

Stanovení anthokyaninových barviv v různých odrůdách červených vín

Nikola Marková

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nikola MARKOVÁ**
Osobní číslo: **T10067**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení anthokyaninových barviv v různých odrůdách červených vín**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace anthokyaninových barviv jako flavonoidních rostlinných fenolů.
2. Stanovení anthokyaninů, barevné intenzity a odstínu červených vín.
3. Technologie získávání anthokyaninových barviv.

II. Praktická část

1. Spektrofotometrické stanovení anthokyaninů, barevné intenzity a trichromatické charakteristiky v různých odrůdách červených vín.
2. Výhodnocení obsahu anthokyaninových barviv ve vybraných odrůdách červených vín.
3. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] JACKSON, Ron S. Wine science: principles and applications. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008, xvii, 751 s., [18] s. barev. obr. příl. ISBN 978-0-12-373646-8.

[2] BALÍK, Josef. Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthocyanin pigments in grapes and wines. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010, 108 s. ISBN 978-80-7375-412-9.

[3] BALÍK, Josef. VINÁŘSTVÍ návody do laboratorního cvičení. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2006.

[4] ČŮTA, František. INSTRUMENTÁLNÍ analýza. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986, 295 s.

[5] DAVIDEK, Jiří. Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL Praha 1981, 718 s.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Barbora Lapčiková, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **10. ledna 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. května 2014**

Ve Zlině dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

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 užít 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 Zlíně

.....

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 nevydělečně 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). Odpirá-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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá stanovením anthokyaninových barviv v červeném víně metodami spektrální analýzy. U vybraných odrůdových vín Dornfelder, Rulandské modré, Modrý Portugal, Zweigeltrebe a Směs vín byla stanovena hustota vína pyknometricky, dále bylo stanoveno množství anthokyaninových barviv, barevné intenzity a odstín analyzovaných vzorků červených vín. Stanovením trichromatických charakteristik byly zjištěny tři základní vlastnosti vína: jas, sytost a barevný odstín.

Klíčová slova: červené víno, anthokyaninová barviva, spektrofotometrie, barevná charakteristika vína.

ABSTRACT

The submitted bachelor thesis deals with setting anthocyanins pigments in red wine spectral analysis. For selected varietal wines Dornfelder, Pinot Noir, Blue Portugal, Zweigeltrebe and wine mixture density was determined guilt pycnometrically, also were determined anthocyanins pigments, color intensity and color shade of the analyzed samples of red wines. By setting trichromatic characteristics identified three key features of the wine: hue, saturation, brightness.

Keywords: red wine, anthocyanins pigment, chromaticity, color intensity, brightness, spectrophotometry.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury. Dále prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Touto cestou bych chtěla poděkovat paní Doc. Mgr. Barboře Lapčíkové, Ph.D. za vedení a pomoc při mé bakalářské práci.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ÚVOD	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 HROZNY, VÍNO A JEHO SLOŽENÍ	12
1.1.1 Co je víno?	12
1.1.2 Vznik a zrání bobulí vinné révy	12
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ HROZNU	13
1.2.1 Třapiny	13
1.2.2 Bobule	13
1.2.3 Slupka	13
1.2.4 Dužina	14
1.2.5 Semena	14
1.3 ODRŮDY ČERVENÝCH VÍN V ČR	15
1.3.1 Podíl jednotlivých odrůd vín na celkové ploše vinic v ČR	17
1.4 BARVIVA ČERVENÝCH ODRŮD VÍN	17
1.5 CHEMICKÁ STRUKTURA ANTHOKYANINŮ	18
1.6 FYZIKÁLNĚ- CHEMICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ STABILITU ANTHOKYANINŮ	19
1.6.1 Vliv teploty	19
1.6.2 Účinky změn pH prostředí	20
1.6.3 Účinky kyslíku a peroxidů	20
1.6.4 Účinek kyseliny L-askorbové	20
1.6.5 Změny způsobené cukry a jejich rozkladnými produkty	20
1.6.6 Oxid siřičitý	21
1.6.7 Enzymatické změny anthokyaninů	21
1.7 POSTUPY EXTRAKCE ANTHOKYANINŮ A MĚŘENÍ BAREVNÝCH PARAMETRŮ	21
1.7.1 Extrakční metody anthokyaninových barviv	21
1.7.2 Chromatografické metody stanovení anthokyanidů	22
1.7.3 Absorpční spektrální analýza	23
1.7.4 Trichromatická analýza	24
PRAKTICKÁ ČÁST	26
1.8 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	27
1.8.1 Chemikálie:	27
1.8.2 Přístroje a pomůcky:	27
1.9 VZORKY	28
1.10 METODY STANOVENÍ	29
1.10.1 Stanovení hustoty vína pyknometricky	29
1.10.2 Stanovení barviv v červených vínech	29
1.10.3 Stanovení anthokyaninů, barevné intenzity a odstínu červených vín	30
1.10.4 Stanovení trichromatografických charakteristik	31
2 VÝSLEDKY A DISKUZE	33
ZÁVĚR	38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	41
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	42
SEZNAM TABULEK	43

ÚVOD

Anthokyaniny, nebo-li rostlinná barviva se mohou označovat také jako antokyaniny, anthokyany nebo antokyany. Tato rostlinná barviva jsou nejrozšířenější skupinou rostlinných pigmentů, které jsou typické svou vlastností rozpustnosti ve vodě, dále jsou také nositeli barevnosti různých druhů květů, ovoce, zeleniny a výrobků z nich.

Chemická stavba anthokyaninů je charakterizována uhlíkatým skeletem C6-C3-C6, proto jsou zařazovány do skupiny flavonoidních rostlinných fenolů.

Anthokyaniny absorbují ve viditelné části spektra. Barevný odstín a také stabilita anthokyaninů jsou funkcí jejich vnitřní stavby a vnějších faktorů. Je pro ně tedy charakterizována široká škála barevných odstínů od tmavě modrých a fialových přes červené a růžové až po oranžové tóny. Anthokyaninová barviva jsou obsažena ve slupkách vinné révy. Odsud jsou také uvolňována během jejich vinifikace. O koncentračním složení těchto barviv ve víně rozhoduje surovina a způsob jejich zpracování. Vlastnosti a skladba se také mění biochemickými procesy, které nastávají v průběhu mikrobiálních fermentací

a tvorby vína, dále také i v čase zrání vína a v závislosti na podmínkách jeho uložení.

Anthokyaniny jsou značně nestabilní, reaktivní snadno podléhají oxidaci, kondenzačním i destrukčním reakcím spojením se změnou barevnosti vín [1,4].

V praktické části mé bakalářské práce jsem se zabývala stanovením anthokyaninových barviv u odlišných odrůd červených vín. Stanovení těchto barviv bylo provedeno spektrofotometrickými metodami a stanovením trichromatických charakteristik, mezi které patří barevný odstín, sytost barev a barevný jas.

1

TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Hrozny, víno a jeho složení

1.1.1 Co je víno?

Víno je produktem vzniklých pouze alkoholovým kvašením úplným nebo částečným, čerstvých hroznů, rozemletých nebo celých či popřípadě moštu získaného z hroznů [1].

1.1.2 Vznik a zrání bobulí vinné révy

Vývin a kvalita hroznů vinné révy se začínají utvářet již ve vinici po oplodnění květů. Je zde velmi důležité dobře pečovat a starat se o vinice, aby nás následně obdarovali dobrou úrodou. Vinohradníci tedy s plným nasazením pečují o vinice, aby vinaři měli možnost zakoupení zdravých a vyzrálých hroznů pro špičková vína. Vývin hroznu vinné révy pokračuje vznikem pupenů, třápin přes kvetení až k růstu a zrání bobulí. Nejčastěji mají tvary cylindrické, kónické, rozvětvené nebo nepravidelné [1,2,3].

Pro kvalitu vína je velmi důležité sledovat tři klíčové fenologické termíny:

- průměrné datum kvetení sledované odrůdy,
- průměrné datum zaměkání bobulí,
- průměrné datum fyziologické zralosti hroznů,

Datum kvetení se určuje po odkvětu asi 50% kvítků v květních latách. Průměrná doba zaměkání se odvozuje na základě 50% zaměkklých bobulí nebo u modrých odrůd podle 50% vybarvených bobulí. Datum fyziologické zralosti se určuje podle dosažení nejvyšší hmotnosti 100 bobulí, nejvyššího obsahu cukru získaného asimilací a také podle vyzrálости peciček. Velmi dobrou pomůckou pro zjišťování zralosti bobulí je pravidelné ochutnávání bobulí. Při ochutnávání si všímáme zabarvení peciček, snižování tříslovité chuti, zelených tónů v chuti a vývoje odrůdově typických aromatických látek [1,2,3].

