

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

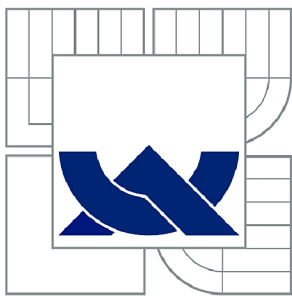
MODERNÍ POSTUPY HODNOCENÍ KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ
POTRAVIN

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

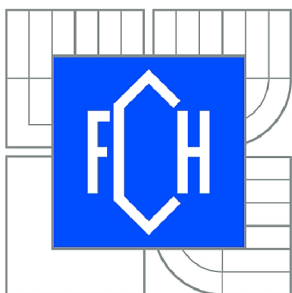
Ing. BLANKA TOBOLKOVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MODERNÍ POSTUPY HODNOCENÍ KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ POTRAVIN

MODERN APPROACHES IN QUALITATIVE ASPECTS OF FOODS ASSESSMENT

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. BLANKA TOBOLKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN POLOVKA, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce: **FCH-DIZ0002/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Ing. Blanka Tobolková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (P2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901V021)
Vedoucí práce **Ing. Martin Polovka, Ph.D.**
Konzultanti:

Název dizertační práce:

Moderní postupy hodnocení kvalitativních parametrů potravin

Zadání dizertační práce:

- Vypracování, resp. adaptace objektivních kritérií na posouzení a hodnocení kvality různých potravin a nápojů resp. výživových doplňků přírodního charakteru, z hlediska jejich antioxidační aktivity.
- Zpracování komplexní studie vlivu produkčních a technologicko-zpracovatelských operací na antioxidační status vybraných potravin resp. obsah tzv. funkčních složek na vlastnosti funkčních potravin.
- Sledování markerů slovenských biovín za účelem jejich autentifikace a vypracování objektivních postupů pro jejich diferenciaci od vín vyráběných klasickými pěstitelsko-zpracovatelskými postupy.
- Komplexní charakterizace antioxidačních vlastností ekologických a konvenčních mouk s cílem diferencovat je podle zvolených kritérií (sezóna, produkční systém, původ, odrůda).
- Studium stability ananasových a pomerančových šťáv v průběhu skladování v závislosti na různých technologických postupech (inovaci v samotném výrobním postupu, aplikace aktivních obalových materiálů s cílem prodloužit trvanlivost výrobku).

Termín odevzdání dizertační práce: 30.9.2013

Dizertační práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Blanka Tobolková
Student(ka)

Ing. Martin Polovka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá studiem antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností a dalších charakteristik vybraných ekologických a konvenčních potravin (vína, špaldové mouky), jako možných markerů vhodných pro jejich jednoznačnou diferenciaci. Část práce je věnována studiu stability vybraných ovocných šťáv v průběhu skladování v závislosti na různých technologických postupech.

V obou případech byla ke studiu stability a antioxidačních vlastností prioritně využita kombinace metod EPR a UV/VIS spektroskopie. Kde to bylo účelné, byla využita také AAS, HPLC a elektroforéza. Statistické metody, zejména metody vícerozměrné statistiky byly aplikovány s cílem komplexně zpracovat všechna experimentální data, a také posoudit vliv produkčních a technologicko-zpracovatelských operací na antioxidační status potravin.

Kvalitativní analýza slovenských a zahraničních biovín a konvenčních vín prokázala, že antioxidační vlastnosti vín jsou ovlivňovány způsobem produkce, ale i ročníkem a odrůdou. Jako nejvhodnější markery využitelné na diferenciaci slovenských vín lze na základě statistické analýzy označit parametry AAE, k_{TEMPOL} a %RS. Úspěšnost diferenciacie biovín a konvenčních vín dosáhla v případě bílých vín 100%, u červených pak 95.2%. S vysokou úspěšností byla také provedena diferenciacie slovenských vín od vín zahraniční produkce.

Sledované parametry špaldových mouk jsou různou měrou ovlivňovány rokem produkce, ale i původem, odrůdou, produkčním systémem a způsobem ošetření pšenice špaldy, i když tento vliv se na základě získaných údajů jeví jako málo významný. Rovněž bylo prokázáno, že druh extrakčního činidla výrazně ovlivňuje složení extraktů, včetně koncentrace polyfenolů a flavonoidů (tzv. funkčních složek). Jako neúčinnější extrahovalo lze označit směs 50% etanol/voda.

I když výsledky jednotlivých spektroskopických analýz odhalily značnou variabilitu a často nejednoznačné rozdíly mezi jednotlivými vzorky vín, resp. mouk, zjištěné rozdíly jsou dostačující pro jejich úspěšnou diferenciaci podle zvolených kritérií.

Součástí práce bylo i studium vlivu změn ve výrobních postupech (aplikace dusíkové atmosféry ve vybraných částech výrobního procesu v kombinaci s využitím uzávěrů na bázi zhášečů kyslíku) na antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti 100% ananasových šťáv s kousky ananasu a 100% pomerančových šťáv s dužinou. Výsledky prokázaly, že antioxidační aktivita šťáv se výrazně mění v závislosti na podmínkách skladování (teplota, doba skladování, světelný režim), ale je ovlivněna i regionálním původem, odrůdou nebo kvalitou použitého ovoce. Z dosažených výsledků vyplývá, že ani aplikace dusíkové atmosféry v kombinaci s aktivními obalovými materiály nemusí být schopná oxidační změny probíhající ve šťávách eliminovat, avšak u takto vyrobených šťáv lze lépe predikovat změny antioxidačních vlastností v průběhu skladování.

Na základě výsledků práce lze konstatovat, že metodu EPR spektroskopie lze využít na rozlišování potravin podle způsobu produkce buď samostatně, nebo v kombinaci s UV/VIS spektroskopií s využitím metod multivariační statistiky. Kombinace těchto metod může být také použita na posouzení stability ovocných šťáv, jako účelné se ukazuje komplexní hodnocení vlastností studovaných vzorků také jinými analytickými metodami.

ABSTRACT

Antioxidant properties and some other characteristics of selected organic and conventional products (wine, spelt flours) were evaluated in view of their potential utilization as markers suitable for food unambiguous differentiation according to the affiliation to production

system. Beside these, study of fruit juices stability during storage in dependence on different technological procedures of juice processing was performed.

In both cases, combination of dominantly EPR and UV/VIS spectroscopy but also other methods (e.g., HPLC, AAS, electrophoresis) was applied to evaluate the stability and antioxidant properties of selected samples. Statistical methods, especially methods of multivariate statistics were used to assess the influence of production and technological-processing operations on antioxidant status of foods and their selected characteristics.

Qualitative analysis of Slovak and foreign organic and conventional wines proved that their antioxidant properties are influenced by production system, vintage and variety. On the basis of statistical analysis, descriptors of AAE, k_{TEMPOL} and %RS were selected as the most powerful markers for Slovak organic and conventional wines discrimination. The discrimination of white and red organic and conventional wines possessed 100% and 95.2% correctness, respectively. High correctness of differentiation of Slovak and foreign wines was also achieved.

Monitored descriptors of antioxidant activity of spelt flours varied in dependence on season, origin, variety, production system and depend also on way of spelt treatment, although this effect is not so significant. It was also confirmed that the type of extraction agent substantially affects the composition of extracts including polyphenols and flavonoids concentration, affecting thus also their antioxidant activity. Mixture of 50% ethanol/water was selected as the most promising extraction system.

Although the results of individual spectroscopic assays revealed high variability and often ambiguous trends, the differences found were sufficient for successful differentiation of both wines and spelt flour samples according to the selected criteria by multivariate statistical processing of the data.

Influence of changes in technological procedures of fruit juice processing (nitrogen atmosphere application, utilization of caps with oxygen scavengers) on radical-scavenging properties of 100% pineapples juices with pieces of pineapple and 100% orange juices with pulp was assessed as well. Results obtained proved that antioxidant activity of juices varied in dependence on storage conditions (temperature, storage time, light exposure) and depends also on origin, variety and quality of fruit used. However, the application of nitrogen atmosphere and active packaging materials is not sufficient enough to eliminate the oxidation reactions in juices, but changes in antioxidant activity are better predictable.

It can be concluded that EPR spectroscopy could be effectively applied for wines and spelt flours differentiation according to the way of production and to assess the stability of food products, either alone or in combination of UV/VIS spectroscopy and the other methods, utilizing multivariate statistics for processing of experimental data.

KLÍČOVÁ SLOVA

Autenticita ekologických a konvenčních potravin, víno, mouky, stabilita ovocných šťáv, antioxidační aktivita, spektroskopické metody

KEY WORDS

Authenticity of organic and conventional foodstuffs, wine, flour, fruit juices stability, antioxidant activity, spectroscopic methods

TOBOLKOVÁ, B. Moderní postupy hodnocení kvalitativních parametrů potravin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 167 s. Vedoucí dizertační práce Ing. Martin Polovka, PhD.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří mi svými návrhy, radami a připomínkami přispěli k vypracování dizertační práce. Zejména děkuji vedoucímu mé práce Ing. Martinu Polovkovi, PhD. za trpělivost, ochotu a snahu mi pomoci nejen při řešení dizertační práce, ale i po celou dobu doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala Ing. Milanu Suhajovi, CSc. za jeho cenné odborné rady a pomoc.

Mé velké díky za ochotu, vstřícný přístup a podporu patří i zaměstnancům Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě a Ústavu chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně.

Nakonec bych chtěla poděkovat také rodičům za důvěru a poskytnuté zázemí a všem blízkým a přátelům za podporu.

OBSAH

1.	ÚVOD	8
2.	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	10
2.1	Autenticita ekologických produktů	10
2.1.1	Legislativa a certifikace ekologických potravin.....	10
2.1.2	Ekologická produkce vína.....	11
2.1.2.1	Výroba biovína.....	12
2.1.2.2	Biovíno vs. konvenční víno.....	13
2.1.3	Ekologická produkce obilnin.....	15
2.1.3.1	Pšenice špalda v ekologickém zemědělství.....	15
2.1.3.2	Ekologické vs. konvenční obilniny.....	16
2.2	Stabilita ovocných šťáv (džusů)	17
2.2.1	Balení ovocných šťáv.....	17
2.2.2	Studium stability ovocných šťáv	18
3.	POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ TECHNIKY.....	19
3.1	Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)	19
3.1.1	Základní princip EPR	19
3.1.2	Charakteristika spinových systémů	21
3.1.3	EPR spektroskopie v kapalně fázi.....	23
3.1.4	Spinové značky a spinové lapače.....	23
3.1.4.1	Spinové značky.....	23
3.1.4.2	Spinové lapače	26
3.2	UV-VIS-NIR spektroskopie.....	27
3.2.1	Základní princip UV-VIS-NIR.....	27
3.3	Metody studia antioxidačních vlastností potravin	30
3.4	Další experimentální techniky využití na charakterizaci vzorků.....	33
4.	CÍLE PRÁCE.....	34
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
5.1	Materiál	35
5.1.1	Vzorky biovín a konvenčních vín	35
5.1.2	Vzorky mouk.....	37
5.1.2.1	Příprava extraktů špaldových mouk:	39
5.1.3	Vzorky ovocných šťáv	39
5.1.3.1	Příprava ovocné šťávy	40
5.2	Laboratorní vybavení	40
5.2.1	Pomůcky	40
5.2.2	Chemikálie.....	40
5.2.3	Přístroje	41
5.3	Metody	41
5.3.1	UV/VIS experimenty	41
5.3.1.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC).....	41
5.3.1.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů (TFC)	42
5.3.1.3	Stanovení oxidačních produktů (TBARS).....	43
5.3.1.4	Stanovení schopnosti vzorků redukovat železo (FRP).....	43
5.3.1.5	Stanovení ABTS ^{•+} /DPPH radikál-zhášející aktivity	43
5.3.2	EPR experimenty	43
5.3.2.1	Monitorování radikál-zhášející aktivity	43
5.3.2.2	Technika spinových lapačů v přítomnosti DMPO/K ₂ S ₂ O ₈	44
5.3.2.3	Podmínky EPR měření	44
5.3.2.4	Zpracování experimentálních dat	45
5.3.3	Statistické zpracování dat	47
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	48

6.1	Komplexní studium antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností biovín a konvenčních vín	48
6.1.1	UV/VIS experimenty	48
6.1.1.1	<i>Obsah polyfenolických látek ve vzorcích biovín a konvenčních vín</i>	<i>48</i>
6.1.1.2	<i>Tvorba oxidačních produktů a schopnost vín redukovat železité ionty</i>	<i>51</i>
6.1.1.3	<i>ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivita vín</i>	<i>52</i>
6.1.2	EPR experimenty	53
6.1.2.1	<i>ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivita vín</i>	<i>53</i>
6.1.2.2	<i>Radikál-zhášející aktivita vín oproti radikálu TEMPOL</i>	<i>57</i>
6.1.2.3	<i>Antioxidační aktivita oproti [•]OH radikálům v přítomnosti DMPO.....</i>	<i>59</i>
6.1.3	Statistické zpracování experimentálních dat	62
6.1.3.1	<i>Statisticky významné deskriptory antioxidační aktivity pro komparaci slovenských biovín a konvenčních vín – jednorozměrná analýza</i>	<i>64</i>
6.1.3.2	<i>Diskriminace slovenských ekologických a konvenčních vín s využitím deskriptorů antioxidační aktivity – vícerozměrná analýza.....</i>	<i>65</i>
6.2	Studium antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností ekologických a konvenčních špaldových mouk.....	69
6.2.1	Vliv extrakčních podmínek na antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti ekologických a konvenčních mouk.....	69
6.2.1.1	UV/VIS experimenty.....	70
6.2.1.2	EPR experimenty	72
6.2.1.3	Statistické zpracování výsledků	74
6.2.2	Charakterizace antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností ekologických a konvenčních špaldových mouk z polních pokusů	76
6.2.2.1	<i>Obsah polyfenolů a flavonoidů ve vzorcích špaldových mouk.....</i>	<i>76</i>
6.2.2.2	<i>ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivity špaldových mouk charakterizovaná pomocí UV/VIS spektroskopie</i>	<i>78</i>
6.2.2.3	<i>ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivity špaldových mouk charakterizovaná pomocí EPR spektroskopie.....</i>	<i>80</i>
6.2.2.4	<i>Statistické zpracování dat</i>	<i>84</i>
6.3	Studium stability ovocných šťáv	90
6.3.1	Vliv teploty a světelných podmínek na vybrané parametry ovocných šťáv.....	90
6.3.2	Vliv modifikovaných výrobních podmínek na vybrané parametry ovocných šťáv	90
6.3.2.1	<i>Stabilita 100% šťávy z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu</i>	<i>91</i>
6.3.2.2	<i>Stabilita 100% šťávy z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou</i>	<i>97</i>
7.	ZÁVĚRY	105
8.	LITERATURA.....	109
9.	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....	120
10.	SEZNAM PŘÍLOH	121
11.	PŘÍLOHY.....	122

