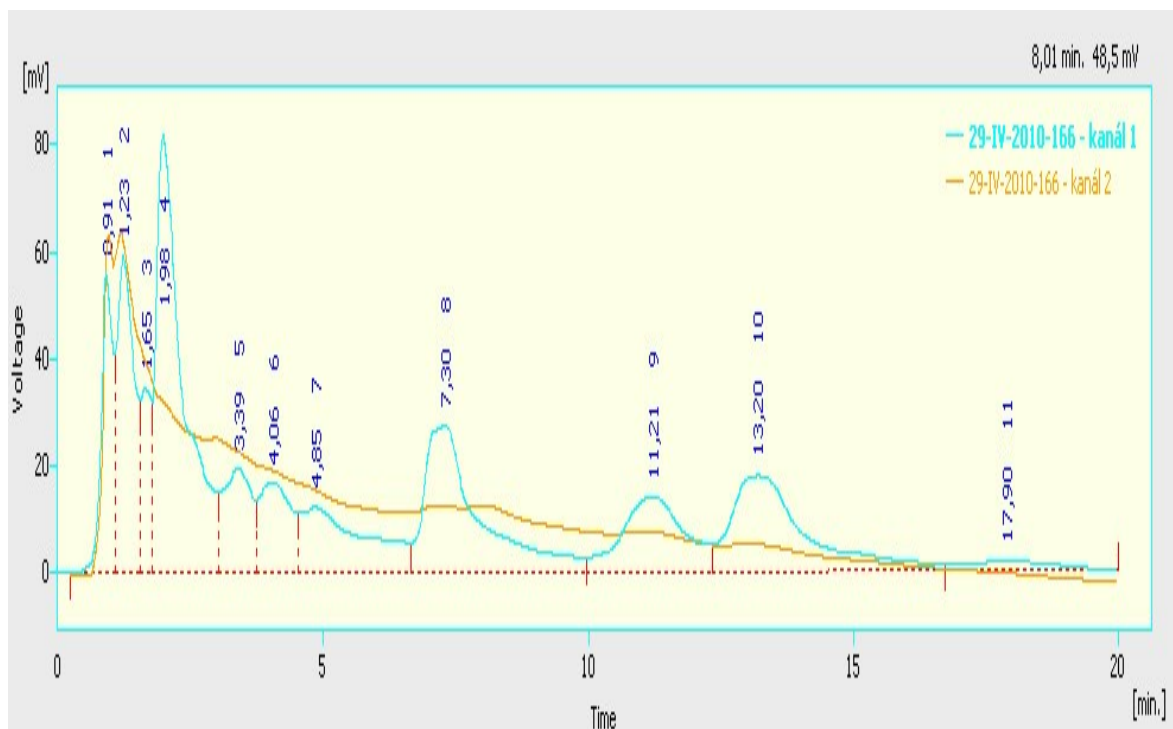
Obr.40. Stanovení antioxidantů ve víně Svatovavřínecké po 10 dnech