Z vinice se víno přesouvá do sklepů, kde dochází k různým biochemickým procesům pro vznik kvalitního vína s ohledem na látky, které jsou obsaženy v hroznech, ale také i víněch a na zvolený způsob výroby vína. Víno vzniká přeměnou růstových pletiv plodu révy vinné, vlivem činnosti mikroorganismů. Složení a vývoj vína jsou ovlivněny biochemickými procesy. Měli bychom si uvědomit, že každé víno se vyznačuje velkou odlišností v poměrech jednotlivých složek, a tedy je důležité hodnotit jej jako celek [1,2,3].

1.2 Chemické složení hroznu

Hrozen je složen z několika částí: třepiny a bobule. Bobule sestává ze slupky, dužiny a semen. Zdravotní stav a vyzrálost všech součástí hroznu velmi ovlivňuje jakost vyrobeného vína. Také podíl jednotlivých částí hroznu v závislosti na vyzrání, odrůdě ovlivňuje jakost vína [7,9].

1.2.1 Třepiny

Tvoří 3-5% hmotnosti hroznu. Chemické složení třepiny závisí na odrůdě hroznu, dále také na podmínkách stanoviště a zralosti. Voda tvoří z celkové hmotnosti 40-90%. Dále jsou v třepině přítomny cukry, kyselina vinná a jablečná, minerální látky, třísloviny a rostlinná barviva. Třísloviny a barviva tvoří nejdůležitější složky třepiny. Aby se do moštu nevylohovaly třísloviny a zejména ne chlorofyl, je potřeba hrozny před lisováním odstopkovat. Obsah chlorofylu poškozuje jakost vína. Vyzrálé a zdřevnatělé třepiny nemají velký vliv na jakost vína, protože obsah chlorofylu je podstatně menší [7,9].

1.2.2 Bobule

Je vlastní surovina pro výrobu vína a skládá se ze slupky, dužiny a semen [7,9].

1.2.3 Slupka

Tvoří z celkové hmotnosti hroznů 9-11%. Složení slupky je však závislé na odrůdě, mají velký vliv na barvu, chuť, také vůni a celkový odrůdový charakter. Slupka je pokryta voskovou vrstvičkou proti odparu vody a vniknutí škodlivých mikroorganismů. Obsahují látky, jakož jsou cukry, kyseliny, třísloviny, aromatické látky a dusíkaté látky. Tím, že se nechá slupka vyluhovat, přechází do vína třísloviny. Slupky modrých odrůd obsahují více tříslovin než odrůdy bílé. Důležitou roli hrají ve slupce hroznu barviva. Bílé odrůdy obsahují ve slupkách chlorofyl a flavonová barviva. U modrých odrůd se vyskytují anthokyany, ty se uvolňují během nakvašení. Poměr jednotlivých anthokyaninů závisí především na odrůdě vína.

Anthokyany jsou obsaženy pouze ve slupce. Výjimku tvoří tzv. barvíčky, které jsou obsaženy částečně i v dužině. Anthokyany se uvolňují z buněk slupky až po umrtvení alkoholem, teplem nebo atmosférou CO₂. Dále ve slupkách jsou obsaženy také koncentrované aromatické látky, které dávají vínům chuť, vůni a celkový odrůdový charakter [7,9].

1.2.4 Dužina

Je nejdůležitější součástí z hlediska zpracování i přímé spotřeby. Tvoří 80-90% hmotnosti bobule. Dužina obsahuje hlavně cukry, glukosu a fruktosu, dále kyseliny vinnou a jablečnou. Kyseliny obsahuje ve formě volné a vázané, jako soli. Dále jsou obsaženy dusíkaté látky, pektiny, enzymy, minerální látky a vitamín. Barviva spolu s tříslovinami jsou zastoupeny nepatrně a jejich obsažené množství závisí na odrůdě [7,9].

1.2.5 Semena

Jsou pevnou součástí bobule. Jejich množství je dáno odrůdou asi 1-4 semen a tvoří 3-5% hmotnosti bobule. Semena tvoří třísloviny, ty se uvolňují při kvašení rmutu, dále jsou v semenech obsaženy oleje, cukry, kyseliny a popeloviny. Obsah tuků je ve víně nevítané, získávají se za lisování vysokým tlakem. Pokud bobule semena neobsahuje, bývá malá, tzv. hráškovitá. Na produkci bezsemenných plodů jsou vyšlechtěny pouze některé stolní odrůdy [7,9].

Tabulka 1: Chemické složení jednotlivých částí hroznu v %.

Složka		Třapina	Slupka	Semena	Dužina
Voda		35-90	53-82	30-45	55-92
Mono-sacharidy	pentosy a pentosany	1-2,8	1-1,2	3,9-4,5	0,2-0,5
	hexosy	stopy	nepatrně	----	10-30
Sacharosa		----	----	----	do 1,5
Pektiny		0,7	0,9	----	0,1-0,3
Kyseliny		0,5-1,6	0,1-0,7	----	0,1-0,8
Třísloviny		1,3-3,	0,01-2,	1,8-5,	Stopy
Barviva		----	1,0-15,4	----	Stopy
Enzymy		stopy	stopy	stopy	Stopy
Vitaminy		stopy	stopy	stopy	Stopy
N-látky		0,7-2,2	0,8-1,9	0,8-1,2	1,4-2,2
Aromatické látky		----	stopy	stopy	----
Oleje		----	1,5	10-20	----
Popeloviny		6-10	2-3,7	2-5	0,1-1,1

1.3 Odrůdy červených vín v ČR

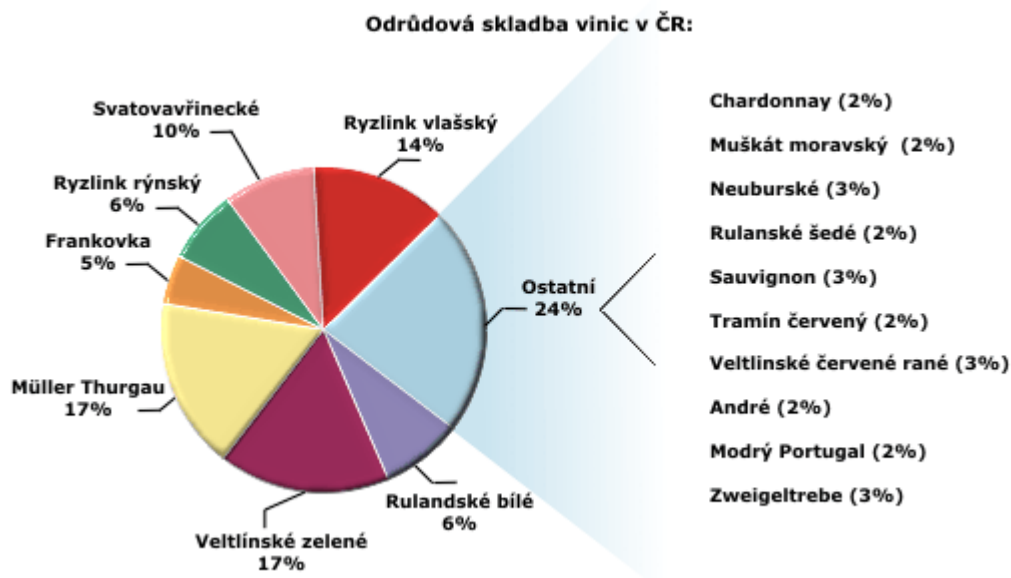
Modré hrozny vyžadují teplé, slunné a suché polohy pro jejich pěstování, červená vína se výborně rodí v subtropickém klimatu. V ČR je hlavní doménou červeného vína teplý jih Moravy. V ČR se pěstuje celá řada odrůd k produkci červených vín [12].

Tabulka 2.: Odrůdy červených hroznů pěstovaných v ČR [12,13].

Odrůdy červených vín v ČR	Původ	Barva	Plnost	Vůně
Alibernet	Ukrajina (křížec Alicante Bouschet x Cabernet Sauvignon)	Tmavě červená	Středně plné i plné, s vyšším obsahem tříslovin	Aromatické látky po odrůdě Cabernet Sauvignon
André	Velkých Pavlovicích (kříženec Frankovka x Svatovavřínecké)	Tmavě granátová (třešňová) barva	Středně plné, tvrdší projev tříslovin, vysoce extraktivní	Aroma zralých otružin až dřevitá
Cabernet Sauvignon	Vznik na Moravě náhodným opylením odrůdy Cabernet franc pylem odrůdy Sauvignon	Tmavě granátová barva s naoranžovělým zábleskem	Středně plné, výraznější třísloviny	Černého rybízu, třešňů, otružin, tabáku či cedrového dřeva

Frankovka	Nejednoznačné místo původu	Tmavě růžová až fialová	Víno Středně plné s výraznější tříslovinou	Ovocná po švestkách a černém ovoci, dřevitá v mládí divoká
Modrý Portugal	Původ není jednoznačný	Malinově červená až světle fialová	Lehké víno s menším obsahem tříslovin	Mladistvá, ovocná po malinách a červeném ovoci, dřevitá, jemná
Neronet	Původní moravská odrůda (kříženec Svato-vavříneckého, Modrého Portugalu a Alibernetu)	Velmi tmavě červené s modravými záblesky	Středně plné s výraznější strukturou tříslovin	Černého rybízu a sušeného ovoce
Rulandské modré	Burgundsko (kříženec odrůd Mlynářka a Tramín)	Bledě rubínové až cihlově červené s oranžovým meniskem	Plnější s výraznými tříslovinami	Ovocná po jahodách, ostružinách a červených třešních, mnohdy také živočišná, dřevitá a jemná
Svatovavřínecké	Francie (jako semenáč „burgundských rulandských“ odrůd)	Tmavě granátové s fialovými odstíny	Středně plné až plné s velmi jemnými tříslovinami	Výrazně ovocná po švestkách a černém ovoci, jemně sametová
Zweigeltrebe	Rakousko (kříženec Svato-vavříneckého vína s Frankovkou)	Granátová barva až tmavě třešňová	Středně plné s výraznějšími tříslovinami	Výrazně ovocná a dřevitá, v mládí až divoká

1.3.1 Podíl jednotlivých odrůd vín na celkové ploše vinic v ČR



Obrázek 1: Odrůdová skladba v ČR [12].