1. ÚVOD

Bezpečnost a kvalita potravin je jednou z hlavních priorit evropského výzkumu, jehož hlavním cílem je snaha o maximální ochranu spotřebitele před potencionálním rizikem plynoucím z konzumace potravin. Rostoucí požadavky spotřebitelů po zdravých, výživných a pestrých potravinách vedou k neustálým inovacím potravinářských technologií a k vývoji nových technologických postupů s důrazem na kvalitu, bezpečnost a atraktivitu potravinářských výrobků. S tím je spojený i rozvoj ekologického zemědělství a zvyšující se poptávka po ekologických potravinách. Nezanedbatelný význam při hodnocení bezpečnosti potravin má také rozvoj progresivních analytických metod stanovení původu potravin a jejich druhové a geografické autenticity. Hodnocení autenticity a originality potravin je společným atributem jak pro konvenční potraviny, tak i pro potraviny získané ekologickými výrobními postupy.

Jedním z hlavních témat spojených s kvalitou potravin, bez ohledu na to, zda byly produkovány konvenčními anebo ekologickými postupy, jsou jejich antioxidační vlastnosti. Všeobecně se doporučuje konzumace potravin bohatých na vitaminy, flavonoidy a jiné zdraví prospěšné látky, které jsou ve své podstatě antioxidanty a fungují jako lapače volných radikálů. Mnohé studie potvrzují, že řada nežádoucích procesů v potravinách a nápojích (např. oxidace způsobující kažení potravin a zkracování jejich trvanlivosti) probíhá radikálovým mechanismem a antioxidanty, jako přirozené složky potravin, pomáhají eliminovat anebo zpomalovat tyto procesy. Z toho důvodu se antioxidační aktivitě, jako jednomu z možných parametrů k hodnocení stability a autenticity potravin, věnuje stále větší pozornost.

Ke zjišťování kvalitativních parametrů a autenticity potravin se používá široká škála metod od těch nejjednodušších (senzorické hodnocení) až po složité instrumentální metody vyžadující nejmodernější přístroje (chromatografické a separační techniky, biochemické, molekulárně biochemické metody, apod). Při studiu antioxidačních vlastností a procesů oxidačního poškození potravin probíhajících radikálovým mechanismem se efektivně využívají spektroskopické metody.

Předkládaná dizertační práce sumarizuje parciální výsledky projektů zaměřených na studium kvality a autenticity potravin realizovaných na pracovišti Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě. Tématicky je práce rozdělena na dvě části.

První část se zabývá posouzením antioxidačních vlastností a dalších spektrálních charakteristik vybraných potravin, získaných ekologickými a konvenčními pěstitelskými a výrobními postupy (vína, špaldová mouka), jako možných markerů vhodných pro jejich jednoznačnou diferenciaci. Druhá část se zabývá sledováním stability různých druhů ovocných šťáv v průběhu skladování v závislosti na různých technologických postupech (inovaci v samotném výrobním postupu, aplikace aktivních obalových materiálů s cílem prodloužit trvanlivost výrobku). V obou případech byla ke studiu stability a antioxidačních vlastností využita jako nosná kombinace metod EPR a UV/VIS spektroskopie.

Práce vznikla na pracovištích Oddělení chemie a analýzy potravin VÚP v rámci řešení projektů:

- č. 2/PVV „*Sledovanie georeferenčných a environmentálnych markerov slovenských biovín s cieľom ich autentifikácie a vypracovanie postupov pre ich odlišenie od vín vyrábaných klasickými postupmi*“;

- CEX I (*Vybudovanie „HiTech“ centra pre výskum vzniku, elimináciu a hodnotenie prítomnosti kontaminantov v potravinách – ITMS 26240120013*);
- CEXII (*Centrum excelentnosti pre kontaminujúce látky a mikroorganizmy v potravinách – ITMS 2624010024*),
- CEXIII (*Stratégia eliminácie akrylamidu v technologickom procese výroby potravín – ITMS 26240220050*),
- HUSK (HUSK – 0901/1.2.1/0010 *„Využitie regionálnych zdrojov na produkciu funkčných potravín“*), McCarter (*Zlepšenie výživových a senzorických parametrov ovocných a zeleninových nápojov aplikáciou inertných plynov – ITMS 26220220175*),

ale i úloh v rámci projektu mezinárodní vědecko-technické spolupráce SK-CZ (SK-CZ-0161-11 *„Izolácia a charakterizácia prírodných antioxidantov zo špaldových a pohánkových múk s potenciálnym využitím pri príprave funkčných potravín“*).

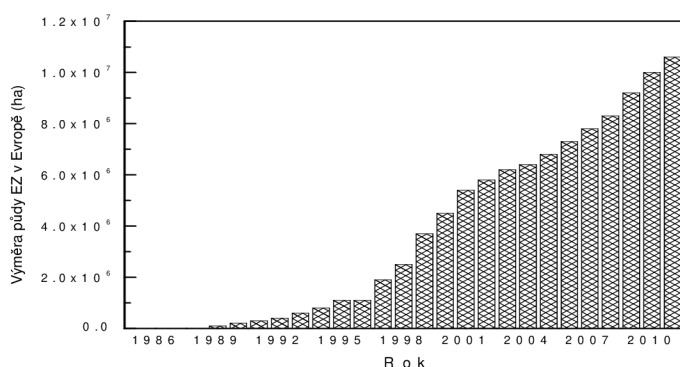
2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Určování autenticity a stability potravin představuje důležitý problém v procesu kontroly kvality a bezpečnosti potravin nejen výrobků získaných konvenčními, ale i ekologickými výrobními postupy. Vývoj nových sofistikovaných technik, ve spojení s většími nároky konzumentů, dává velmi silný impuls právě v oblasti kontroly potravin.

Rozvoj ekologického zemědělství (EZ) v posledních desetiletích a zvyšující se preference konzumentů biopotravin vedl ke vzniku oprávněných požadavků kontroly kvality a autenticity těchto potravin. Doposud však neexistují validované metody vhodné na autentifikaci ekologických výrobků a hledají se znaky – markery indikující příslušnost potravin k uvedeným produkčním systémům.

2.1 Autenticita ekologických produktů

Během posledních 20 let došlo k výraznému rozvoji ekologického zemědělství (Obr. 1), které v současnosti představuje uznávanou alternativu k intenzivnímu (konvenčnímu) zemědělství, a to jak v Evropě, tak i celosvětově. Ze statistických údajů zpracovaných organizacemi FiBL (*Research Institute of Organic Agriculture*) a IFOAM (*International Federation of Organic Agriculture Movement*) vyplývá, že na konci roku 2011 představovala rozloha ekologicky obhospodařované půdy v Evropě 10.6 milionů ha, což odpovídá asi 2.2 % celkové zemědělské půdy. Největšími ekologickými producenty jsou přitom Španělsko, Itálie, Německo a Francie. Celosvětově nejvíce pěstovanými ekologickými produkty jsou obilniny, káva, olivy, olejniny, ořechy, hrozny a různé druhy zeleniny a ovoce [1-3].



Obr. 1: Vývoj ekologického zemědělství v Evropě v letech 1985-2011 [4].

Ekologické zemědělství přispívá k ochraně životního prostředí a jeho jednotlivých složek tím, že stanovuje omezení či zákazy používání látek a postupů, které ho zatěžují nebo zvyšují rizika kontaminace potravinového řetězce jako je tomu u zemědělství konvenčního, jehož hlavním cílem je výnos a ekonomická rentabilita. K ochraně rostlin se v konvenčním zemědělství používá celé spektrum pesticidů, které zahrnuje vysoce účinné insekticidy proti škůdcům, herbicidy na hubení plevelů a fungicidy proti houbovým chorobám [4, 5], zatímco v EZ je preferováno využití jiných prostředků biologické ochrany, v omezeném množství některé přípravky na bázi elementární Cu nebo S [2, 3].

2.1.1 Legislativa a certifikace ekologických potravin

Pro zajištění bezpečnosti všech potravin, konvenčních i biopotravin, je kontrolován celý výrobní proces, od půdy a osiv, přes hnojiva, krmiva, kontrolu chovů hospodářských zvířat,

zpracování a prodej potravin živočišného původu, až po zpracování a prodej rostlinné produkce. Při výrobě biopotravin jsou aplikována mnohem přísnější pravidla než je tomu u konvenčních potravin [6].

Ekologické zemědělství, produkce a zpracování potravin je podřízeno normám a zásadám, které jsou závazné pro všechny zemědělce a zpracovatele biopotravin. Jejich zařazení do systému EZ jim přináší možnost využívat označení „BIO“, „EKO“ nebo „ORGANIC“. Kontrolou EZ jsou pověřeny organizace, které kontrolují plnění a dodržování pravidel a směrnic EZ, zakotvených v legislativě Evropské unie (EU) i národních předpisech [6]. Základními právními předpisy pro ekologické zemědělství v EU jsou:

- Nařízení Rady (ES) č. 834/2007 o ekologické produkci a označování ekologických produktů, v platném znění – stanovuje právní rámec pro všechny úrovně výroby, distribuce, kontroly a označování ekologických produktů, které mohou být nabízeny a s nimiž je možné obchodovat v EU [2].
- Nařízení Komise (ES) č. 889/2008, v platném znění - stanovující pravidla pro produkci, označování a kontrolu ekologických produktů, ve kterých jsou upraveny všechny úrovně rostlinné a živočišné výrobce počínaje obděláváním půdy a chovem zvířat až po zpracování a distribuci ekologických potravin a jejich kontrolu. Přílohy k nařízení Komise zahrnují např. výrobky povolené v EZ (hnojiva, půdní činidla), neekologické složky, seznam povolených postupů, materiálů a přídavných látek při zpracování a skladování biopotravin, stejně jako požadavky na logo Společenství (Obr. 2) [3].



Obr. 2: Logo EU pro ekologickou produkci [7].

Dalšími významnými předpisy EZ jsou směrnice IFOAM (tzv. *basic standards*), které musí být včleněny do soukromých směrnic certifikačních organizací jednotlivých států, poskytující rámec pro certifikační orgány či standardizační organizace pro vytvoření jejich vlastních certifikačních norem. Jsou-li výrobky prodávané na trhu označené logem EZ, pak výrobce i zpracovatel musí pracovat pod dohledem certifikačních orgánů a musí být certifikováni těmito orgány podle norem, které splňují základní normy IFOAM [8]. V ČR vykonávají certifikační a kontrolní činnost společnosti KEZ, o.p.s., ABCERT, GmbH a Biokont CZm s.r.o. [6, 9]. V SR vykonává přímou kontrolu výrobců a zpracovatelů evidovaných v systému EZ organizace NATURALIS SK [10].

2.1.2 Ekologická produkce vína

Jeden z nejvíce rozšiřujících se sektorů ekologického zemědělství představuje ekologické vinařství. Na konci roku 2011 se v Evropě nacházelo více než 260 000 ekologických vinohradů, což představuje asi 3.7 % celkové výměry evropských vinohradů, přičemž největšími evropskými producenty jsou Španělsko, Francie a Itálie [1].

Ekologická produkce hroznů a s tím spojená výroba biovína vychází ze směrnic č. 834/2007 a č. 889/2009. Nicméně v legislativě neexistovala definice biovína, na etiketě bylo možné pouze označení „víno vyrobené z ekologických hroznů“. V roce 2012 však vešlo v platnost nové Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 203/2012 o ekologické produkci vína [11].

Toto nařízení stanovuje, že biovíno lze vyrábět výlučně z certifikovaných, ekologicky vyprodukovaných hroznů na základě směrnice č. 834/2007. Zpracování hroznů musí probíhat bez použití šlechtěných kvasinek, enzymů a dalších syntetických čířících a stabilizačních látek. Výsledkem má být přírodní víno bez syntetických reziduí, jehož výroba proběhla od začátku do konce s maximálním ohledem na životní prostředí.

V prováděcím nařízení Komise (EU) č. 203/2012 jsou uvedeny seznamy povolených postupů a látek pokrývajících celý proces výroby biovína, enologických postupů a ošetření povolených za specifických podmínek, a stejně tak i postupy při výrobě biovína zakázané. Je zde rovněž stanoven maximální obsah siřičitanů v biovině (Tab. 1), který musí být nejméně o 30-50 mg.l⁻¹ nižší než u konvenčních vín, přičemž je povolena určitá odchylka (pružnost) v závislosti na typu vína a klimatických oblastech severní a střední Evropy. Tato odchylka je 30 mg.l⁻¹, jestliže obsah zbytkového cukru je vyšší než 2 g.l⁻¹ [11, 12].