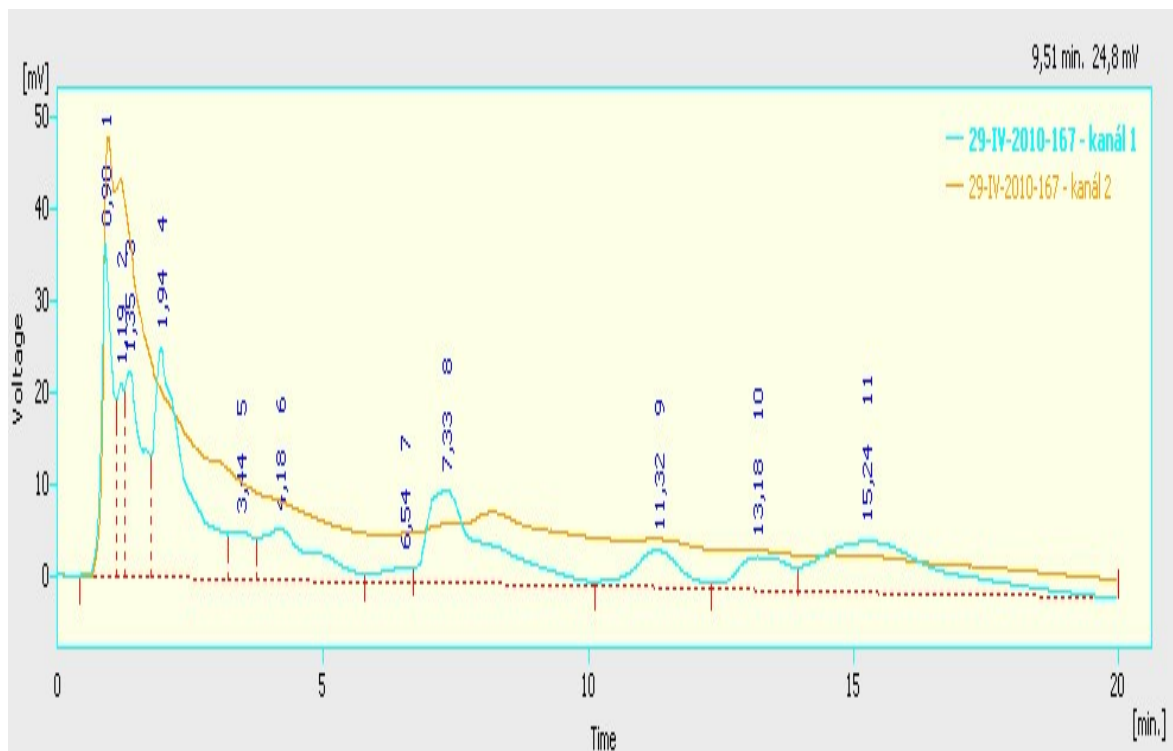
Obr.41. Stanovení antioxidantů ve víně Rulandské modré po 10 dnech



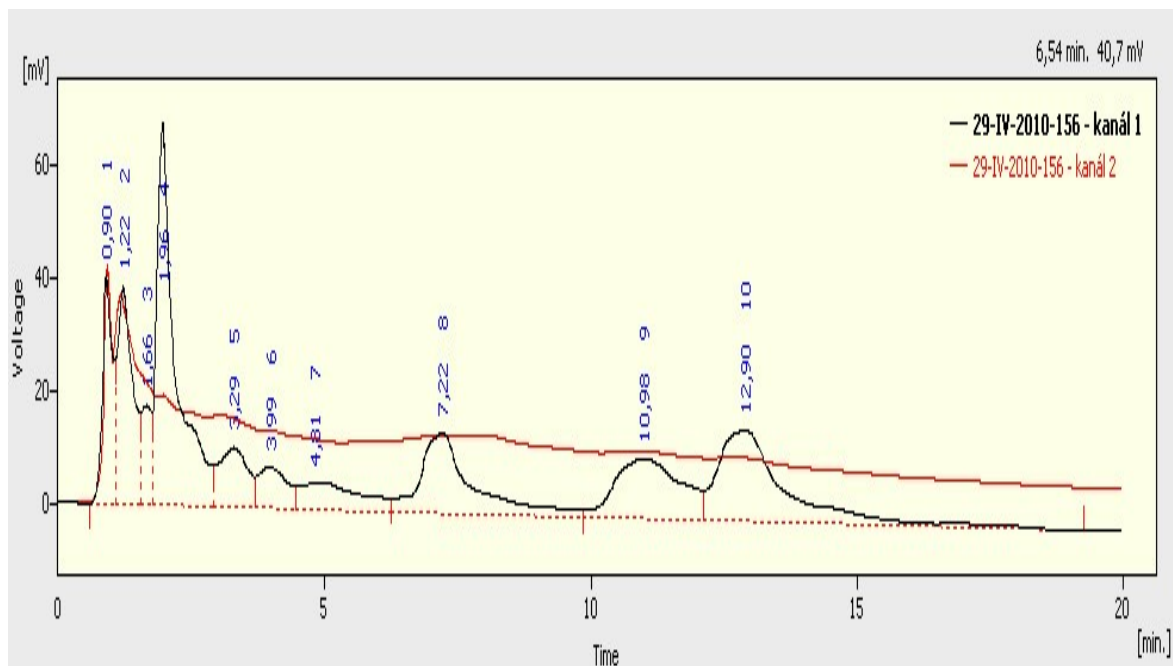
Obr.42. Stanovení antioxidantů ve víně Cabernet Sauvignon po 10 dnech



Obr.43. Stanovení antioxidantů ve víně Frankovka po 10 dnech



Obr.44. Stanovení antioxidantů ve víně Zweigeltrebe rosé po 10 dnech



Obr.45. Stanovení antioxidantů ve víně Rulandské modré po 10 dnech