Přibližně 75 % plochy vinic České republiky bylo osázeno bílými odrůdami, zbývajících 25 % připadalo na odrůdy modré. Podíl modrých odrůd vína se v odrůdové skladbě viz. Obr. 1. ustálil. V roce 1993 činil jejich celkový podíl na celkové ploše vinic 22 %, v roce 2004 již 34 %, ale v posledních letech začal opět klesat, protože se od výsadby modrých odrůd vín ustupuje [12].

1.4 Barviva červených odrůd vín

Anthokyaniny jsou rostlinná barviva, jsou nejrozšířenější skupinou rostlinných pigmentů rozpustných ve vodě, a také jsou v mnoha případech nositeli barevnosti různých druhů květů, ovoce, zeleniny a výrobků z nich. Nacházejí se v povrchových částech ovoce a zeleniny, dále ve slupkách a v okrajových vrstvách dužiny. Najdeme je především v hroznech, bezinkách, červeném zelí, ale také u některých okrasných rostlin.

Způsobují zbarvení, anthokyaniny značně absorbují ve viditelné části spektra. Barevný odstín a stabilita anthokyanů jsou funkcí jejich vnitřní stavby a vnějších faktorů, a proto je pro ně typická široká škála

barevných odstínů. Jsou zodpovědné za tmavě modré, fialové, červené až růžové zbarvení ovoce a zeleniny [4,5].

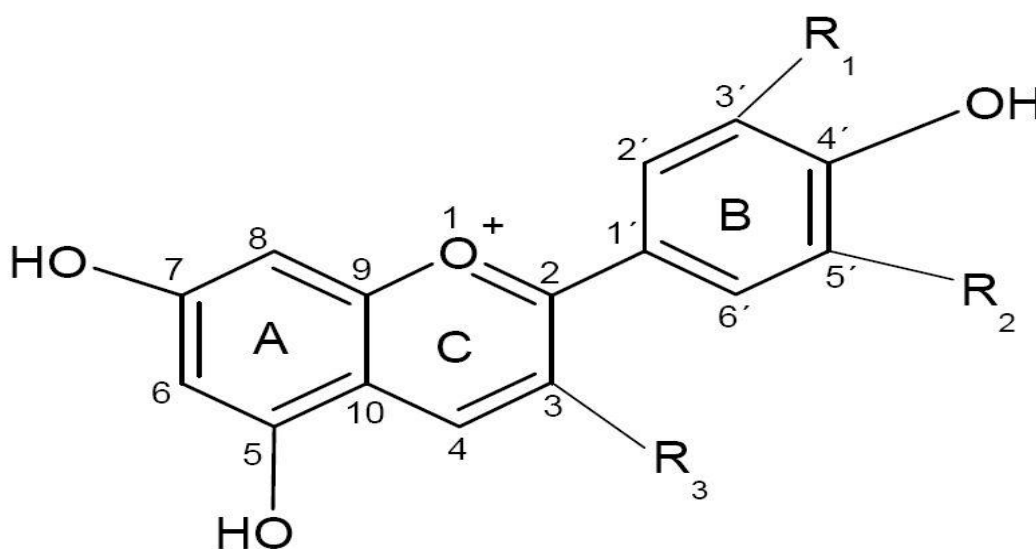
1.5 Chemická struktura anthokyaninů

Anthokyaniny, které se vyskytují přirozeně, jsou heteroglykosidy. Ty se skládají z cukerné složky aglykonu, nebo-li anthokyanidinu. Anthokyanidiny jsou polyhydroxyderiváty a polymethoxyderiváty 2-fenylbenzopyryliového, nebo také flavyliového kationu.

V přírodě existuje celkem 15 významných anthokyanidinů. Všechny sloučeniny jsou v poloze C-4 substituovány hydroxylovou skupinou a v zájmně se liší substitucí v polohách C-3, C-5, C-6, C-7, C-3', C-5'. V hroznech révy bylo identifikováno pět aglykonů, jako jsou například kyanidin, peonidin, delphinidin, perunicin a malvidin. Vysoká reaktivita aglykony je odpovědná za strukturální modifikace anthokyaninů a šíří jejich vybarvení [4,6].

Tabulka 3: Chemická struktura vybraných anthokyaninů [4].

Kyanidin	$R_3=R_5=H$
Peonidin	$R_3=OCH_3; R_5=H$
Delphinidin	$R_3=R_5=OH$
Malvidin	$R_3=OCH_3; R_5=OCH_3$
Petunidin	$R_3=OCH_3; R_5=OH$



Obrázek 2: Struktura flaviliového kationu [4].

Tabulka 4: Přehled vybraných anthokyaninů [4].

Název a zkratka		Substituent v poloze					
		C-3	C-5	C-6	C-7	C-3'	C-5'
Kyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	H
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OCH ₃	H
Delfinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OCH ₃

1.6 Fyzikálně- chemické faktory ovlivňující stabilitu anthokyaninů

Anthokyaniny jsou zodpovědné za červenou barvu hroznů a vína. Tyto barviva se nacházejí v kůži hroznů modrých odrůd. Syntéza anthokyanů začíná během zrání bobulí, ty se následně hromadí v kůži hroznu během zrání [5,6,7].

Existuje několik faktorů, které ovlivňují obsažené množství anthokyanových barviv ve víně. Mezi tyto faktory můžeme zahrnout: klima, půdní podmínky, stav obsažené vody v révě a také kulturní praktiky. Koncentrace anthokyanových barviv může také ovlivnit sklizeň nebo nadměrné zrání hroznů [7].

Samotné anthokyaniny jsou značně nestabilní a citlivé na degradaci. Jejich stabilita je ovlivněna mnoha faktory jako jsou pH, teplota, světlo, přítomnost kyslíku popř. jiných sloučenin [4,8].

1.6.1 Vliv teploty

Teplota zpracování a skladování vín má vliv na rychlost rozkladu anthokyanů. Při degradaci anthokyanových barviv dochází k hydrolýze glykosidické vazby, otevře se heterocyklický kruh karbinolové báze a vznikne bezbarvý chalkon, nebo se po prvotní hydrolýze glykosidické vazby transformuje anthokyanidin v chalkon. Ten vytváří α -diketon. Degradace anthokyaninů byly prokázány dvěma mechanismy. V prvním případě se bezbarvý chalkon mění na 3-glukosyl-5,7-hydroxykumarin a v druhém dochází k rozkladu α -diketonu na příslušné fenolové deriváty [4,2].

1.6.2 Účinky změn pH prostředí

Hodnota pH prostředí má významný vliv na barvu anthokyaninových barviv. Anthokyaninové roztoky pod hodnotu pH 3 dosahují nejintenzivnější červenou barvu. Pokud se bude pH roztoku zvyšovat, červené zbarvení se bude postupně ztrácet, až do bodu, ve které se jeví bezbarvé, což je oblast kolem pH 4-5. Dalším zvyšováním pH přispívá k purpurovému a modrému zbarvení, které skladováním nebo zvýšenou teplotou se mění ve žluté [4,3].

1.6.3 Účinky kyslíku a peroxidů

Kyslík a teplota jsou považovány za nespécifitější urychlovače destrukce anthokyaninových barviv. Kyslík působí rušivě na anthokyaniny jednak přímými oxidačními mechanismy nebo nepřímo prostřednictvím již zoxidovaných složek prostředí, které reagovaly a anthokyaniny za tvorby bezbarvých nebo hnědých produktů. Destrukci anthokyaninů za účasti kyslíku zvyšuje přítomný alkohol a působení světla za vzniku dihydroflavonolů. Škodlivé účinky vůči anthokyaninovým barvivům značně vykazuje i peroxid vodíku [4,3,8].