Tab. 1: Porovnání obsahu SO₂ v organických a konvenčních vínech [11-13].

Typ vína	Organické víno [mg.l ⁻¹]	Konvenčních víno [mg.l ⁻¹]
červené víno	100	150
bílé víno	150	200
růžové víno	150	200

2.1.2.1 Výroba biovína

V roce 2009 byl vydán *Code of good organic viticulture*, jako součást projektu ORWINE probíhajícího v rámci EU v letech 2002 – 2006, v kterém jsou uvedeny zásady ekologického vinohradnictví a vinařství. Hlavní zásady uvedené v Kodexu, které by měly být dodržovány při ekologickém pěstování révy vinné a následné výrobě biovína lze shrnout [14, 15]:

- doporučeny jsou interspecifické odrůdy révy vinné odolnější vůči houbovým chorobám;
- výživa vinice je založena na přirozené úrodnosti půdy; ozelenění zlepšuje půdní strukturu, zabezpečuje živiny pro půdní mikroorganismy i růst révy; v případě nedostatečného zásobování půdy a révy živinami lze použít certifikovaná organická hnojiva;
- ochranu proti plevelům představuje mechanická a manuální kultivace, nebo výsev málo vzrůstových druhů bylin; proti plísním a chorobám se používají povolené přípravky na bázi síry a mědi (Cu max. 3 kg/rok); proti škůdcům lze využít antagonisty škodlivých organismů (např. dravý roztoč *Typhlodromus pyri*, který napadá svlušky a vlníkovce);
- v každé fázi výroby biovína je třeba eliminovat oxidaci aromatických látek a mikrobiální znečištění moštu (limitovaný přístup kyslíku, nízká teplota, v případě mikrobiálního znečištění pečlivá hygiena);
- při sklizni je upřednostňována ruční sklizeň, která umožňuje i třídění hroznů a odstranění listů;
- ihned po přijetí hrozny zpracovat na hroznovou drť (rmut), rmut bílých vín se nechá naležet 5-10 hodin (umožňuje vyluhování odrůdově typických aromatických látek, sacharidů, minerálních látek a rostlinných sterolů), doba macerace závisí na vyzrálosti hroznů a teplotě rmutu; při výrobě červeného vína se musí hrozny nechat fermentovat (doba nakvásaení bývá 8-10 dní a řídí se vyzrálostí hroznů);
- lisování slouží k oddělení moštu od pevných částí; nejčastěji se používají pneumatické lisy (bílé hrozny se lisují cca po 10 hodinách ležení bez přístupu

vzduchu, zatímco hrozny modrých odrůd až po nakvácení), mošt pro bílá vína je nutné před zahájením kvasného procesu odkalit, čímž se odstraní mechanické nečistoty (zákaly);

- při kvašení je zakázáno používat geneticky modifikované kvasinky, ale v moštu se nechají vyvinout přírodní kvasinky, které při kvašení převládají, nebo je mošt naočkován vlastními selektovanými kvasinkami;
- po skončení kvašení následuje stáčení mladého vína, přičemž se dbá, aby nedošlo k nadměrnému kontaktu vína se vzduchem (ztrátě kvality vína brání skladování při nízkých teplotách, úplné naplnění sudů a nádob a naplnění stropu nádoby inertním plynem, příp. aplikace SO₂);
- na konci zrání je poslední možnost ošetření vína k zajištění vyčištění a stabilizování vzájemného poměru složek vína tak, aby se v lahvách netvořily zákaly, čiření se využívá k zajištění čistoty a čirosti vína a k urychlení sedimentace pevných částic rozptýlených ve víně, nejčastěji se používá bentonit;
- filtrace a lahvování jsou finálními kroky výroby vín. Při lahvování biovína jsou kladeny největší nároky na hygienické podmínky a zabezpečení absolutní mikrobiální čistoty lahví, zátek a celého místa lahvování.

2.1.2.2 Biovíno vs. konvenční víno

V souvislosti s rozvojem ekologického zemědělství a většímu zastoupení bioproduktů na trhu s potravinami, se řada vědeckých studií zaměřuje právě na komparaci ekologických a konvenčních plodin a produktů, a to z různých aspektů.

Studie biovín a konvenčních vín se nejčastěji zaměřují na jejich porovnání z hlediska obsahu polyfenolických látek, tj. sekundárních metabolitů rostlin, kterým jsou připisovány různé protektivní účinky na lidský organismus [16-19]. Zastoupení a množství jednotlivých polyfenolických látek v hroznech, a tedy i víně, je ovlivňováno jak odrůdovými rozdíly, zralostí hroznových bobulí, geografickým původem, tak i podmínkami pěstování a odlišnými přístupy v procesu výroby vína [16, 20, 21].

Přestože se řada studií zabývá sledováním faktorů, které ovlivňují zastoupení polyfenolických látek v hroznech, pouze některé z nich byly zaměřeny na posouzení vlivu ekologických a konvenčních pěstitelských a enologických postupů na zastoupení polyfenolických látek, a s tím spojenou antioxidační aktivitu hroznů a vín. Většina těchto studií prokázala, že jak ekologické hrozny, tak i biovína byly charakterizovány vyšší antioxidační aktivitou a vyšším obsahem polyfenolů než jejich konvenční analogy [22-28], přičemž tyto dva parametry navzájem velice dobře korelovaly [25, 26, 29, 30]. V biovíněch byly zjištěny vyšší koncentrace *trans*-resveratrolu, kvercetinu a katechinu [24, 26, 31], kondenzovaných taninů [24], dále pak hydroxybenzoových (kyselina gallová) a hydroxycinamových kyselin (kyselina chlorogenová, kávová, kumarová, ferulová) [24-26], ale i kyseliny askorbové [23]. Někteří autoři rovněž poukázali na vyšší obsah anthokyanů v ekologických vínech, především malvidin-3-glukosidu [23, 25]. Vyšší obsah polyfenolických látek v rostlinných materiálech je obecně připisován absenci syntetických pesticidů a hnojiv v ekologickém zemědělství, což má za následek vyšší expozici stresovým situacím a tím i vyšší produkci sekundárním metabolitů jako součást obranného mechanismu [19, 32, 33]. Přesto některé studie poukázaly na to, že hrozny pěstované konvenčními postupy, a tedy i klasicky vyráběná vína, byly charakterizovány vyšším obsahem celkových polyfenolů a vyšší antioxidační aktivitou, nebo byly rozdíly mezi konvenčními víny a biovín

nejednoznačné, převážně ovlivňované odrůdovou skladbou, zralostí hroznů nebo rokem sběru [23, 25, 27, 31, 34-37]. Mulero *et. al.* stanovili v biohroznech obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu vyšší měsíc před vinobraním, avšak tyto rozdíly během vinobraní zanikly. V biovínech zjistili mírně zvýšený obsah polyfenolů, přičemž jejich obsah se výrazně neměnil v průběhu skladování [25]. Corrales *et. al.* stanovili vyšší koncentrace prokyanidinu B1, epikatechinu a katechinu v konvenčních extraktech hroznových slupek, ale vyšší obsah kvercetinů a kaempferolu v extraktech slupek z biohroznů [36]. Podle studie autorů Vian *et. al.* hrozny pěstované v režimu konvenčního zemědělství byly charakterizovány jednoznačně vyšším obsahem anthokyanů, zejména delfinidinu, petunidinu a malvidinu [38]. Mimoto, v ekologických a konvenčních vínech byly zjištěny nejednoznačné rozdíly i v obsahu některých karotenoidů, především β -karotenu a luteinu [22].

Co se týče porovnání chemického složení vín, nejednoznačné rozdíly se ukázaly především v obsahu alkoholu, pH, celkové kyselosti nebo obsahu těkavých kyselin [25, 29, 37, 39, 40]. Ekologická vína však obsahovala nižší koncentrace celkového SO_2 v porovnání s konvenčními víny [31, 40], přičemž koncentrace SO_2 ve studovaných biovínech nepřekročila povolené limity dané evropskou legislativou [40].

Většina faktorů ovlivňujících obsah polyfenolických látek v hroznech a vínech, především ale způsob kultivace hroznů, použití hnojiv a prostředků na ochranu rostlin, může rovněž způsobit odlišnosti v zastoupení minerálních a stopových prvků v uvedených komoditách. Komparaci biovín a konvenčních vín z tohoto hlediska je věnováno pouze několik prací, přičemž vyšší koncentrace Na, K a P, v některých případech i Ca, Fe a Cu byly zjištěny ve vínech z ekologických hroznů [26, 28, 41, 42].

V souvislosti se zákazem používání syntetických pesticidů v ekologickém zemědělství, se některé práce zaměřily i na porovnání biovín a konvenčních vín na základě obsahu reziduí pesticidů. Tyto studie potvrdily rezidua pesticidů především v konvenčních vínech [43], ale i stopová množství diuronu, metalaxylu, carbendazinu a tebuconazolu v ekologických vínech [36, 44]. Podle některých studií obsahovala biovína vyšší koncentrace biogenních aminů, ale i porovnatelné koncentrace s víny konvenčními, přičemž nejčastěji zastoupenými biogenními aminy byly putrescin, histamin, kadaverin a etylamin [34, 45-48].

V souvislosti se způsobem ekologického pěstování hroznů (hrozny bez fungicidní ochrany) lze v biovínech očekávat zvýšené koncentrace ochratoxinu A (OTA), především u vín přívlastkových a červených vín s delším časem extrakce barviv ze slupek hroznů do moštu, čímž se zvyšuje riziko kontaminace vína ochratoxinem. Naproti tomu, tvorba mykotoxinů je redukována nižším obsahem dusíku ve výživě révy vinné a vyšším obsahem polyfenolů v biohroznech [49]. Zatímco v komparační studii autorů Micelli *et. al.* byl zjištěný třikrát vyšší obsah OTA v konvenčních vínech [49], Comuzzo *et. al.* a Remiro *et. al.* zjistily v obou typech vín porovnatelné koncentrace OTA [40, 50].

Vzhledem k širokému množství metod používaných ve zmiňovaných studiích zaměřených na charakterizaci a klasifikaci vín z různých hledisek, získaná experimentální data představují komplexní soubor proměnných. Z toho důvodu se pro komplexní zhodnocení využily metody multivariační statistiky s cílem identifikovat a klasifikovat hrozny a vína nejen podle odrůdy a geografického původu, ale i z hlediska produkčního systému. Tintunen a Lehtonen se na základě výsledků stanovení polyfenolických látek, ve spojení s dalšími enologickými charakteristikami (např. pH, celkové kyseliny, obsah SO_2) pokusily, avšak neúspěšně, diferencovat francouzská a německá biovína a konvenční vína statickou metodou hlavních komponent [31]. Naproti tomu, metody AAS, ICP a spektroskopie ve střední IČ oblasti

v kombinaci s metodami multivariační statistiky byly úspěšně využity při diferenciaci ekologicky a konvenčně produkovaných vín [26, 39, 41, 42].

2.1.3 Ekologická produkce obilnin

Ekologická produkce obilnin, s více než 2.5 miliony ha, představuje nejrozšířenější sektor ekologického zemědělství. Úspěch při pěstování jednotlivých druhů obilnin do značné míry závisí na obecném dodržování hlavních zásad rostlinné produkce v ekologickém zemědělství daném legislativou [2, 3, 51]. Hlavní zásadou při výběru druhů a odrůd je určení vhodnosti plodiny pro dané stanoviště. Stejně tak i důkladná znalost požadavků jednotlivých rostlinných druhů na prostředí, ale i vlastností (ranost, rychlost růstu, odolnost proti chorobám, škůdcům, konkurence proti plevelům) je nezbytnou podmínkou pro výběr druhu a odrůdy [51].

Největšími evropskými producenty ekologicky pěstovaných obilnin jsou Německo, Itálie a Španělsko, přičemž nejčastěji pěstovanými obilninami jsou pšenice setá, pšenice špalda, ječmen a oves [1]. Pšenice špalda je vzhledem ke značné odolnosti proti škůdcům, chorobám a nepříznivým klimatickým podmínkám vhodnou a často využívanou plodinou v ekologickém zemědělství [52].

Obiloviny jsou, kromě zdroje energie, bohatým zdrojem řady biologicky aktivních látek. Z toho důvodu se obiloviny nebo jejich složky využívají při výrobě tzv. funkčních potravin. Potravina může být označena jako funkční, pokud je dostatečně prokázáno, že kromě běžné výživové hodnoty příznivě ovlivňuje jednu či více cílových funkcí organismu, a to tak, že buď zlepšuje zdravotní stav anebo snižuje riziko nemocí. Musí zůstat potravinou a její příznivý účinek se musí projevit při konzumaci obvyklých množství daného typu potravin [53].

2.1.3.1 Pšenice špalda v ekologickém zemědělství

Pšenice špalda (*Triticum spelta* L.) vznikla sekundárně z pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) ve vyšších nadmořských výškách. Je to hexaploidní pluchatá pšenice se 42 chromozómy [51, 52, 54, 55]. Z výživového hlediska je špalda známá vysokou nutriční hodnotou, lehkou stravitelností a typickou oříškovou chutí. Od pšenice seté se odlišuje vyšším obsahem bílkovin (15.6 %, resp. 14.9 %), vyšším obsahem tuků (2.5 %, resp. 2.1 %), nižším obsahem nerozpustné vlákniny (9.3 %, resp. 11.2 %) a nižším obsahem celkové vlákniny (10.9 %, resp. 14.9 %). Rozdíly v obsahu škrobu a sacharidů rozpustné vlákniny jsou nevýznamné [55]. Z minerálních látek je významný obsah Ca, K, Fe, Zn, Mg a P [52, 56]. Špalda je bohatým zdrojem vitaminů skupiny B, především thiaminu, riboflavinu, ale i niacinu [52].