1.6.4 Účinek kyseliny L-askorbové

Na anthokyaniny má působení kyseliny L-askorbové s kyslíkem synergický účinek, dochází tím k degradaci anthokyaninových barviv. Při oxidaci kyseliny L-askorbové dochází k největším ztrátám těchto barviv. Hlavní příčinou jejich nestálosti v biochemicky narušených potravinách je vzájemná peroxydační účinnost. Degradací produkty tvořené při těchto oxidačně-redukčních reakcích jsou nestabilní a rozkládají se na další nestabilní a bezbarvé produkty, urychlující destrukci barviv. Jestliže se kyselina L-askorbová stabilizuje, zajistí se tím i menší rozklad anthokyaninových barviv [4].

1.6.5 Změny způsobené cukry a jejich rozkladnými produkty

Cukry také zvyšují destrukci anthokyaninů. Fruktóza, arabinóza, laktóza a sorbóza vykazují vyšší rozkladné účinky na anthokyaninová barviva než glukóza, sacharóza a maltóza. Současně kyslík zvyšuje negativní účinky všech cukrů. V přítomnosti cukrů je rychlost destrukce barviva spojena s rychlostí rozkladu cukrů na sloučeniny furfuralového typu. Tyto sloučeniny se tvoří prostřednictvím Maillardových reakcí nebo oxidací kyseliny L-askorbové, polyuronových kyselin, mohou s anthokyaniny kondenzovat do podoby hnědě zbarvených sloučenin. Furfural spolu s hydroxymethylfulfurem výrazně urychluje rozpad anthokyaninů již při nízkých koncentracích [4].

1.6.6 Oxid siřičitý

Oxid siřičitý se používá při výrobě vína jako inhibitor mikrobiologického růstu. působí velmi intenzivně, rychle a redukčně. Redukuje mnohé látky, které jsou ve víně obsaženy, včetně polyfenolů, čímž se zvyšuje stabilita a kvalita vína.

Další funkci oxidu siřičitého představuje jeho odbarvovací schopnost anthokyanů. Odbarvování je spojeno s nukleofilní reakcí negativně nabitého bisulfidového iontu s flavyliovým kationtem za tvorby chroman-4-sulfonové kyseliny. Jestliže, je však v poloze C-4 obsažena flavinová sůl, je odbarvovací účinek oxidu siřičitého neúčinný [4,9].

1.6.7 Enzymatické změny anthokyaninů

V rostlinných pletivech existují mnohé enzymy, které se podílejí na odbarvování anthokyaninů. Obecně byly tyto enzymy identifikovány jako fenolázy nebo peroxidázy.

Fenolázy katalyzují oxidaci fenolických sloučenin obsahujících o-dihydroxyskupinu na o-chinony, které mohou reagovat navzájem v hnědě zbarvené polymery vyšší molekulové hmotnosti nebo reagují s aminokyselinami nebo bílkovinami za tvorby makromolekulárních komplexů, ty jsou rovněž hnědé nebo se zúčastňují oxidačních reakcí sloučenin s nižším oxidačně redukčním potenciálem [4,9].

1.7 Postupy extrakce anthokyaninů a měření barevných parametrů

Slouží k identifikaci a objasnění struktury anthokyanů. Analýza anthokyanů je složitým procesem, v důsledku jejich schopnosti podléhat strukturním transformacím a jejich podobností s jinými flavonoidy [10].

1.7.1 Extrakční metody anthokyaninových barviv

Neoddělitelnou součástí získávání barviv v technologické praxi je mechanické zpracování rostlinného materiálu. Porušením celistvosti buněk je počátkem fyzikálních a biochemických procesů, které probíhají až do vytvoření koncentrační rovnováhy pigmentů, které jsou obsaženy jak v tuhé tak i v kapalně fázi. V procesu získávání rostlinných pigmentů je nutné znát její rozpustnost v různých rozpouštědlech [4].

Anthokyaniny jsou dobře rozpustné ve vodě, dále v metanolu a etanolu. Nerozpouštějí se v absolutním acetonu, chloroformu a dietyleru. Přídavky metanolu, etanolu, kyseliny siřičité a kysel-

liny chlorovodíkové do vody zvyšují její extrakční účinky a rychlost extrakce anthokyaninů z rostlinných pletiv [4,10].

Silně okyselené alkoholické extrakty anthokyaninů snižují svou barevnost již po několika dnech vystavení světlu. Destrukce anthokyaninů roste s koncentrací alkoholu, kyslíku a množstvím světelného záření za vzniku dihydroflavonolů, neboli tzv. taxifolinů. Ultrafialové a ionizující záření působí na anthokyaniny fotooxidativně.

U ovocných druhů obzvláště bohatých na anthokyaniny jsou známé postupy výroby anthokyaninových koncentrátů založené pouze na odstředění a zahuštění šťávy plodů do podoby barvicí pasty [4].

1.7.2 Chromatografické metody stanovení anthokyanidů

Chromatografie se používá k separaci a identifikaci anthokyanů z hroznů a vín.

Papírová chromatografie (PC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC) patří mezi historicky používané techniky k separaci anthokyanů. PC a TLC se používá na jednoduchý důkaz přítomnosti diglykosidických anthokyaninů v červených vínech, které jsou v okyselených vodných roztocích, jako je např. 0,2% HCl nebo 1% kyselina octová pohyblivější než monoglykosidické anthokyaniny [4,10].

Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení anthokyaninů se využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), schopná identifikovat složení barviv červených vín stanovením jednotlivých anthokyaninů popř. fenolových sloučenin [4, 11].

HPLC chromatografie používá opačný sled fází, nepolární stacionární fázi a mobilní polární fázi. Stacionární fázi tvoří C18 polymer navázaný polymerní sloupci, které jsou stabilní v širším rozsahu pH. Mobilní fáze je obvykle gradient. Jeho základ je tvořen z vody, kyseliny a organických modifikátorů. Jako kyselina jsou používány kyselina fosforečná, chloristá, octová a mravenčí, jako modifikátor bývá použit methanol nebo acetonitril [4,10].

Pro pokročilejší separace monomerních anthokyaninů, kondenzovaných struktur barviv a derivátů pyranoanthokyaninů v červených vínech se využívá mikroseparačních technik, jako kapilární kapalinová chromatografie (CLC), nebo kapilární zónová elektroforéza (CZE). Frakcionovaná barviva jsou často charakterizována metodami hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku nebo ionizací elektrosprejem (ESI-MS) [4].

V kyselém prostředí je flavinový kationt zbarvený do červena a poskytuje charakteristické absorpční maximum při 520 nm. Při této hodnotě nedochází k ovlivňování jinými fenolovými sloučeninami přítomnými v rostlinném extraktu [10].

1.7.3 Absorpční spektrální analýza

Absorpční spektrální analýza je založena na schopnosti látek pohlcovat světlo. Transmittance je poměr intenzity záření, které vstupuje ϕ a vystupující ϕ_0 :

$$T = \phi / \phi_0 \quad (1)$$

Absorbance je pojem, který se používá pro výpočet koncentrace látky:

$$A = -\log \tau = -\log(\phi / \phi_0) \quad (2)$$

Při výpočtu absorbance platí Lambert-Beerův zákon:

$$A = a \cdot c \cdot l \quad (3)$$

kde: A- absorbance, a- absorpční koeficient, c- koncentrace látky, l- tloušťka kyvety.

Absorpční koeficient a se vyjadřuje jako absorbance roztoku 1 g látky v 1000 ml rozpouštědla. Absorbance molárních roztoku bývá většinou označena jako molární extinkční koeficient ϵ [14].

Roztoky k měření musejí být čiré, měly by dosahovat konstantní teploty a kyvetu je nutno volit takovou, aby hodnota transmittance ležela mezi 20-80 %. Pokud se nedosáhne optimální transmittance správnou volbou kyvety, musí být roztok zředěn, popřípadě se musí stanovení opakovat s větší výchozí koncentrací látky. Při úpravě koncentrace je nutné dodržet konstantní hodnotu pH a molaritu pufru, další použité činitele, na nichž může záviset extinkční koeficient.

Vliv uvedených činitelů můžeme do značné míry ovlivnit kalibrační křivkou, která se sestavuje známými koncentracemi měřené látky za stejných podmínek. Je vhodné upravit podmínky analýzy tak, aby hodnoty absorbance ležely v lineární oblasti kalibrační křivky. Naměřené výsledky je třeba korigovat o hodnotu slepého pokusu, pokud by však byla hodnota slepého pokusu nízká, je lépe tuto hodnotu proměřit proti neutrálnímu rozpouštědlu, což je v tomto případě např. voda a vlastní stanovení rovněž proti témuž rozpouštědlu. Korigovaná absorbance se pak vypočte z rozdílu obou absorbancí.

Před vlastní analýzou je vhodné zkontrolovat správně nastavenou vlnovou délku měření, protože malé odchylky mohou být způsobeny přístrojem, nebo odchylkami ve složení měřeného roztoku, což je v mém případě červené víno.

U přístrojů s filtry se transmitance poměří s použitím několika filtrů odstínů příbuzných doplňkové barvě odstínu zbarvení měřeného roztoku a ke stanovení se volí takový filtr, u kterého je transmitance nejnižší a absorbance nejvyšší

U spektrofotometrů se měří absorpční spektrum v celkové šířce asi 100 nm. Obvykle stačí měřit transmitanci ve viditelné oblasti v intervalech po 10 nm. Pro vlastní stanovení se volí vlnová délka, při níž absorbance dosáhne maxima [14].

Technika měření může být dvojí:

- a. Volí se konstantní absorbance a konstantní vlnová délka a upravuje se pouze tloušťka kyvety. Při tomto postupu se eliminují odchylky od Lambert-Beerova zákona a přesnost stanovení se zvýší. Tato metoda je vhodná pro laboratorní analýzu, avšak dnes se jí využívá jen zřídka [14].
- b. Měří se při konstantní vlnové délce a při konstantní tloušťce kyvety se zjišťuje hodnota absorbance. Tímto způsobem mohou být uplatňovány vlivy způsobující odchylky od Lambert-Beerova zákona, a proto je nutné vždy odečíst koncentraci látky z kalibrační křivky [14].

Měřené roztoky musí být čiré a nesmějí obsahovat bublinky plynů. Kyvety se vypláchnou měřeným roztokem a z vnější strany se osuší. Dále se nenechávají před měřením dlouho v přístroji, aby nedošlo k zahřátí roztoku. Intenzita zbarvení se často mění, proto je nezbytné dodržet uvedenou dobu měření a to i pro slepý pokus. Každé měření se opakuje 2krát až 3krát a zapisuje se průměrná hodnota transmitance. U souběžných stanovení se průměrné hodnoty vypočítávají až z příslušných absorbancí. Kalibrační křivka se kontroluje jednou měsíčně a po každé změně pracovních podmínek, čímž může být změna šířky štěrbin, napětí zdroje, nebo také příprava nového činidla. Stanovení se provádí v týchž kyvetách, v nichž se proměřovala kalibrační křivka [14].

1.7.4 Trichromatická analýza

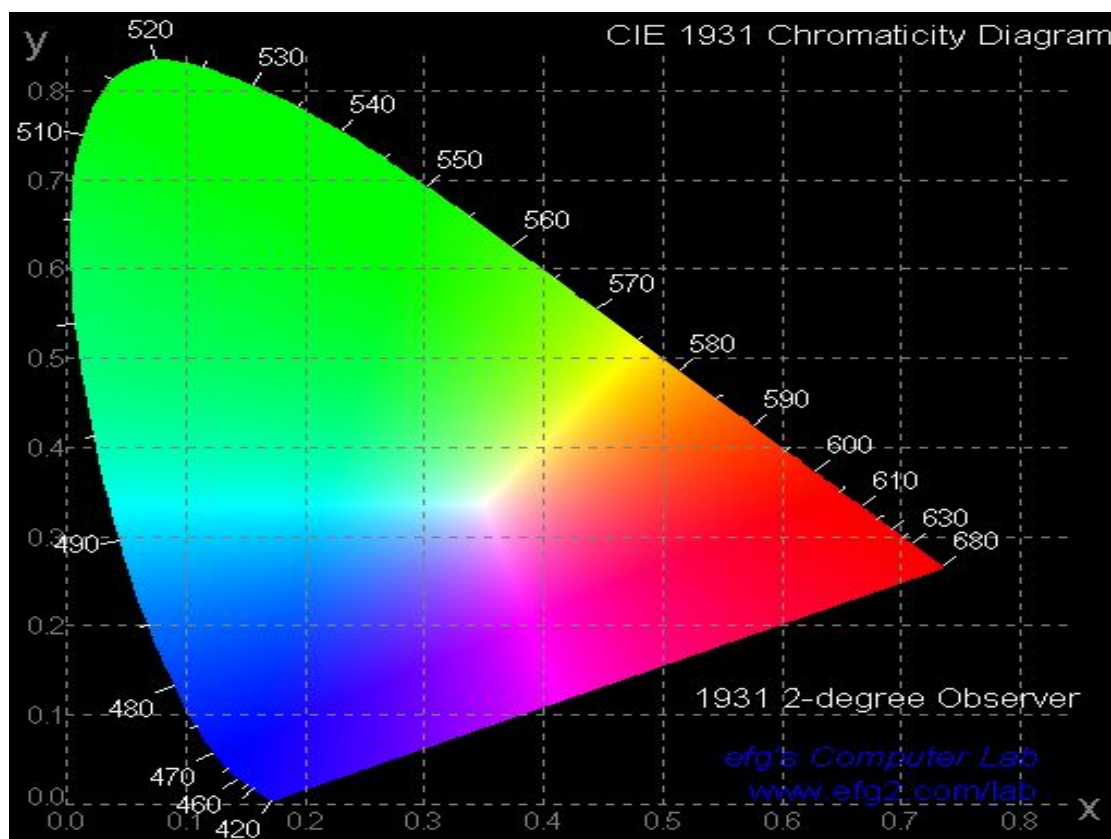
Trichromatografická metoda slouží ke stanovení tří fyzikálních vlastností, u kterých se určuje barevný vjem:

1. *Jasnost* - je to integrální energetický parametr světla vyjadřující součet všech energetických příspěvků jednotlivých monochromatických světél. Čím je větší intenzita zbarvení, tím menší je jasnost měřeného vzorku, tzn. úplně bezbarvý roztok má jasnost rovnu 100 % [14,17].
2. *Převládající odstín* - dá se označit také jako tón barvy. Určuje barevnost podle vlnové délky dominantního světla, které je v barvě zastoupeno. Tón barvy je určen tou vlnovou délkou

monochromatického světla, které přispívá k danému světlu největším energetickým příspěvkem [14,17].

3. *Sytost* - je dána poměrem energií jednotlivých monochromatických světél zastoupených v dané barvě. Syté barvy neobsahují barvu bílou, jsou to tzv. spektrální barvy, kdež to barvy nesyte bílou složku obsahují. Málo sytá barva je tedy bílá barva s barevným nádechem. Sytost barvy je tedy psychosenzorický pojem, který odpovídá psychofyzikálnímu pojmu čistota barvy [14,17]

Uvedené hodnoty lze vypočítat ze spektrálních křivek. Pro tento výpočet se nesmí koncentrace dané látky měnit, i když transmitance vybočuje z optimálního rozsahu 10 až 90 %. V praxi se používá méně přesných tristimulových přístrojů, kde se barevný vjem rozloží v podíl tří sad barevných filtrů a z výsledků se trichromatické hodnoty odečtou graficky z CIE diagramu, jehož základem jsou chromatické diagramy, kde hodnota Y popisuje barevnou sytost a zbylé dvě hodnoty jsou pouze matematickými popisy barevnosti. Hodnota X představuje barevný odstín, Y barevnou sytost a hodnota Z je charakterizována pro barevný jas [14,19].



Obrázek 3: Trojúhelníkový CIE diagram [19].

2

PRAKTICKÁ ČÁST

1.8 Použité chemikálie a přístroje

1.8.1 Chemikálie:

CoSO₄ · 7 H₂O, SIGMA ALDRICH,

HCl (1:1), Ing. Petr Lukaš, Uherský Brod,

KOH, 30% roztok, SIGMA ALDRICH,

20% roztok K₂S₂O₅, Ing. Petr Švec- PENTA

Tlumivý roztok pH 1,0 (smícháním roztoků 0,2 mol.l⁻¹ KCl + 0,2 mol.l⁻¹ HCl v poměru 1:2,6).

Destilovaná voda

1.8.2 Přístroje a pomůcky:

Analytické váhy, Mettler Toledo,

kalibrovaný pyknometr s úzkým hrdlem a zátkou,

pH metr, Mettler Toledo,

UV-VIS-spektrofotometr (Helios Alpha), Unicam, ThermoSpectronic.



Obrázek 4: UV-VIS-spektrofotometr (Helios Alpha)[16].

1.9 Vzorky

V práci byly analyzovány různé druhy červených vín viz. tab.5.

Tabulka 5: Přehled použitých vzorků vín.

Druh vína	Vinařská ob- last	Cukernatost	Obsah alkoho- lu	Ročník	Barva
Dornfelder	Blatnice pod sv. Anthonín- kem	Suché	12 %	2011	Červená
Rulandské modré	Blatnice pod sv. Antonín- kem	Suché	11,5 %	2011	Červená
Modrý Por- tugal	Blatnice pod sv. Antonín- kem	Suché	11,5 %	2011	Červená
Zweigeltrebe	Blatnice pod sv. Antonín- kem	Suché	13 %	2011	Červená
Směs červe- ných vín	Morava	Suché	12,5 %	2001	Červená

1.10 Metody stanovení

1.10.1 Stanovení hustoty vína pyknometricky

Princip stanovení:

Hustota při 20°C je poměr hmotnosti látky k jejímu objemu při 20°C, vyjadřuje se $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ nebo $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Hustota vína je při 20°C korigována na obsah veškerého oxidu siřičitého [15,18].