Pěstování špaldy se rozšiřuje především v Německu, Švýcarsku, Rakousku, České republice nebo v Maďarsku [57, 58]. Na stránkách *Directorate General for Health & Consumers EU* jsou uvedeny jednotlivé odrůdy špaldy registrované v jednotlivých státech EU. V ČR je jedinou registrovanou odrůdou *Rubiota*, v Maďarsku pak *Lajta* a *Öko-10*, zatímco na Slovensku není doposud registrována žádná odrůda špaldy [59].

Předností špaldy je celková vhodnost pro ekologické zemědělství. Vzhledem ke své nenáročnosti snese špalda i půdy hůře připravené, vhodnější jsou však půdy ulehle, mělce zpracované. Je méně náročná na podmínky prostředí (dobře snáší i extrémní vlhkostní podmínky, má nízké nároky na teplotu) než pšenice setá [51, 52].

Pšenice špalda je charakteristická mohutnou kořenovou soustavou umožňujících získat živiny z hlubších vrstev půdy. Oproti pšenici seté má špalda pomalejší počáteční růst i vývoj. Vzhledem k vyššímu vzrůstu má dobrou konkurenceschopnost vůči plevelům, nicméně

v případě špatného přezimování porostu je u ozimých špald riziko zaplevelení vyšší. Z přímých zásahů se běžně používá k regulaci zaplevelení vláčení [51, 52].

Přestože je špalda napadána stejnými škůdci jako pšenice setá, je celkově odolnější. Mezi nejrozšířenější choroby špaldy patří pat stébel (*Gaeumennomyces graminis*) a padlí travní (*Erysiphe graminis*). V rámci povolených pravidel ochrany rostlin v EZ není nutné provádět žádné přímé zásahy proti chorobám a škůdcům. Vzhledem k vysoké odolnosti pšenice špaldy plně postačuje dodržování zásad správné zemědělské praxe (střídání plodin, nepřehnojení porostu, apod.) [51, 52].

2.1.3.2 Ekologické vs. konvenční obilniny

Vzhledem k tomu, že ekologická produkce obilnin představuje nejrozšířenější sektor ekologického zemědělství, řada studií se zaměřuje i na porovnávání ekologicky a konvenčně pěstovaných obilnin. Studie se převážně zaměřují na vzájemnou komparaci různých druhů ekologických obilnin (pšenice, špalda, ječmen), příp. porovnání ekologicky a konvenčně pěstované pšenice a ječmene, zatímco špaldě se doposud nevěnovala řádná pozornost.

Většina studií porovnávající ekologické a konvenční obilniny je zaměřena především na jejich porovnání z hlediska obsahu mykotoxinů, např. ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON), zearalenol (ZEA) atd. Tyto studie ve většině případů potvrdily statisticky nevýznamné rozdíly mezi obilninami a cereálními výrobky vyprodukovaných různými pěstitelskými postupy, ale i statisticky významný sezónní a regionální vliv na sledované parametry [60-63]. Autoři Solarska *et. al.* ve své studii potvrdili v ekologické špaldě a z ní připravených výrobcích přítomnost všech studovaných mykotoxinů kromě aflatoxinů, přičemž v obilné zrně byly přítomny DON a T-2 toxin, zatímco ve špaldových výrobcích DON, ZEA a OTA. Deoxynivalenol byl nejčastěji vyskytujícím se mykotoxinem, i když v malých koncentracích (200-310 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Podle autorů je zastoupení jednotlivých mykotoxinů ovlivňováno klimatickými podmínkami v průběhu vegetačního období a kultivaru špaldy [64]. Suchowilska *et. al.* stanovili celkem 11 mykotoxinů v obilných zrnech *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum*, *Triticum spelta* a *Triticum aestivum*, přičemž DON byl opět nejčastěji zastoupeným mykotoxinem. Mezi jednotlivými kultivary byly nalezeny statisticky významné rozdíly. Zastoupení mykotoxinů v *Triticum spelta* bylo porovnatelné s *Triticum dicoccum* [65].

Dalším z přístupů komparace ekologických a konvenčních obilnin je studium celé řady metabolitů. Zorb *et. al.* v roce 2006 zkoumali profil 52 metabolitů (aminokyselin, organických kyselin, sacharidů, nebo nukleotidů) v zrnech pšenice pěstované ekologickými, integrovanými a konvenčními postupy, přičemž autoři dospěli k závěru, že rozdílné zemědělské postupy mají malý, resp. zanedbatelný význam na zastoupení jednotlivých metabolitů [66]. V následných studiích autoři rozšířili skupinu sledovaných metabolitů v pšeničných klasech a zrnech o tuky, karotenoidy, škroby a bílkoviny, přičemž dosáhli srovnatelných výsledků s předchozími studii [67, 68].

Porovnání profilu minerálních a stopových prvků je dalším z přístupů komparace ekologicky a konvenčně pěstovaných obilnin, většina prací je však zaměřena na komparaci pšenice seté nebo ječmene, zatímco špaldě se doposud nevěnovala řádná pozornost. Ryan *et. al.* zjistili u biopšenice vyšší obsah Zn a Cu, ale nižší obsah Mn a P ve srovnání s pšenicí konvenční [69]. Laursen *et al.* studovali potenciál multi-elementárního profilu při autentifikaci ekologické pšenice a ječmene. Autoři demonstrovali, že na diskriminaci těchto ekologických a konvenčních plodin je potřeba více než jeden parametr [70]. Vrček a Vrček na základě

multi-elementárního porovnání pšeničné bio- a konvenční mouky zjistili statisticky významné rozdíly v obsahu As, Cd, Cr, Fe, Mg, Mo, Ni a V, přičemž v biomouce byly stanoveny vyšší koncentrace V, Cr, Mg, Ni a Mo, zatímco v konvenčních moukách vyšší obsah As, Cd a Fe [71].

2.2 Stabilita ovocných šťáv (džusů)

Ovocné džusy (šťávy) hrají významnou roli ve výživě člověka. Jsou bohatým zdrojem řady biologicky aktivních látek, včetně látek polyfenolických, které jsou, jak už bylo uvedeno v předchozích částech, charakteristické výraznými antioxidačními vlastnostmi. Kromě jejich antioxidačního působení mohou také pozitivně ovlivňovat barvu a chuť ovoce, a tím přispívat ke zlepšení sensorické jakosti ovocných šťáv.

V platné směrnici Rady 2001/112/ES o ovocných šťávách je ovocná šťáva definována jako zkvasitelný, ale nezkašený produkt získaný z jednoho nebo více druhů ovoce, s charakteristickou barvou, vůní a chutí, které jsou typické pro šťávu pocházející z příslušného ovoce nebo směsi. Aroma, dužina a buňky ze šťávy, které jsou odděleny v průběhu zpracování, mohou být do téže šťávy vráceny. Ovocná šťáva z koncentrátu je produkt získaný z koncentrované ovocné šťávy opětovným doplněním vody, která byla odstraněna při zahušťování šťávy, a obnovením aromatu, a popř. ztracené dužiny a buněk, které byly zachyceny při procesu výroby [72].

100% ovocné džusy obsahují čistou ovocnou šťávu, bez přídavku cukru, vody, barviv nebo konzervačních látek. Často obsahují pouze přirozeně se vyskytující cukry. Podle obsahu dužiny se ovocné šťávy dělí na šťávy čiré (bez dřeně) a dřeňové šťávy. Nové trendy ve výrobě představuje přidávání kousků ovoce do ovocných šťáv, s cílem uspokojit požadavky spotřebitelů a zlepšit kvalitu a organoleptické vlastnosti výrobku [73].

2.2.1 Balení ovocných šťáv

Kvalita ovocných šťáv, vyrobených bez přísad, je určena kvalitou surovin. Obecně platí, že kyselé a šťavnaté ovoce s vyšším obsahem cukru a výrazným aroma, je vhodné právě pro výrobu ovocných šťáv. Zralost ovoce má zásadní význam, neboť vyzrálé plody mají optimální poměr cukru/kyseliny a obsahují žádoucí chuťové a aromatické látky. Zpracování by mělo být rychlé a šetrné, aby se předešlo ztrátám způsobených převážně oxidací.

Kvalita džusu je v průběhu zpracování, plnění a nakonec během přepravy a skladování ovlivňován několika faktory, např. hygienou během plnění a balení, skladovací teplotou, působením kyslíku a světla nebo interakcí obalového materiálu. Právě kontakt s kyslíkem může vést k degradaci vitaminů a dalších látek antioxidační povahy, vyvolat barevné změny a může vést k chuťovým změnám. Kyslík může být přítomný jak v džusu, tak i v horní části obalu (*headspace*). Kyslík obsažený v džusu může být zredukován během zpracování, přičemž k jeho odstranění z horní části obalu se používá proplachování dusíkem během plnění [73].

Cílenou změnou složení okolní atmosféry lze zpomalit nebo i úplně zastavit nežádoucí změny v potravinách a tím prodloužit jejich trvanlivost. Na tomto principu je založeno balení (plnění) v modifikované atmosféře, které patří k běžně používaným postupům chránícím skladované potraviny před nežádoucími oxido-redukčními reakcemi, ale i změnami vlhkosti a mikrobiologickými procesy. Praktické provedení těchto balení zahrnuje vakuově balené potraviny (základem je odstranění všech plynů přítomných v okolí potraviny tak, že obsah kyslíku v okolí produktu klesne pod 1 % původního množství) a balení v ochranné atmosféře

(základem je odstranění vzduchu z obalu a jeho nahrazení směsí plynů schválených v EU: kyslík, dusík, oxid uhličitý) [74, 75].

Alternativou jak prodloužit trvanlivost výrobku je také použití modifikovaných obalových materiálů – aktivních obalů. Aktivní obalové materiály jsou schopné měnit své vlastnosti v reakci na změny podmínek vně a uvnitř obalu tak, že eliminují (tzv. absorbéry – odstraní nežádoucí sloučeniny jako kyslík, oxid uhličitý, etylen) nebo zmírňují (tzv. emitéry – uvolňují do balené potraviny stabilizační činidla, např. emitéry CO₂, organických kyselin – kyseliny benzoové nebo emitéry SO₂) jejich nepříznivý dopad na kvalitu výrobku prodloužením trvanlivosti nebo organoleptických vlastností [75]. Nejvýznamnější skupinou používaných systémů aktivního balení představují tzv. absorbéry (zhášeče) kyslíku (*oxygen scavengers*). Absorbéry kyslíku jsou aplikovány ve formě sáčků obsahujících složky absorbující kyslík, které se vkládají do obalu nebo jsou připevněny na vnitřní stěnu obalu, v případě balení ovocných šťáv bývají inkorporovány do uzávěrů, do obalového materiálu rozpuštěním, dispergací v plastu nebo imobilizací oxidačních enzymů v obalovém materiálu. Technologie vychytávání kyslíku využívá oxidaci železitého prášku, oxidaci barviva citlivého na světlo, enzymové oxidace, nebo kombinaci těchto postupů [74-77]. Aktivní balení na principu absorbérů kyslíku umožňují účinnější odstranění jak kyslíku rozpuštěného v potravine, tak i přítomného v horní části obalu (*headspace*) než v případě balení v modifikované atmosféře [73, 78].

2.2.2 Studium stability ovocných šťáv

Stabilita ovocných šťáv je ve většině dostupných studií posuzována na základě stability barvy, změn koncentrace kyseliny askorbové, a s tím spojených změn antioxidační aktivity. Změny těchto parametrů jsou nejčastěji sledovány v závislosti na různých přístupech technologického zpracování ovoce a výrobního postupu, např. termálního ošetření, zpracování za vysokého tlaku nebo pulzním elektrickým polem [79-83].

V souvislosti s rozvojem aktivního balení ovocných šťáv na bázi absorbérů kyslíku se některé studie zaměřují na posouzení vlivu těchto obalových materiálů na stabilitu šťáv, přičemž nejčastěji sledovaným parametrem jsou změny koncentrace kyseliny askorbové. Z těchto studií vyplývá, že při aplikaci zhášečů kyslíku snižujících obsah kyslíku rozpuštěného ve šťávě je degradace kyseliny askorbové přibližně o 20 % nižší než u klasických obalů [84-87]. Aplikace absorbéru kyslíku a CO₂ prodloužila trvanlivost jahodové šťávy a kvalitu zpracovaného ovoce [87, 88]. Přesto v současnosti neexistují studie monitorující stabilitu ovocných šťáv, které byly obohaceny kousky ovoce, a jsou baleny za použití systémů aktivního balení na bázi absorbérů kyslíku.

3. POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ TECHNIKY

K zjišťování autenticity se využívá široká škála metod od těch nejjednodušších, jako jsou sensorické metody (posouzení chutě, vůně nebo barvy), přes klasické chemické a fyzikální metody postihující základní složky potravin (stanovení sušiny/vlhkosti, dusíku/bílkovin, popela, pH) až po instrumentální metody vyžadující nejmodernější přístroje (chromatografické a separační techniky, spektroskopické nebo molekulárně-biologické metody, apod.) [89].

Celkový přehled o potencionálních markerech a analytických metodách používaných na autentifikaci ekologických produktů představuje studie Capuana *et. al.* [19], kteří místo jednoduchých markerů doporučují více početné markery anebo celé kompoziční profily v kombinaci s multivariační statistickou analýzou, kdy se může využít velká variabilita dat zahrnujících informace týkající se odrůd, agrotechnických podmínek, geografických, klimatických a jiných činitelů. Navíc je nepravděpodobné, že by jeden typ analytické strategie hodnocení autenticity mohl být vhodný pro ověření různých bio- a konvenčních potravin.

Jedním z přístupů hodnocení autenticity potravin a jejich stability je i stanovení obsahu polyfenolických látek a charakterizace jejich antioxidačních vlastností. K určování antioxidační aktivity potravin, séra a biologických tekutin se efektivně využívají techniky elektronové paramagnetické rezonance (EPR) nebo UV/VIS spektroskopie, které byly využity i v této práci při porovnávání antioxidačních charakteristik organických a konvenčních vzorků vín a špaldových mouk, a při studiu stability vybraných ovocných šťáv.

3.1 Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)

Tato technika patří do skupiny magnetických rezonančních metod, z nichž více známá je nukleární magnetická rezonance zabývající se studiem chování jaderných spinů v magnetickém poli.

Použití EPR je naproti tomu omezeno jen na systémy, které mají paramagnetickou povahu, tj. látek s jedním nebo více nepárovými elektrony, jako organické nebo anorganické volné radikály, malé paramagnetické molekuly (kyslíkové radikály, $\cdot\text{NO}$), anorganické komplexy obsahující přechodné kovy. Kromě toho se uplatňuje při studiu procesu fotosyntézy nebo degradace organické hmoty. Dále se využívá ke studiu grafitu, ropy, asfaltu nebo dehtu, paramagnetických iontů a vad minerálů a kamenů [90, 91].

3.1.1 Základní princip EPR

Elektronová paramagnetická rezonance vychází z popisu vlastností elektronu. Elektron lze popsat jako rotující, negativně nabitou částici. Protože se jedná o nabitou částici, chová se elektron jako magnet a může tedy interagovat s okolním polem a je možno mu přiřadit magnetický dipólový moment $\vec{\mu}$. Magnetický moment jakéhokoliv elektronu lze vyjádřit vztahem [90-94]:

$$\vec{\mu} = -g_e \cdot \beta_e \cdot M_s \quad (1)$$

kde: g_e je g-faktor volného elektronu ($g_e = 2,0023192778$)
 β_e představuje Bohrov magneton ($\beta_e = 9,2732 \cdot 10^{-24} \text{ J}\cdot\text{T}^{-1}$)

Každý elektron má tedy magnetický moment a spinové kvantové číslo $S = 1/2$. V přítomnosti silného vnějšího magnetického pole, se uplatňuje magnetické kvantové číslo $M_s = +1/2$ (stav α) nebo $M_s = -1/2$ (stav β). Magnetické kvantové číslo je projekcí spinového kvantového čísla do směru siločar vnějšího magnetického pole a celkem může nabývat hodnot [90-93]:

$$M_s = 2 \cdot s + l \quad (2)$$

Spin tedy v magnetickém poli zaujímá jen určité diskrétní orientace, a to buď paralelně, nebo antiparalelně se směrem vnějšího magnetického pole.

Ve vnějším magnetickém poli dochází k rozštěpení původní hladiny elektronu na 2 hladiny o různých energetických hodnotách. Tyto dvě energetické hladiny se nazývají Zeemanovy hladiny (Obr. 3) a jejich vytvoření v magnetickém poli bývá označováno Zeemanův jev (Zeemanovo štěpení). Zeemanovy hladiny jsou výsledkem vzájemné interakce mezi vnějším magnetickým polem o indukci B_0 a magnetickým momentem elektronu $\vec{\mu}$. Energie této interakce je vyjádřena vztahem [90, 91, 94]:

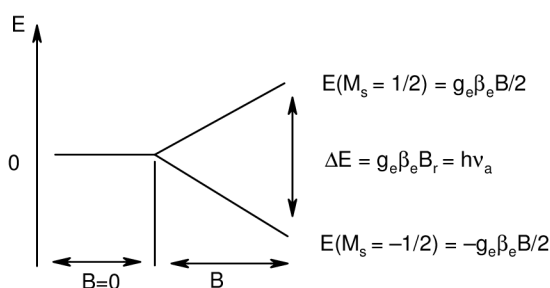
$$E = -\vec{\mu}_z \cdot B \quad (3)$$

kde: $\vec{\mu}_z$ představuje projekci magnetického momentu elektronu do směru pole.

Pro energii elektronu v magnetickém poli tedy platí vztah:

$$E = \pm \frac{1}{2} \cdot g \cdot \beta \cdot B_0 \quad (4)$$

kde: B_0 je hodnota indukce magnetického pole.



Obr. 3: Zeemanovo štěpení jako funkce magnetické indukce [90].

Vzdálenost mezi vytvořenými Zeemanovými hladinami je [91, 92]:

$$\Delta E = \left(g_e \beta_e \frac{B}{2} \right) - \left(-g_e \beta_e \frac{B}{2} \right) = g_e \beta_e B = h\nu \quad (5)$$

kde: h je Planckova konstanta a ν je frekvence zdroje záření.

Tato rovnice je zároveň rovnicí rezonanční podmínky v EPR spektroskopii, kterou lze splnit dvěma způsoby. Buď se měření uskutečňuje při konstantní frekvenci ν , při které se

plynule mění indukce magnetického pole B až do dosažení rezonance; nebo druhým způsobem, využívaným v pulzní EPR spektroskopii, kdy se při konstantní hodnotě magnetického pole mění frekvence. Častěji je využíván první způsob. Pro hodnoty indukce magnetického pole okolo 0.35 T je rezonanční podmínka splněná přibližně při frekvenci $\nu=9.5$ GHz, tedy mikrovlnné oblasti při vlnové délce 3 cm (pro tzv. X-pásmové spektrometry) [90-94].

V závislosti na frekvenci s jakou EPR spektrometr pracuje, je možné EPR spektroskopii rozdělit na několik pásem. Každé pásmo (frekvence) umožňuje získat specifické informace o struktuře vzorku, a proto se na její lepší identifikaci často využívá kombinace více pásem [90, 91, 94, 95].

3.1.2 Charakteristika spinových systémů

g-faktor

V každém vzorku může mimo vnějšího magnetického pole o indukci B_{ext} existovat i lokální magnetické pole B_{loc} , jehož vektorovým sčítáním s B_{ext} se získá tzv. celkové efektivní magnetické pole B_{eff} [90, 91]:

$$B_{eff} \equiv B_{ext} + B_{loc} \quad (6)$$

Lokální pole mohou být buď indukované vnějším magnetickým polem, které jsou závislé na velikosti tohoto pole, nebo vlastní (stálé), tj. nezávislé na velikosti B_{ext} . Častější je případ, kdy se lokální magnetické pole v látce indukuje. Pro takovéto látky platí:

$$B_{eff} = B \cdot (1 - \sigma) = \left(\frac{g}{g_e} \right) \cdot B \quad (7)$$

Vztah $(1 - \sigma) = (g/g_e)$ je obdobou stínící konstanty, běžně používané v NMR spektroskopii. Parametr g je tzv. efektivní Zeemanův g-faktor. Každá paramagnetická látka má svoji charakteristickou hodnotu g-faktoru, která slouží k charakterizaci polohy signálu. Odchýlení g od g_e závisí na schopnosti vnějšího magnetického pole B_{ext} indukovat v paramagnetické látce lokální magnetické pole.

Charakteristickým rysem mnohých volných radikálů a některých přechodných kovů je, že jejich hodnota g je velmi blízká hodnotě g_e . Naproti tomu mnohé systémy (i některé přechodné kovy) vykazují od této teoretické hodnoty značné odchylky a ve výjimečných případech byly pozorovány i záporné hodnoty g-faktoru. U anizotropních systémů je potřebné uvažovat o závislosti hodnoty g-faktoru na orientaci látky v magnetickém poli. Hodnoty g se v takovýchto případech udávají v maticovém tvaru. Systémy s izotropními vlastnostmi, mezi které patří i roztoky s nízkou viskozitou, mají hodnotu g-faktoru nezávislou na orientaci vzorku v magnetickém poli, tedy:

$$g_x = g_y = g_z \quad (8)$$

Udávaná hodnota g představuje v těchto systémech tzv. efektivní hodnotu g-faktorů ze všech možných orientací látky v magnetickém poli. V izotropních systémech je g-faktor zároveň identický se středem spektra [90-93].

Hyperjemné štěpení EPR spekter

Jestliže nepárový elektron reaguje pouze s vnějším magnetickým polem, tak ve spektru pozorujeme pouze jednu čáru. To je nejjednodušší případ. Chemické sloučeniny však bývají složeny z atomů, jež mají nenulový spinový moment a z toho vyplývající členitost spekter, pak přináší informace o vlastnostech a struktuře radikálů. Elektron je tedy ovlivňován magnetickým polem vnějšího pole a zároveň magnetickým polem jednotlivých jader. A právě ovlivnění magnetickým momentem jader způsobuje hyperjemnou interakci a následné rozštěpení čar v EPR spektru (hyperjemná struktura) [90-93].

Jaderné spiny se v magnetickém poli chovají analogicky jako spiny elektronů, což znamená, že zaujmou jednu z $(2I + 1)$ orientací popsanych jaderným spinovým číslem M_I .

Ke vzájemné interakci mezi spinem jádra a elektronu může dojít dvěma způsoby, a to [90, 91]:

- dipól-dipólovou interakcí – má anizotropní charakter, její velikost a charakter závisí na orientaci elektronu vzhledem k vnějšímu magnetickému poli. Tuto interakci lze pozorovat pouze u radikálů v tuhých látkách nebo viskóznějších kapalinách, v kapalně fázi zaniká v důsledku neuspořádaného pohybu molekul.
- Fermiho kontaktní interakcí – izotropní povahy, její velikost tedy nezávisí na orientaci radikálu v magnetickém poli. Projevuje se pouze za předpokladu, že alespoň část elektronové hustoty volných částic se nachází na orbitalu s .

Hyperjemné štěpení vede ke vzniku hyperjemné struktury EPR spekter. Každé jádro je zdrojem magnetického pole, které v závislosti na orientaci jaderného spinu zvyšuje (zesiluje) nebo naopak snižuje (zeslabuje) lokální magnetické pole:

$$B_{loc} = B_r + \alpha \cdot m_i \quad (9)$$

kde: α je konstanta hyperjemné interakce (štěpící konstanta),

m_i je magnetické jaderné kvantové číslo ($I, I-1, \dots -I$),

B_r je indukce magnetického pole, při které je splněná rezonanční podmínka.

Všeobecně přítomnost n chemicky ekvivalentních jader se spinem I vede ke štěpení všech čar v EPR spektru na $(2 \cdot n \cdot I + 1)$ rezonančních čar. Hodnoty spinů některých často se vyskytujících jader jsou spolu s jejich základními charakteristikami uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Vybrané charakteristiky některých jader [90].

Jádro	Přirozený výskyt (%)	Spin I	Magnetický moment M_I
¹ H	99.9850	1/2	±1/2
¹³ C	1.11	1/2	±1/2
¹⁴ N	99.63	1	0, ±1
¹⁷ O	0.038	5/2	±5/2, ±3/2, ±1/2
⁵⁵ Mn	100	5/2	±5/2, ±3/2, ±1/2
⁵⁷ Fe	2.15	1/2	±1/2
⁵⁹ Co	100	7/2	±7/2, ±5/2, ±3/2, ±1/2

Velikost štěpící konstanty α závisí na rozložení elektronové hustoty v blízkosti interagujících jader. Počet rezonančních čar v EPR spektru spolu s hodnotami štěpících konstant a poloha spektra charakterizovaná hodnotou indukce magnetického pole B , resp. hodnotou g -faktoru, jsou důležitými charakteristikami, které umožňují spolehlivou

identifikaci radikálu v systému. S určením koncentrace, resp. množství radikálů přítomných ve vzorku je spojená plocha EPR spektra. Za určitých podmínek (pokud se nemění šířka spektrální čáry) je mírou koncentrace radikálů v systému i intenzita (výška) EPR signálu [90-93].

3.1.3 EPR spektroskopie v kapalně fázi

V EPR spektru pozorované hyperjemné štěpení vzorků v kapalně fázi umožňuje posoudit strukturu a distribuci elektronu v molekulách zkoumaných paramagnetických sloučenin. Metoda EPR je omezená pouze na systémy obsahující nepárový elektron, její citlivost však umožňuje studovat i radikálové meziprodukty s krátkou dobou života v chemických a biochemických systémech. Vzhledem k časté labilitě těchto sloučenin jsou kladeny vysoké nároky především na výběr vhodných rozpouštědel, ale i dalším reakčních činidel [90, 93].

Přímé metody detekce nízkých hladin volných radikálů, které se běžně používají při studiu fyziologických procesů, jsou limitovány spodním prahem detekovatelnosti EPR spektroskopie (10^{-8} mol.dm⁻³). S pomocí výpočetní techniky lze uskutečnit vícenásobnou akumulaci spekter, čímž se potlačí velikost šumu. V těchto případech je možné detekovat radikály při koncentraci kolem 10^{-9} mol.dm⁻³. Vzhledem k tomu, že radikálové procesy probíhají při ještě nižší koncentraci, hranice detekce lze v takových případech posunout pomocí metod nepřímé detekce, např. metody spinových lapačů [93, 96, 97].