Postup:

Nejprve zvážíme suchý kalibrovaný pyknometr, dále pyknometr nejprve několikrát vypláchneme zkoušeným vzorkem, pak jej naplníme tak, aby množství vzorku dosahovalo na spodní meniskus jeho hladiny právě dotýkal značky na pyknometru. Ulpěné kapky na vnitřní straně hrdla osušíme filtračním papírem a celý pyknometr dokonale osušíme, uzavřeme zátkou a současně stanovíme hmotnost naplněného pyknometru v gramech na čtyři desetinná místa [15,22].

Výpočet:

Hustota zkoušeného vzorku při 20 °C vyjádřená na pět desetinných míst:

$$\rho = m/V \quad (\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}) \quad (4)$$

kde: m je hmotnost a V je objem pyknometru,

Relativní hustota zkoušeného vzorku při 20 °C vyjádřená na pět desetinných míst:

$$d = \rho / 0,998203 \quad (5)$$

kde: ρ je hustota zkoušeného vzorku při 20 °C

Opakovatelnost a reprodukovatelnost:

Pro suchá a polosladká vína $r = 0,000010$, $R = 0,00037$

Pro sladká vína $r = 0,000018$, $R = 0,0004$

1.10.2 Stanovení barviv v červených vínech

Princip stanovení:

Obsah červeného barviva stanovíme spektrofotometricky. Jako standart použijeme roztok heptahydrátu síranu kobaltnatého, jehož hodnota absorpčního maxima je blízká hodnotě absorpčního maxima antokyaninových barviv červených vín při pH 1,0 (vlnová délka 510-530 nm) [15,22].

Postup:

Pomocí standardního roztoku síranu kobaltnatého a destilované vody byla připravena řada 25 ml odměrných baněk o koncentracích 10, 20, 30, 40, a 50 mg síranu kobaltnatého v jednom mililitru roztoku. Spektrofotometrickým měřením byla zjištěna jejich absorbance v 10 mm kyvetě proti destilované vodě při 520 nm [15,22].

Poté bylo odpipetováno 1 ml čirého roztoku vzorků červeného vína do 50 ml odměrné baňky. Dále bylo přidáno 35 ml tlumivého roztoku pH 1,0 a bylo změřeno jejich pH hodnoty. Podle potřeby bylo pH upraveno roztokem HCl (1:1) na pH 1,0 a doplněno po značku tlumivým roztokem. Po 60 minutách uložení ve tmě byla změřena absorbance pomocí UV – VIS spektrometru v 10 mm kyvetě při 520 nm proti destilované vodě [15,22].

1.10.3 Stanovení anthokyaninů, barevné intenzity a odstínu červených vín**Princip:**

Anthokyaniny tvoří bezbarvé sloučeniny s bisulfitovým iontem a změna v absorbanci je úměrná koncentraci anthokyaninů. Násobek 5/3 se používá na odhad barevného příspěvku polymerních anthokyaninů, které jsou k odbarvení méně citlivé [15].

Barevná intenzita je součtem hodnot absorbance červeného vína při vlnových délkách 420, 520 a 620 nm v 10 mm kyvetě proti destilované vodě. Odstín červených vín se vyjadřuje jako podíl hodnot absorbance vlnových délek 420 a 520 nm nebo jako úhel vyjádřený ve stupních, jehož tangente se rovná rozdílu absorbancí naměřených při 520 a 420 nm v desetimililitrové kyvetě proti destilované vodě [15,22].

Postup:

Byla zaznamenávána absorbance čirého červeného vína při 420, 520 a 620 nm v 10 mm kyvetě proti destilované vodě. Ke 2,6 ml vína bylo přidáno 40 μ l čerstvého 20 % roztoku disiřičitanu draselného a po uplynutí 1 minuty byla měřena absorbance v 10 mm kyvetě při 520 nm proti destilované vodě [15,22].

Do 50 ml odměrné baňky bylo pipetováno 1 ml vína a doplněno 1 mol.l⁻¹ roztokem HCl po značku. Po 60 minutách byla měřena v 10 ml kyvetě při 520 nm proti destilované vodě absorbance daných vzorků [15,22].

Výpočet:

$$I_{10 \text{ mm}} = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad (6)$$

$$O = A_{420} / A_{520} \quad (7)$$

$$\alpha = \text{tg}^{-1}(A_{520} - A_{420}) \quad (8)$$

$$x = 20x[50x A_{520}(\text{HCl}) - 5/3 \times A_{520}(\text{SO}_2)] \quad (9)$$

kde:

x = anthokyaniny v mg $\cdot 1^{-1}$ vyjádřené na celá čísla,

$I_{10 \text{ mm}}$ = barevná intenzita vyjádřena na tři desetinná místa

O = barevný odstín vyjádřený na tři desetinná místa

a = barevný odstín vyjádřený ve stupních na jedno desetinné místo [15,18].

1.10.4 Stanovení trichromatografických charakteristik

Princip stanovení:

Barevné vlastnosti vína jsou charakterizovány trichromatografickými složkami X, Y, Z barevného systému CIE. Jejich hodnoty určují barevný odstín, sytost a jas [15,22].

Postup:

Jiskrně čiré červené víno bylo měřeno v 10 mm kyvetě proti destilované vodě. Byla stanovena transmitance při vlnových délkách 445, 495, 550 a 625 nm. Matné víno bylo potřeba před měřením v množství 10 - 20 ml přefiltrovat skleněnými fritami S3 a S4 [15,22].

Výpočet:

$$T = (T_{\text{měřené}})^{1/b} / 100^{(1/b-1)} \quad (10)$$

b = optická šířka použité kyvety v centimetrech

Trichromatické složky X, Y, Z:

$$X = 0,42 \times T_{625} + 0,35 \times T_{550} + 0,21 \times T_{495} \quad (11)$$

$$Y = 0,20 \times T_{625} + 0,63 \times T_{550} + 0,17 \times T_{495} \quad (12)$$

$$Z = 0,24 \times T_{495} + 0,94 \times T_{445} \quad (13)$$

kde:

X = barevný odstín, Y = barevná sytost, Z = barevný jas, T = transmitance

Výpočet souřadnic CIE x, y - diagramu [15,22].

$$x = X / (X + Y + Z) \quad (14)$$

$$y = Y / (X + Y + Z)$$

(15)

2 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro veškeré stanovení anthokyaninových barviv byly vzorky měřeny 3krát a z naměřených hodnot byla vypočítaná průměrná hodnota, se kterou se počítalo v analýze těchto barviv obsažených v červených vínech.

Stanovení hustoty vína pyknometricky

Jednotlivé hustoty analyzovaných vzorků byly vypočteny dle vzorce (4), relativní hustota byla vypočtena dle vzorce (5). Hodnoty hustot vzorků vín jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka 6: Vypočtené hodnoty hustoty a relativní hustoty zkoušeného vzorku při 20 °C.

Druh vína	Hustota [g/cm³]	Relativní hustota [g/cm³]
Směs vín	1,0001	1,0019
Dornfelder	1,0043	1,0062
Modrý Portugal	1,0064	1,0046
Rulandské modré	1,0036	1,0017
Zweigeltrebe	1,0050	1,0032

Vypočtené hodnoty hustoty jednotlivých vzorků vín, můžeme porovnat s hustotou vody. Hustota vody je rovna 0.99997 g/cm³ [20].

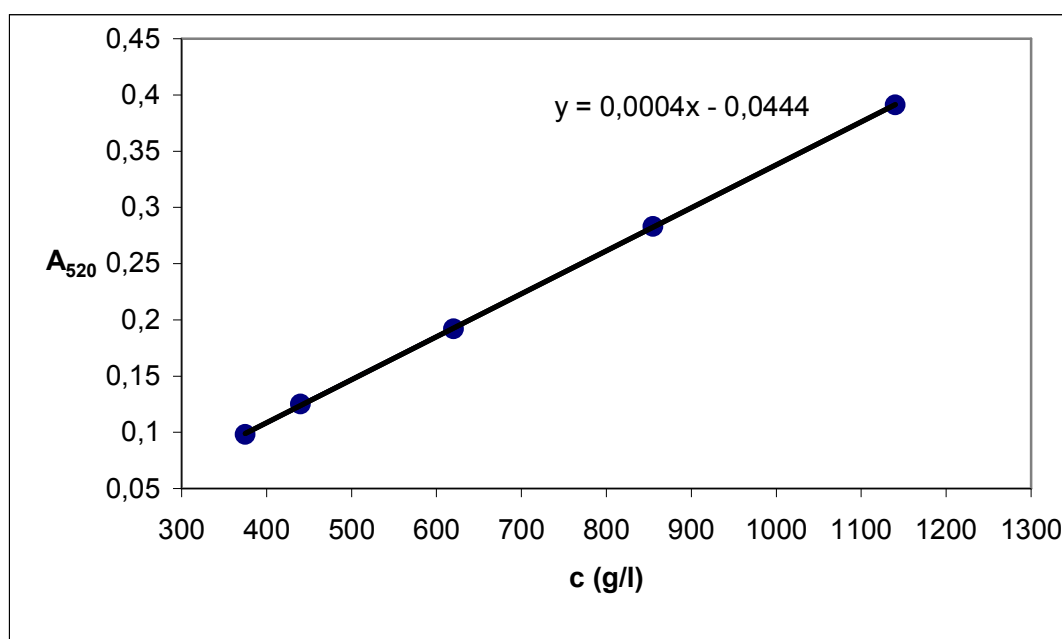
Naměřené hustoty vín mají tedy nepatrně vyšší hustotu, než je hustota vody.

Stanovení barviv v červených vínech

Koncentrace antokyaninových barviv byla stanovena jako koncentrace síranu kobaltnatého, protože anthokyaninová barviva v červených vínech mají maximální absorpční při 520 nm, což je shodné s heptahydrátem síranu kobaltnatého [4]. Z kalibrační křivky pro CoSO₄ · 7 H₂O a rovnice přímky byly vypočteny hodnoty koncentrace vína při absorpční 520 nm.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty absorpance při 520 nm a koncentrace barviv červeném víně vyjádřená, jako koncentrace $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Druh vína	A_{520}	c (g/l)
Směs vín	0,125	440
Dornfelder	0,391	1140
Modrý portugál	0,192	620
Rulandské modré	0,098	375
Zweigeltrebe	0,283	855



Obrázek 5: Kalibrační graf, závislost absorpance na koncentraci $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ při vlnové délce 520 nm.

Hodnoty vína byly vypočteny z kalibrační křivky $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a rovnice přímky. Největší koncentraci vykazovaly odrůdová vína Dornfelder a Zweigeltrebe a nejnižší koncentraci červených barviv, vyjádřených jako koncentrace $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, vykazovalo víno Rulandské modré.

Stanovení anthokyaninů, barevné intenzity a odstínu červených vín:

Anthokyaniny tvoří bezbarvé sloučeniny s bisulfitovým iontem a změna v absorpaci je úměrná koncentraci anthokyaninů. Barevná intenzita je součtem hodnot absorpance červeného vína při vlnových délkách 420, 520 a 620 nm. Barevná intenzita byla vypočtena dle rovnice (6) a barevný odstín analyzovaných vzorků červeného vína byl vypočten dle rovnice (7). Barevný odstín se vyjadřuje jako podíl hodnot absorpance vlnových délek 420 a 520 nm, nebo jako úhel vyjádřený ve stupních, podle rovnice (8). Obsah

anthokyaninů v mg/l byl vypočten dle rovnice (9) a hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Naměřené absorbance čistých vín při 402, 520 a 620 nm.

DRUHY VÍN	A₄₂₀	A₅₂₀	A₆₂₀
Dornfelder	3,799	3,86	2,883
Rulandské modré	2,558	2,8085	0,894
Modrý portugal	3,2985	3,723	1,688
Zweigeltrebe	3,563	3,851	2,159
Směs vín	1,711	2,4695	0,487

Tabulka 9: Naměřené absorbance červených vín při 520 nm s přidavkem HCl.

Druh vína	A₅₂₀
Dornfelder	0,278
Rulandské modré	0,283
Modrý portugal	0,163
Zweigeltrebe	0,208
Směs vín	0,073

Tabulka 10: Naměřené absorbance červených vín při 520 nm s přidavkem K₂S₂O₅.

Druh vína	A₅₂₀
Dornfelder	3,900
Rulandské modré	1,876
Modrý portugal	3,629
Zweigeltrebe	3,839
Směs vín	0,931

Tabulka 11: Vypočtené hodnoty barevné intenzity v 10 mm kyvetě.

Druh vína	I_{10 mm}
Dornfelder	10,542
Rulandské modré	6,261
Modrý portugal	8,710
Zweigeltrebe	9,573
Směs vín	4,668

Tabulka 12: Vypočtené hodnoty barevného odstínu červeného vína.

Druh vína	O	A [°]
Dornfelder	0,984	16,4
Rulandské modré	0,911	3,9
Modrý portugal	0,886	2,2
Zweigeltrebe	0,925	3,4
Směs vín	0,693	1,1

Tabulka 13: Vypočtený obsah anthokyaninů v mg/l.

Druh vína	x
	[mg/l]
Dornfelder	148
Rulandské modré	220
Modrý portugal	42
Zweigeltrebe	80
Směs vín	42

Naměřené barevné intenzity byly vypočteny a zaznamenány do tab. 11, hodnoty barevného odstínu a barevného odstínu vyjádřené ve stupních v tab.12. Celkový obsah anthokyaninů ve vzorcích červeného vína byly uvedeny v tab. 13. Největším obsahem anthokyaninových barviv se vykazovalo červené víno Rulandské modré s obsahem 220 mg/l a víno s nejmenším obsahem těchto barviv byl analyzován Modrý Portugal a Směs vín. U těchto vín byl obsah barviv stanoven na 42 mg/l.

Stanovení trichromatických charakteristik

Barevné vlastnosti vína jsou charakteristickými vlastnostmi X, Y, Z barevného systému CIE. Tyto hodnoty určují barevný odstín, sytost a jas. Barevný odstín byl vypočten dle rovnice (11), sytost barviv dle rovnice (12) a barevný jas dle rovnice (13).

Tabulka 14: Naměřené hodnoty absorpance při vlnových délkách 445, 495, 550 a 625 nm.

Druhy vín	A ₄₄₅	A ₄₉₅	A ₅₅₀	A ₆₂₅
Dornfelder	1,854	2,170	2,041	0,966
Rulandské modré	0,593	0,629	0,526	0,189
Modrý portugal	1,014	1,102	0,988	0,460
Zweigeltrebe	1,195	1,420	1,285	0,461
Směs vín	0,550	0,569	0,467	0,107

Vzorky vín z důvodu vysoké absorpance byly 10krát zředěny.

Transmitance, což je podíl dopadajícího světla ve stanovené vlnové délce, který prochází vzorkem.

Transmitance byla vypočtena podle rovnice (10) a hodnoty jsou zaznamenány v tab.15.

Tabulka 15: Vypočtené hodnoty transmitance v (%) při různých vlnových délkách.

Druh vína	T ₄₄₅	T ₄₉₅	T ₅₅₀	T ₆₂₅
Dornfelder	1,399	0,676	0,910	10,814
Rulandské modré	25,547	23,514	29,808	64,764
Modrý portugal	9,690	7,901	10,288	34,674
Zweigeltrebe	6,388	3,805	5,184	34,594
Směs vín	28,184	26,957	34,093	78,223

Tabulka 16: Vypočtené hodnoty trichromatických složek X, Y, Z v (%).

Druh vína	X	Y	Z
Dornfelder	5,154	2,851	1,477
Rulandské modré	42,998	35,729	29,657
Modrý Portugal	20,199	14,759	11,005
Zweigeltrebe	17,685	10,832	6,917
Směs vín	50,705	41,706	32,962

Výpočtem hodnot X, Y, Z byly stanoveny trichromatické složky, což jsou barevný odstín, sytost barev a barevný jas. Barva vína je důležitým faktorem třídění v řadě norem, které jsou zaměřeny pro zemědělské produkty. Vývoj barvy vizuální kontrolou byl nahrazen objektivními fotometrickými a spektrofotometrickými postupy [21].

Hodnoty X, Y, Z byly dále použity pro stanovení souřadnic CIE x a y, které byly zaznamenány v tab. 16.

Tabulka 17: Vypočtené hodnoty souřadnic CIE x, y.

Druh vína	x	y
Dornfelder	0,544	0,301
Rulandské modré	0,397	0,330
Modrý portugal	0,439	0,321
Zweigeltrebe	0,499	0,306
Směs vín	0,404	0,333

Z trojúhelníkového CIE diagramu byl odečten barevný odstín a sytost barvy.

Odrůdové víno Dornfelder – barva určená souřadnicemi x, y leží v oblasti červené, nejedná se o čistě červenou, ale barva vznikla smísením červené a modré, kde dominantní složkou je červená (viz CIE diagram, obr. 3.). Toto víno má nejsytější barvu, protože výsledný bod leží nejbližší vlnové délce odpovídající červené barvě. Další vína jsou méně jiskrná, nejméně syté byly Rulandské modré a Směs vín [4,19].