3.1.4 Spinové značky a spinové lapače

3.1.4.1 Spinové značky

Ve všeobecnosti je lze definovat jako stabilní radikály přidávané záměrně do reakčního systému. Prostřednictvím fyzikálněchemických vlastností systému v přítomnosti spinové značky je možné určit různé kvalitativní i kvantitativní parametry reakčního systému – umožňuje např. sledování kinetiky radikálových reakcí, resp. na základě změn konstant hyperjemné interakce a hodnot g-faktoru spinových značek je možné získat cenné informace o okolí spinové značky v experimentálním systému.

Jejich výhody jsou:

- citlivost na vlastnosti lokálního okolí;
- schopnost měřit rychlý pohyb molekul;
- EPR signál není ovlivněn diamagnetickým okolím;
- velká variabilita dostupných spinových značek (výběr spinové značky je podmíněn hlavně vlastnostmi studovaného systému).

EPR spektrum, které pozorujeme pro spinové značky významně závisí na dvou parametrech:

- relativní lehkost, kterou se nitroxylový konec molekuly může pohybovat a neorientovat;
- stupeň hydrofobicity nebo hydrofility okolí.

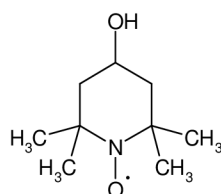
Velikost konstanty hyperjemného štěpení (a_N) a hodnota g-faktoru nitroxylových spinových značek je závislá na vlastnostech rozpouštědla. Konstanta hyperjemného štěpení je obvykle o 0.1 až 0.2 mT menší v nepolárních rozpouštědlech než v polárních, přičemž hodnota g-faktoru stoupá v polárních rozpouštědlech přibližně o 0.0005. To znamená, že

hodnoty těchto parametrů nitroxylových spinových značek přináší informace o okolí spinové značky v experimentálním systému [98].

Metoda spinových značek se v současnosti používá hlavně při studiu biologických systémů (enzymy, lipidy, membrány) a polymerních materiálů [98, 99].

Volba spinové značky závisí na charakteru prostředí a vlastnostech reakčního systému. Při výběru vhodné spinové značky jsou důležitým kritériem strukturní vlastnosti spinových značek a jejich vliv na reaktivitu. Běžně se využívají např. deriváty kyseliny stearové [100], deriváty 3-karbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-N-oxyl (PROXYL), anebo deriváty spinové značky 2,2,6,6-tetramethylpiperidiny-N-oxyl (TEMPO) [98].

Stabilní radikál 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL, Obr. 4). Jedná se o ve vodě rozpustný hydroxy-derivát spinové značky TEMPO a představuje jeden z nejčastěji používaných nitroxidových radikálů [98, 99]. Využívá se v kvantitativní EPR spektroskopii, jejíž hlavní úkol spočívá v přesném určení počtu EPR aktivních částic v experimentálním systému [95, 101].



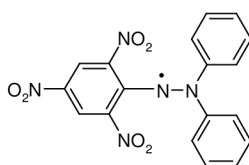
Obr. 4: Radikál TEMPOL [98].

TEMPOL reaguje s kyselinou askorbovou (AH_2) za vzniku kyseliny dehydroaskorbové (DHA) a diamagnetického hydroxylaminu, podle schématu [101-103]:



TEMPOL byl označen jako inhibitor oxidací katalyzovaných kovy. Oxiduje železnaté ionty na železitou formu, a proto zabraňuje reakci železnatých iontů s peroxidy [99, 104-107], je schopný zhaset superoxidový anion radikál [99, 105] nebo hydroxylový radikál [108, 109]. Podle studie Abdallah *et. al.* poskytuje TEMPOL ochranu před žaludeční ischémií, pravděpodobně v důsledku snižování koncentrace superoxidového anion radikálu [110]. TEMPOL chrání mitochondrie před oxidačním poškozením a zlepšuje okysličení tkání [105], snižuje rozsah peroxidace membránových lipidů způsobené gama zářením [111]. Podle některých prací může TEMPOL působit jako prooxidant, ale i antioxidant [105, 112, 113].

Stabilní volný radikál 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (\bullet DPPH). \bullet DPPH je jedním z nejčastěji využívaných volných radikálů v EPR experimentech. Poprvé bylo jeho EPR spektrum změřené v roce 1950, a v průběhu několika let se začal využívat jako standardní látka v kvantitativní EPR spektroskopii [95, 114-118].



Obr. 5: Radikál \bullet DPPH [114].

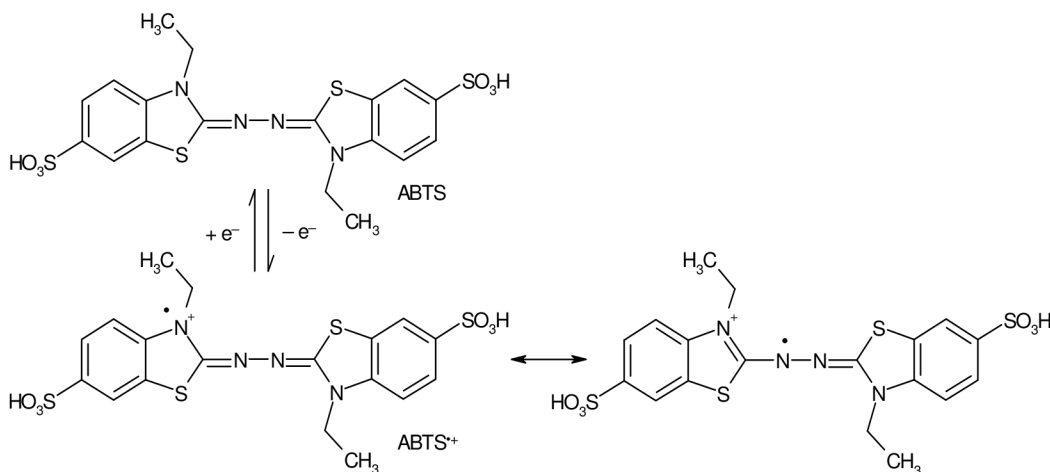
\cdot DPPH je stabilní volný radikál (charakteristické tmavě fialové zbarvení), který může být díky své struktuře nejen akceptorem atomu vodíku, a přejít tak do formy stabilní diamagnetické molekuly, ale i donorem. Při reakci testované látky s radikálem \cdot DPPH dochází k jeho redukci za vzniku diamagnetického DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) [113, 118-124]:



Každá látka, která má H-donorovou aktivitu (antioxidant), může redukovat stabilní volný radikál \cdot DPPH, a v důsledku toho dochází také k změně barvy roztoku z fialové až na světle žlutou (např. reakce \cdot DPPH a minerálními kyselinami ve vodě vede k rychlé ztrátě charakteristického zbarvení). Rychlost těchto reakcí je možné ovlivnit výběrem vhodného rozpouštědla [95, 114, 123, 125, 126], např. reakce je rychlejší v alkoholu než etylacetátu, běžně používaném při testování antioxidačních vlastností nepolárních vzorků, např. rostlinných olejů [127]. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku [128].

V UV/VIS spektru \cdot DPPH se nachází dva absorpční pásy – při 520 nm a 320 nm. Na spolehlivou identifikaci \cdot DPPH se používá absorpční pás při 520 nm. Při této vlnové délce se často uskutečňují i různé časově-závislé experimenty. Absorpce \cdot DPPH je také ovlivňována interakcemi s rozpouštědlem, stejně tak je mohou ovlivňovat i různé kontaminanty přítomné v roztoku [125, 126, 129, 130].

Kation-radikál 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazol)-6-sulfonát ($\text{ABTS}^{\cdot+}$). $\text{ABTS}^{\cdot+}$ je dusíkem-centrovaný radikál s charakteristickým modro-zeleným zbarvením.



Obr. 6: Struktura ABTS a $\text{ABTS}^{\cdot+}$ [131].

Jako prekurzor radikálu se používá ABTS. V reakční směsi se kation-radikál $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (silná absorbance v rozsahu vlnových délek 600–750 nm) generuje oxidací ABTS [121]. Převážně se používá systém ABTS/ H_2O_2 /peroxidáza [132, 133], ABTS/methmyoglobin/ H_2O_2 [134] nebo reakcí ABTS- H_2O_2 katalyzované umělým enzymem G-quadruplex DNazym, přičemž takto připravený kation radikál byl stabilizován pomocí adenosintrifosfátu (ATP) [135]. Je

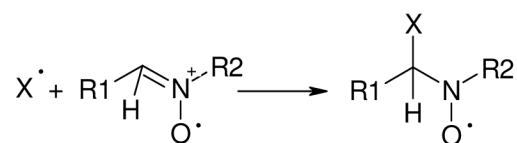
však možná i oxidace pomocí jednodušších anorganických oxidačních činidel, např. peroxidisíranu draselného [136-138] nebo oxidu mangančitého [124, 139, 140].

V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potravin se tento kation-radikál redukuje, a tím odbarvuje. Výsledná antioxidační aktivita vzorku se hodnotí parametrem TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), který označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického, ve vodě rozpustného derivátu vitamínu E – Troloxu (*6-hydroxy-2,5,7,8.tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina*) [123, 124, 136, 137, 141].

3.1.4.2 Spinové lapače

Metoda spinových lapačů je založena na adici kyslíkatých a organických radikálů s krátkou dobou života na molekuly vhodné struktury za vzniku aduktů vyznačujících se vlastnostmi stabilních radikálů, tj. mají delší dobu života. Sloučeniny, na něž se radikály adují, se nazývají spin trapy (spinové lapače), nejčastěji na bázi nitronů, pyrolinoxidů nebo nitrososloučenin. Z původně diamagnetických lapačů se tak stávají paramagnetické sloučeniny. Analýza hodnot štěpných konstant a g-faktoru umožňuje následnou charakterizaci (identifikaci) zachyceného radikál. Tato metoda se nazývá spin trapping [91, 94, 142-146].

Spinové lapače na bázi nitronů. Spinové lapače na bázi nitronů reagují s volnými radikály prostřednictvím atomu uhlíku, který se nachází v α poloze vzhledem k atomu dusíku:



Obr. 7: Vznik stabilního nitroxylového radikálu reakcí radikálu X^{\cdot} a nitronu [142].

Výsledkem adice radikálu X^{\cdot} na dvojnou vazbu fragmentu $-CH=N^+O^-R_2$ je vznik stabilního nitroxylového radikálu. Na rozdíl od aplikace nitrososloučenin se v EPR spektru tohoto radikálu kromě základního dusíkového štěpení a případného štěpení od substituentu R_2 pozoruje ještě dodatečné štěpení od vodíkového atomu $-CH$ skupiny.

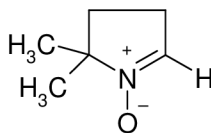
Nejvýznamnějším spin trapem na bázi nitronů je α -fenyl-*N*-*tert*-butyl-nitron (PBN, Obr. 8a), který má lipofilní charakter, což omezuje jeho rozpustnost a také použití ve vodném prostředí. Na druhou stranu ho tato vlastnost předurčuje k využití jako spin-trapu např. v případě radikálů vznikajících při oxidačních procesech lipidů v buněčných stěnách. Ke studiu radikálových procesů probíhajících ve vodném prostředí se využívá hydrofilnějšího α -(4-pyridyl-1-oxid)-*N*-*tert*-butyl-nitronu (POBN, Obr. 8b), který se využívá ke spin trappingu kyslíkem centrovaných radikálů [90, 91, 94, 143, 147, 148]. González *et. al.* využily PBN i POBN k detekci lipidových radikálů v mořských organismech za tvorby stabilních spinových aduktů, které nejsou ovlivňovány světlem, teplem ani přítomností kyslíku [94].



Obr. 8: a) α -fenyl-*N*-*tert*-butyl-nitron b) α -(4-pyridyl-1-oxid)-*N*-*tert*-butyl-nitronu [91].

Spinové lapače na bázi pyrolinoxidů. Nejvýznamnějším představitelem této skupiny je 5,5-dimethyl-1-pyrolin-N-oxid (DMPO, Obr. 9).

Molekula DMPO má labilní dvojnou vazbu v heterocyklickém pyrolinovém kruhu, která umožňuje adici radikálů s krátkou životností. Jeho velkou výhodou je rozpustnost v polárních i nepolárních rozpouštědlech a pufrových roztocích, což umožňuje jeho využití i při sledování radikálových reakcí za fyziologických podmínek [143, 145, 148-150].



Obr. 9: 5,5-dimethyl-1-pyrolin-N-oxid [91].

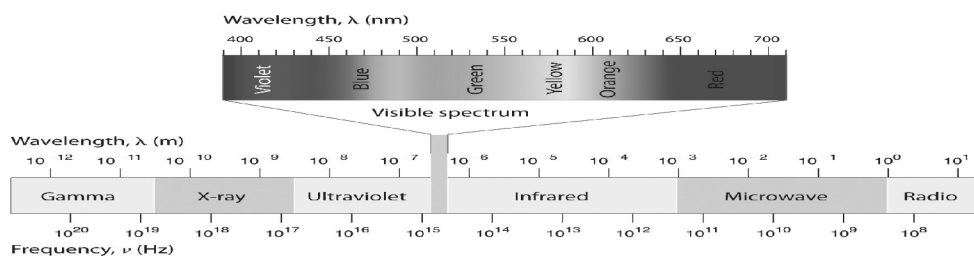
Nejčastěji se používá na identifikaci radikálů $\cdot\text{OH}$, $\text{HOO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{RO}_2\cdot$ a různých typů uhlíkem centrovaných radikálů, ve všeobecnosti $\text{R}\cdot$. Přestože je DMPO nepoužívanějším spinovým lapačem kyslíkem-centrovaných radikálů, jeho schopnost zachytit hydroperoxylový radikál ($\text{HOO}\cdot$) má svá omezení. Jedním z hlavních problémů je krátká životnost DMPO-OOH aduktu, především ve vodních roztocích a biologických systémech, jehož rozkladem vzniká DMPO-OH adukt. Možná je také oxidace DMPO na kationový radikál, který se reakcí s vodou transformuje na DMPO-OH spinový adukt [143, 149-152].

3.2 UV-VIS-NIR spektroskopie

UV-VIS-NIR spektroskopie se používá na charakterizaci elektronové struktury a analytické stanovení různých anorganických a organických sloučenin, např. na studium barevných sloučenin, organických a anorganických barviv a pigmentů, komplexních sloučenin přechodných kovů apod. Obecně ji lze považovat za velmi citlivou metodu na kontrolu čistoty látek [153-155].

3.2.1 Základní princip UV-VIS-NIR

Technika UV-VIS-NIR se zabývá sledováním absorpce elektromagnetického záření v rozsahu vlnových délek mezi $\lambda = 200\text{--}400\text{ nm}$ (UV) a $\lambda = 400\text{--}700\text{ nm}$ (VIS), oblast nad 700 nm se nazývá infračervená (IR) [155-157]. NIR oblast pokrývá přechod od viditelné do střední infračervené oblasti spektra (MIR), tedy $700\text{--}2500\text{ nm}$. Infračervené záření má větší vlnovou délku a menší energii než ultrafialové a viditelné záření [158, 159].



Obr. 10: Elektromagnetické spektrum [159].

Molekula se za běžných podmínek nachází na základní vibrační hladině a její elektrony nejsou excitovány. Absorpcí fotonu přijme energii, která vede k přechodu elektronu na excitovanou hladinu a molekula přejde na jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin.

Dostatečnou energii nesou fotony z ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Fotony infračervené oblasti mají nižší energii, proto jejich absorpce již nemůže vést ke změnám elektronových stavů molekul, dochází ale k změnám rotačního a vibračního stavu molekuly. Z tohoto důvodu jsou infračervená spektra označována jako vibračně-rotační [160].

NIR spektroskopie nevyžaduje náročné přípravy vzorků k rozborům, v zásadě lze přímo analyzovat téměř všechny roztoky, suspenze, emulze, prášky s nerovným a nepravidelným povrchem i silně absorbující látky. Podstatné je, aby vzorek obsahoval vazby C-H, N-H, S-H nebo O-H a koncentrace látky v něm byla větší než $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [158].

Látky, které absorbují jen záření s vlnovou délkou menší než 380 nm, se jeví jako bezbarvé, látky absorbující z bílého slunečního záření vlnové délky v rozsahu 380 – 770 nm se jeví jako barevné [161].

Při dopadu záření na povrch tělesa může dojít k odrazu záření, k jeho pohlcení, nebo také k průchodu záření objektem. Pokud daná látka absorbuje záření, dochází ke snížení jeho intenzity. Poměr intenzity záření s určitou vlnovou délkou po průchodu látkou I_t a intenzity dopadajícího záření I_0 se nazývá transmittance T , neboli propustnost [155, 160]:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (16)$$

Hodnota transmittance nabývá hodnot 0–1 a závisí na vlastnostech absorbující látky, vlnové délce procházejícího světla a množství absorbující látky, tj. na její koncentraci v roztoku a na tloušťce kyvety. Závislost transmittance na těchto veličinách lze definovat vztahem:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c} \quad (17)$$

kde ε je molární absorpční koeficient, l je optická délka kyvety a c je koncentrace látky v roztoku.

Velikost absorpce lze definovat také pomocí absorbance A . Tato veličina udává logaritmický poměr intenzity záření dopadajícího a intenzity záření prošlého vzorkem:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = -\log T \quad (18)$$

Algebraickými úpravami rovnic (17) a (18) se získá vztah označovaný jako Lambert-Beerův zákon, který vyjadřuje vztah mezi absorbancí a koncentrací zkoumané látky:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (19)$$

Lambert-Beerův zákon je zákonem limitním. Platí pouze za následujících podmínek: záření musí být monochromatické; roztoky musí být velmi zředěné ($c < 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$); absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám; v roztoku musí být jen jedna absorbující složka. Pokud je ve vzorku přítomno více složek, je absorbance soumou absorbancí jednotlivých složek [162].

Interakci světla a látky se může vyjádřit další spektrofotometrickou veličinou, absorptancí α , která udává, kolik % záření daná látka absorbovala (rovnice 20), nebo reflaktancí, která vyjadřuje množství záření, které se odrazilo od povrchu látky (rovnice 21) [163]:

$$\alpha = 100 - T(\%) \quad (20)$$

$$R = \frac{I_r}{I_0} \quad (21)$$

kde I_r je intenzita světelného toku odraženého. V případě reflektance je pak absorpce definována vztahem:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_r}\right) = -\log R \quad (22)$$

Při absorpci ultrafialového a viditelného záření látkou dochází k elektronovým přechodům. Energie fotonu odpovídá změně energie molekuly ze základního stavu E_0 do excitovaného stavu s energií E_1 . Změna energií molekuly je přímo úměrná frekvenci záření (ν) a nepřímo úměrná vlnové délce záření (λ) podle vztahu:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (23)$$

kde $h=6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s je Planckova konstanta a $c=3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹ je rychlost světla ve vakuu.

Po uskutečnění elektronového přechodu jsou jádra v molekule pod vlivem rozličných sil, na které může molekula zareagovat tak, že začne vibrovat. Vibrační struktura elektronového přechodu se vysvětluje Franck-Condonovým principem. Hmotnost atomových jader je o několik řádů větší než hmotnost elektronu a z toho důvodu je rychlost vzájemného pohybu jader atomů v molekule (10^{-12} s) pomalejší než rychlost přechodu elektronu (10^{-15} s). Při přechodu elektronu ze základního do excitovaného stavu proto zůstane zachována původní vzdálenost mezi jádry atomů; tato vzdálenost však nemusí odpovídat optimální E molekuly v excitovaném stavu, a proto jádra atomů zaujmou nejvýhodnější vzdálenost až dodatečně, po přechodu elektronu [164].

Skupiny s charakteristickou optickou absorpcí se nazývají chromofory a jejich přítomnost vysvětluje barvu látek. Látka, která neobsahuje chromofor, je transparentní. Ve většině sloučenin se vyskytuje více chromoforů současně. To způsobuje existenci více elektronových přechodů a pozorované absorpční spektrum je tvořené větším počtem vzájemně se překrývajících pásů.

Tab. 3: Příklady energetických přechodů v UV/VIS oblasti [165].

Přechod	Rozsah vlnových délek (nm)	Příklad
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 200	C-C, C-H
$n \rightarrow \sigma^*$	160-260	H ₂ O, CH ₃ OH, CH ₃ Cl
$\pi \rightarrow \pi^*$	200-500	C=C, C=O, C=N, C=C
$n \rightarrow \pi^*$	250-600	C=O, C=N, N=N, N=O

Intenzita absorpce souvisí s pravděpodobností přechodu do vyšší energetické hladiny. Čím je pravděpodobnější daný přechod, tím ochotněji se absorbuje záření odpovídající energie. Kvantová chemie rozlišuje přechody [160]:

- přechody dovolené – vyvolávají velmi intenzivní pásy ($\epsilon_{\max} > 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), patří sem přechod $\pi \rightarrow \pi^*$
- přechody symetricky zakázané – přechody, při kterých nedojde ke změně dipólového momentu molekuly; mají malou intenzitu (ϵ_{\max} se pohybuje okolo $10^2 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), přechod $n \rightarrow \pi^*$ je symetricky zakázán, a proto je pás slabý
- přechody spinově zakázané – přechody do stavu s jiným spinem. Mají nepatrnou intenzitu (ϵ_{\max} jsou řádově v jednotkách $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Změna energie mimo přechodů mezi elektronovými stavy zahrnuje i změny mezi rotačními a vibračními stavy molekuly. Energetické změny v důsledku rotačních a vibračních stavů jsou však podstatně menší a pro spektroskopii v UV/VIS oblasti často zanedbatelné

3.3 Metody studia antioxidačních vlastností potravin

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem **celková antioxidační kapacita (TAC, total antioxidant capacity)**, označovaný také celková antioxidační aktivita (TAA, total antioxidant activity), která kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály [128, 166]. Rozmanitost publikovaných metod využívaných ke studiu antioxidačních vlastností potravin vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidyanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je však často problematické. Proto také postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redukující vlastnosti látek [167].

Metoda využívající radikál ABTS^{*+} , označovaná jako metoda TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), je jedna z nejčastěji používaných metod hodnocení antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností potravin. Je založena na iniciaci ABTS, prekursoru radikálu, v radikálovou formu, která se v přítomnosti antioxidantů redukuje, a tím odbarvuje. Výsledná hodnota TEAC vyjadřuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství derivátu vitamínu E – Troloxu. Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-3}$), která je rovná antioxidační aktivitě vzorku [121, 124, 136].

Metody využívající radikál DPPH^{\bullet} je jedna z nejstarší metodik posouzení radikál-zhášející aktivity potravin. DPPH^{\bullet} test byl navržen ve dvou provedeních, dynamickém nebo statickém. Zatímco v prvním případě se měří rychlost úbytku DPPH^{\bullet} pozorovaná po přidání vzorku obsahujícího fenolické látky, ve statickém provedení se stanovuje množství vychytaného DPPH^{\bullet} testovaným vzorkem. Dynamický test charakterizuje reaktivitu, statický určuje stechiometrii pro reakci DPPH^{\bullet} a donorem H-atomů pro jednotlivé látky nebo množství aktivních OH-skupin v komplexní směsi. V dynamickém provedení je reaktivita charakterizována jako počáteční rychlost rozkladu DPPH^{\bullet} [113, 124, 168, 169]. Při použití spektroskopické metody lze účinnost antioxidantu vyjádřit jako hodnotu EC_{50} určující koncentraci substrátu, která způsobuje 50% pokles absorbance (aktivity) DPPH^{\bullet} [169, 170].

Určení hodnoty TEAC pomocí stabilního radikálu (nejčastěji $\text{ABTS}^{*+}/\text{DPPH}^{\bullet}$) představuje standardní a akceptovanou experimentální techniku porovnání antioxidační účinnosti. Výhodou této metody je jednoduchost, neboť v laboratorních podmínkách lze pokles

koncentrace radikálů ABTS^{•+}/DPPH po přidání studované látky sledovat spektrofotometricky [171]. Výhodou EPR spektroskopie při studiu terminace ABTS^{•+}/DPPH je skutečnost, že se monitoruje EPR signál radikálu i ve vzorcích, které nejsou průhledné, a u nichž nedochází k interferenci s ostatními barevnými látkami v systému [113, 172].

Nejvýznamnějším zástupcem skupiny metod hodnotících schopnost vzorků eliminovat kyslíkové radikály je ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*), přičemž kyslíkové radikály se generují přímo v experimentálním systému. Peroxylový radikál je generován pomocí AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropan-dihydrochlorid), při generaci hydroxylových radikálů se využívá systém H₂O₂/Cu²⁺. Měří se změna rychlosti poklesu fluorescence způsobená reakcí antioxidantu s fluorescenčním činidlem β-fykoerytrinem. Vzhledem k citlivosti β-fykoerytrinu, je chodnější použití stabilnějších a méně reaktivních činidel, např. fluorescein nebo dichlorofluorescein [106, 124, 171].

U metod založených na eliminaci hydroxylových a superoxidových radikálů, jsou tyto radikály generovány různými postupy, např. Fentonovou reakcí nebo UV fotolýzou peroxidu vodíku [173]. Detekce je založena na vychytávání radikálů látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Jedním z přístupů je použití spinových lapačů, např. DMPO, jehož adukty lze kvantifikovat pomocí EPR [172, 174].

Neenzymové antioxidanty jsou redukční činidla, která mohou redukovat radikály, a tím je inaktivovat. Z tohoto důvodu, lze aktivitu antioxidantů vyjádřit na základě jejich redoxních vlastností. Metoda FRAP (Ferric reducing antioxidant power) je založena na redukci Fe³⁺ komplexů (např. TPTZ - 2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) antioxidanty přítomnými v systému na barevnou železnatou formu. Nevýhodou metody je, že stanovení probíhá při nízkém pH, nezachycuje pomalu reagující látky a navíc Fe²⁺ je jedním z produktů Fentonovy reakce [124, 175]. Metoda CUPRAC (*Cupric ion reducing antioxidant capacity*), varianta metody FRAP, je založena na redukci iontů Cu²⁺ na Cu⁺ antioxidanty v systému. Jako činidlo se využívá neokuproin (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin), který s Cu⁺ tvoří komplexy, které absorbují při vlnové délce 450 nm [175, 176]. Metoda stanovení redukující síly (*Reducing power*) je založena na principu růstu absorbance reakční směsi (nárůst absorbance poukazuje na redukční schopnost vzorků), což znamená zvýšení antioxidační aktivity. Při použití této metody tvoří antioxidant barevný komplex s hexakynoželezitanem draselným, kyselinou trichloroctovou a chloridem železitým, přičemž absorbance se měří při 700 nm [124, 177, 178]. Fosfomolybdénová metoda (*Phosphomolybdenum method*) představuje spektroskopickou metodu pro kvantitativní stanovení antioxidační aktivity prostřednictvím tvorby fosfomolybdénového komplexu. Metoda je založena na redukci Mo(VI) na Mo(V) antioxidanty přítomnými ve vzorku a následné tvorbě zeleně komplexu při kyselém pH, jehož absorbance je měřena při 695 nm. Reakční činidlo tvoří směs kyseliny sírové, fosforečnanu sodného a molybdenanu amonného. Pro vzorky neznámého složení může být antioxidační aktivity vyjádřena jako α-tokoferol ekvivalent [124, 178].