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovení anthokyaninových barviv v různých odrůdách červených vín, stanovení anthokyaninů probíhalo spektrofotometrickými metodami. Bylo analyzováno pět druhů různých červených vín (Dornfelder, Rulandské modré, Modrý Portugal a Směs vín). Anthokyaninové barviva se pohybují ve viditelné části spektra a jsou charakteristické širokou škálou barevných odstínů od tmavě modrých a fialových přes červené, růžové a oranžové tóny barev. Koncentrace těchto barviv byla stanovena jako koncentrace síranu kobaltnatého, spektrofotometricky. Největší koncentraci vykazovalo odrůdové víno Dornfelder. Koncentrace vína Dornfelder byla 1140 g/l. Nejnižší koncentraci červených barviv, vyjádřených jako koncentrace $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, vykazovaly vína Rulandské Modré 375 g/l a Směs vín 440 g/l. Barevná intenzita byla stanovena součtem hodnot absorbancí analyzovaných vzorků červených vín, u vína Dornfelder byla barevná intenzita rovna 10,542, Rulandského modrého 6,261 u Modrého Portugalu 8,710 a Zweigeltrebe 9,573 u Směsi červených vín byla vypočtena hodnota barevné intenzity 4,668. Největší barevnou intenzitu vykazovalo víno Dornfelder a nejnižší intenzita byla stanovena u Směsi červených vín. Barevný odstín byl vyjádřen jako podíl hodnot absorbancí, nebo jako úhel vyjádřený ve stupních. Největším počtem anthokyaninových barviv se vykazovalo víno Rulandské Modré s hodnotou 220 mg/l a Dornfelder s hodnotou 148 mg/l, naopak nejnižší hodnotou můžeme prezentovat vína Modrý Portugal a Směs vín s hodnotou 42 mg/l. Dále byly stanoveny trichromatické charakteristiky červených vín, mezi které patří barevný odstín, sytost barev a barevný jas. Vypočtené hodnoty X, Y, Z, což jsou trichromatické složky, byly dále použity pro stanovení souřadnic CIE diagramu. Z CIE diagramu byl odečten barevný odstín a sytost barvy. Barva pro téměř všechny zvolené analyzované vzorky vyšla purpurová, pouze barevný odstín u vína Dornfelder se odlišoval od ostatních analyzovaných vzorků a vyšel v dominantní červené barvě.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KRAUS, V. FOFFOVÁ, Z. VURM, B. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, c2008, 311 s. ISBN 978-80-86767.
- [2] *Vinarius: Složení hroznu* [online]. Copyright vikarius 2013 [cit. 2013-02-11]. Dostupné z: <http://old.vinarius.cz/doc/1097/index.html>.
- [3] MINÁRIK, E. NAVARA, A. *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1986. 547 s.
- [4] BALÍK, J. *Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthokyanin pigments in grapes and wines*. Vyd. 1. Brno: Mendlova univerzita v Brně, 2010, 108 s., ISBN 978-80-7375-412-9.
- [5] FOUGEROUSSE, A., CHASSAING S. BROUILLARD R. *Phytochemistry: Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?* [online]. 2003, 1179–1186 [cit. 2013-03-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942203005181>
- [6] TIMBERLAKE, C. F., *Anthocyanins- occurrence, extraction and chemistry*. (1980), *Food Chemistry*, 5, 69-80.
- [7] HŘEBAČKA, J. *Složení hroznu*. In: *Vinařská stránka* [online]. 2.5.2013 [cit. 2013-02-04]. Dostupné z: <http://vinar.unas.cz/index.html>
- [8] CASTENADA- OVANDO, Araceli, et al. *Chemical studies of anthocyanins: A review*. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, is. 4, p. 859-871
- [9] EDER, R. *Vady vína*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006, 263 s. ISBN 80-903201-6-3.
- [10] WELCH, Cara R., WU, Qingli, SIMON, James E. *Recent advance in anthocyanin analysis and characterization*. *Current Analytical Chemistry*. 2008, vol. 4, is. 2, p. 75-101.
- [11] BERENTE, Bíliny, et al. *Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods*. *Journal of Chromatography*. 2000, vol. 871, is. 1-2, p. 95-103.
- [12] Vican, T. *Odrůdy červených vín*. In: *Vinná galerie* [online]. Copyright 2013 Vinná Galerie. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.vinnagalerie.cz/nabidka-vin/mala-encyklopedie-vina/odrudy-cervenych-vin>.
- [13] *Vinum Bonum: Odrůdy révy vinné v České republice* [online]. Copyright Vinum Bonum 2008 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.vinum-bonum.cz/kategorie/o-vine.aspx>.

- [14] DAVÍDEK, J. a kolektiv. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Vyd. 2. 720 st. Praha: Nakladatelství technologické literatury, ISBN 04-814-81.
- [15] COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS – OIV: *Chromatic Characteristics*. [online]. 2009, s. 10, 2012-08-10 [cit. 2013-04-24]. ISSN OIV-MA-AS2-07B. Dostupné z: <http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>
- [16] Vědeckotechnický park: *UV/VIS spektrofotometr Helios Alpha* [online]. Copyright 2012 VTP UP [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://vtpup.cz/vyzkum-mereni-analyzy/pristroje-na-up.html?action=detail&deviceId=160>.
- [17] REICH, J., VŠETIČKA M. *Barva světla a barva těles*. In: *Encyklopedie fyziky* [online]. Copyright 2006 – 2013 [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/544-barva-svetla-a-barva-telesa>.
- [18] Čuta, F. *INSTRUMENTÁLNÍ analýza*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986, 295 s.
- [19] KALČICOVÁ, A. *Barevné modely*. In: *CIE* [online]. 2011-19-09 [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/kalcicoa/POCPRE/cie.html>.
- [20] KOTLÍK B., LANK V., VONDRA M. a kolektiv. *Matematické, fyzikální a chemické tabulky*. 1. vyd. Fragment, 2011, ISBN 978-80-2531227-8
- [21] JOSLYN, MAYNARD A. *Methods in food analysis: Applied to plant products* [online]. SCIENCE DIRECT: Copyright 1950 academic press inc., s. 219-253 [cit. 2014-04-09]
- [22] BALÍK Josef, Vinařství, *Návody na laboratorní cvičení*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno, 2006

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ČR	Česká republika
A	Absorbance
a	Absorpční koeficient
c	Koncentrace látky
l	Tloušťka kyvety
ϵ	Molární extinkční koeficient
např.	Například
PC	Papírová chromatografie
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie
popř.	Popřípadě
CLC	Kapilární kapalinová chromatografie
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací nebo ionizací elektro-sprejem
$K_2S_2O_5$	Disiřičitan draselný
atd.	A tak dál
KOH	Hydroxid draselný
$CoSO_4 \cdot 7 H_2O$	Hepta hydrát síranu kobaltnatého
KCl	Chlorid draselný
tj.	To jest
HCl	Kyselina chlorovodíková
τ	Transmitance
ϕ	Průměr
CIE	Mezinárodní komise pro osvětlování

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Odrůdová skladba v ČR [12].</i>	17
<i>Obrázek 2: Struktura flaviliového kationu [4].</i>	18
<i>Obrázek 3: Trojúhelníkový CIE diagram [19].</i>	25
<i>Obrázek 4: UV-VIS-spektrofotometr (Helios Alpha)[16].</i>	27
<i>Obrázek 5: Kalibrační graf, závislost absorpce na koncentraci $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ při vlnové délce 520 nm.</i>	34

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Chemické složení jednotlivých částí hroznu v %.</i>	14
<i>Tabulka 2.: Odrůdy červených hroznů pěstovaných v ČR [12,13].</i>	15
<i>Tabulka 3: Chemická struktura vybraných anthokyaninů [4].</i>	18
<i>Tabulka 4: Přehled vybraných anthokyaninů [4].</i>	19
<i>Tabulka 5: Přehled použitých vzorků vín.</i>	28
<i>Tabulka 6: Vypočtené hodnoty hustoty a relativní hustoty zkoušeného vzorku při 20 °C.</i> ...33	
<i>Tabulka 7: Naměřené hodnoty absorpací při 520 nm a koncentrace barviv červeném víně vyjádřená, jako koncentrace $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.</i>	34
<i>Tabulka 8: Naměřené absorpance čistých vín při 402, 520 a 620 nm.</i>	35
<i>Tabulka 9: Naměřené absorpance červených vín při 520 nm s přídavkem HCl.</i>	35
<i>Tabulka 10: Naměřené absorpance červených vín při 520 nm s přídavkem $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$.</i>	35
<i>Tabulka 11: Vypočtené hodnoty barevné intenzity v 10 mm kyvetě.</i>	35
<i>Tabulka 12: Vypočtené hodnoty barevného odstínu červeného vína.</i>	36
<i>Tabulka 13: Vypočtený obsah anthokyaninů v mg/l.</i>	36
<i>Tabulka 14: Naměřené hodnoty absorpací při vlnových délkách 445, 495, 550 a 625 nm.</i> 36	
<i>Tabulka 15: Vypočtené hodnoty transmitance v (%) při různých vlnových délkách.</i>	37
<i>Tabulka 16: Vypočtené hodnoty trichromatických složek X, Y, Z v (%).</i>	37
<i>Tabulka 17: Vypočtené hodnoty souřadnic CIE x, y.</i>	37