Vzhledem k tomu, že antioxidační aktivita souvisí s obsahem polyfenolických látek, stanovení polyfenolů s využitím Folin-Ciocalteuova (F-C) činidla se stalo rutinní metodou využívanou na sledování polyfenolů v různých biologických systémech. Princip spočívá v redukci F-C činidla polyfenoly přítomnými ve vzorku za vzniku modrého zbarvení s absorpčním maximem při 765 nm. Tato metoda kvantifikuje celkové polyfenoly nebo redukční schopnost vzhledem ke standardu fenolové kyseliny. Nejčastěji používaným standardem při stanovení TPC je kyselina gallová, výsledná koncentrace polyfenolů se pak

vyjadřuje jako GAE (*ekvivalent kyseliny gallové*) [116, 176, 178, 179]. Případně lze využít i kyselinu chlorogenovou [180].

Stanovení celkového obsahu flavonoidů, jakožto skupiny polyfenolů, se rovněž stalo rutinní metodou charakterizující antioxidační vlastnosti potravin. Při stanovení obsahu flavonoidů kolorimetrickými metodami se nejčastěji používá buď stabilní komplex chloridu hlinitého (specifický pro flakony a flavanoly) nebo 2,4-nitrofenylhydrazin (specifický pro flavanony). Při použití komplexu chloridu hlinitého se jako standard využívá katechin (absorbance se měří při 510 nm) výsledky se vyjádří jako CEQ (*katechin ekvivalent*) [179], kvercetin/isokvercetin (absorbance se měří při 415 nm) – QE (*iso/kvercetin ekvivalent*) [180, 181] nebo rutin – RE (*rutin ekvivalent*, absorbance se měří při 510 nm). Jako referenční standard při použití 2,4-dinitrofenylhydrazinu se využívá naringenin a absorbance se měří při 495 nm [182]. Lze využít 2-aminoetyl-difenylborát jako reakční činidlo, výsledky se pak vyjádří jako RE [183]. K identifikaci jednotlivých flavonoidů se efektivně využívá kapalinová chromatografie LC a HPLC [184-187].

Taniny (trísloviny) jsou rostlinné polyfenoly trpké, svíravé a hořké chuti, které sráží proteiny. Rozdělují se na kondenzované taniny (polymery flavonových jednotek) a hydrolyzovatelné taniny (estery kyseliny gallové a glukózy nebo jiných cukrů). Metody stanovení kondenzovaných taninů je založeny na jejich reakci s aldehydy (např. vanilín, p-dimethylaminocinnamaldehyd) v kyselém prostředí za vzniku barevných sloučenin měřených spektrofotometricky při 500 nm [188-190], resp. 640 nm [189, 190]. Hydrolyzovatelné tanniny jsou nejčastěji stanovovány po kyselé hydrolyze, která vede k uvolnění příslušné kyseliny (např. kyseliny gallové), která je měřena pomocí HPLC-DAD, HPLC-MS nebo GC. Tyto metody se využívají při identifikaci jednotlivých kondenzovaných taninů, např. proantokyanidinů [188, 190, 191]. Je možné i využití NMR spektroskopie při identifikaci jednotlivých taninů [188, 192].

Stanovení celkového obsahu anthokyanů, přirozeně se vyskytujících fenolických látek, je nejčastěji realizováno spektroskopickou pH-diferenční metodou, která je založena na změně absorpčního spektra anthokyanů v závislosti na pH. Měří se absorbance směsi extraktu vzorku a pufru o hodnotě pH=1.0 a pH=4.5 při vlnové délce 510 nm a 700 nm. Forma vyjádření výsledků pro jednotlivé druhy vzorků je volena s ohledem na dominantní anthokyanin v daném vzorku, např. kyanidin-3-glukosid (nejčastěji se vyskytující anthokyanin v ovoci) [193-195], malvidin-3-glukosid (borůvky, růžové hrozny), pelargonidin-3-glukosid (jahody) [196]. Dalším způsobem vyjádření celkového obsahu anthokyanů je metoda založená na jejich extrakci ve vzorku směsí metanolu okyseleného HCl, a měří se absorbance takto připravené směsi při 535 nm, přičemž výsledky se vyjádří jako kyanidin-3-glukosid [197] nebo kumarin ekvivalent [198]. Identifikace jednotlivých anthokyanů je realizována pomocí HPLC s UV/VIS detekcí [197, 199] nebo detekcí v diodovém poli [195, 200].

V rámci hodnocení antioxidační aktivity potravin je ve vzorcích často sledován i celkový obsah karotenoidů. Základem spektroskopického stanovení karotenoidů je jejich extrakce ze vzorku, saponifikace a následné změření absorbance při 450 nm, výsledky se vyjádří jako β -karoten ekvivalent [201, 202]. Ke stanovení jednotlivých karotenoidů (např. β -karoten, lutein, zeaxantin) se využívají metody HPLC s UV/VIS detekcí [202, 203] nebo HPLC-DAD-APCI-MS [204, 205], s využitím β -karotenu, luteinu nebo chlorofylu jako standardů.

3.4 Další experimentální techniky využití na charakterizaci vzorků

V rámci výše uvedených projektů řešených na Oddělení chemie a analýzy potravin VÚP, se na komplexní charakterizaci studovaných vzorků mimo EPR a UV/VIS spektroskopie využily i metody atomové absorpční spektroskopie, kapilární izotachofórze, HPLC a GC analýzy. Tímto děkuji za spolupráci všem kolegům podílejících se na realizaci těchto experimentů.

Atomový absorpční spektrometer „PERKIN ELMER 4100“ s HGA 700 nebo s hořákem a autosamplerm AS 70 (Perkin Elmer, USA) byl využit při stanovení mikro- (Ag, Ba, Cd, Hg, Pb, Rb, Sr) a makroprvků (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn) v ekologických a konvenčních hroznech a vínech. Tyto prvky byly rovněž stanoveny i v půdách vinogradů v režimu ekologického (Pustatina, Natural Alimentaria, Velký Krtíš) a konvenčního (Bušnice, Agro-Movino, Velký Krtíš) zemědělství. Metoda AAS se také využila při stanovení makroprvků v bio- a konvenčních pšeničných, žitných a špaldových moukách.

Kapilární elektroforetický analyzátor EA 202M (VILLA s.r.o., Spišská Nová Ves, SR) byl využit na stanovení kyselin v biovínech a konvenčních vínech metodu anionické kapilární izotachofórze. Ve vínech se stanovily aniony kyseliny šťavelové, fosforečné, vinné, citrónové, jablečné, asparagové, jantarové, octové, maleinové, glykolové, glukonové, malonové a sírové.

LC/ESI-MS-MS analýza kvantitativního stanovení volných aminokyselin v studovaných vínech a moukách byly realizována pomocí HPLC systému Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA) skládajícího se z binární pumpy, autosampleru a termostatu kolón, spojeného s hmotnostním detektorem Agilent 6410 Triple Quad a ESI ionovým.

Systém HPLC Agilent 1210 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s gradientovým čerpadlem, autosamplerm a DAD detektorem se využil na stanovení vybraných fenolických kyselin (např. kyselina gallová, 4-hydroxybenzoová, kofeinová, ferulová, sinapová, salicylová) v ekologických a konvenčních vínech, dále pak na stanovení 5-hydroxymetylfurfuralu (HMF) v ovocných šťávách. Systém HPLC Agilent 1100 s DAD detektorem byl využit na stanovení polyfenolů ve vínech, především (+)-katechinu a (-)-epikatechinu ze skupiny flavanolů, rutinu a kvercetinů ze skupiny flavonolů, hesperidinu ze skupiny flavanonů a resveratrolu ze skupiny stilbénů, v neposlední řadě pak ke stanovení koncentrace kyseliny askorbové. Systém HPLC Agilent 1100 s RID detektorem byl využit ke stanovení sacharidů (glukóza, fruktóza a sacharóza) a glycerolu ve vínech. Uvedené sacharidy byly rovněž stanoveny ve vzorcích pšeničných, žitných a špaldových mouk.

Plynový chromatograf HP 5890 II (Hewlett Packard, USA) s FID detektorem byl využit na analýzu prchavých aromatických látek ve víně a 100% šťáv z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou. Jednotlivé sloučeniny byly identifikovány hmotností spektrometrií pomocí plynového chromatograf Agilent 6890N (Agilent Technologies, USA), kombinovaného s MS detektorem Agilent 5973.

Uvedené metody byly akreditovány v rámci jejich využívání v podmínkách akreditované laboratoře VÚP Bratislava.

4. CÍLE PRÁCE

Cíle dizertační práce je možné rámcově definovat následovně:

- Vypracování, resp. adaptace objektivních kritérií na posouzení a hodnocení kvality různých potravin a nápojů, z hlediska jejich antioxidační aktivity.
- Zpracování komplexní studie vlivu produkčních a technologicko-zpracovatelských operací na antioxidační status vybraných potravin resp. obsah tzv. funkčních složek na vlastnosti funkčních potravin.
- Sledování georeferenčních a environmentálních markerů slovenských biovín za účelem jejich autentifikace a vypracování objektivních postupů pro jejich diferenciaci od vín vyráběných klasickými pěstitelsko-zpracovatelskými postupy.
- Komplexní charakterizace antioxidačních vlastností ekologických a konvenčních mouk s cílem diferencovat je podle zvolených kritérií (sezóna, produkční systém, původ, odrůda).
- Studium stability ananasových a pomerančových šťáv v průběhu skladování v závislosti na různých technologických postupech (inovací v samotném výrobním postupu, aplikace aktivních obalových materiálů s cílem prodloužit trvanlivost výrobku).

Uvedených cílů bude dosaženo zejména následovnými postupy:

- Pomocí kombinace moderních analytických, spektroskopických a statistických metod (zejména EPR, UV-VIS-NIR, HPLC a metod multivariační statistiky) prostudovat a vzájemně korelovat všechny relevantní parametry - charakteristiky vybraných modelových systémů, s hlavním důrazem na jejich antioxidační vlastnosti.
- Sledování obsahu jednotlivých potenciálně zajímavých (funkčních) složek a změn v jejich složení v důsledku technologické úpravy, skladování, termického nebo světelného namáhání, resp. expozice oxidačnímu stresu, a to jak z kvalitativního, tak i kvantitativního hlediska vybraných komodit potravin.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál

5.1.1 Vzorky biovín a konvenčních vín

Slovenské biovína a konvenční odrůdová vína byla vyprodukována ve středoslovenské vinohradnické oblasti Modrý Kameň. Geografická příbuznost komparovaných vín výrazně redukuje efekt půdních a klimatických podmínek na kvalitu hroznů a klade větší předpoklady na objektivnější porovnávání kompozice vín podle způsobu pěstování vinné révy.

Detailní popis analyzovaných vzorků vín je uveden v Tab. 4.

Tab. 4: Seznam analyzovaných slovenských a zahraničních biovín a konvenčních vín.

ID	Odrůda	Ročník	Charakteristika
Slovenská vína			
Biovína – bílá vína			
BW1	Chardonnay	2009	Suché, 11.5% alk.
BW2	Chardonnay	2002	Suché, Výběr z hroznů, 13% alk.
BW3	Tramín červený	2003	Suché, Kabinet, 12.5% alk.
BW4	Ryzlink vlašský	2002	Polosuché, Kabinet, 11.5% alk.
BW5	Ryzlink rýnský	2002	Suché, Pozdní sběr, 12% alk.
BW6	Chardonnay	2008	Suché, Pozdní sběr, 13% alk.
BW7	Rulandské bílé	2008	Suché, Pozdní sběr, 13% alk.
BW8	Tramín červený	2008	Suché, Pozdní sběr, 12.5% alk.
BW9	Rulandské bílé	2008	Suché, Pozdní sběr, 13% alk.
BW10	Rulandské bílé	2007	Polosuché, Pozdní sběr, 13.5% alk.
BW11	Rulandské bílé	2009	Suché, Výběr z hroznů, 13.5% alk.
BW12	Chardonnay	2009	Suché, Pozdní sběr, Mešní, 13% alk.
BW13	Chardonnay	2006	Polosuché, Výběr z hroznů, 12.5% alk.
BW14	Rulandské bílé	2007	Polosuché, Výběr z hroznů, 13.5% alk.
BW15	Cabernet Sauvignon	2007	Suché, Pozdní sběr, Růžové, 12% alk.
BW16	Rulandské šedé	2010	Suché, Pozdní sběr, 12.7% alk.
BW17	Tramín červený	2009	Suché, Výběr z hroznů, 11.5% alk.
BW18	Chardonnay	2011	Suché, Výběr z hroznů, 14.2% alk.
BW19	Rulandské bílé	2011	Suché
Biovína – červená vína			
BR20	Frankovka modrá	2003	Suché, Pozdní sběr, 12.8% alk.
BR21	Rulandské modré	2007	Suché, Výběr z hroznů, 13% alk.
BR22	Cabernet Sauvignon	2008	Suché, Pozdní sběr, 12.5% alk.
BR23	Rulandské modré	2007	Suché, Výběr z hroznů, 13% alk.
BR24	Cabernet Sauvignon	2008	Suché, Pozdní sběr, 12.5% alk.
BR25	Rulandské modré	2009	Suché, Výběr z hroznů, 11.5% alk.
BR26	Cabernet Sauvignon	2009	Suché, Výběr z hroznů, 14.2% alk.
BR27	Cabernet Sauvignon	2011	Suché
Konvenční vína – bílá vína			
CW1	Chardonnay	2003	Suché, 12.5% alk.
CW2	Chardonnay	2004	Suché, 11.5% alk.
CW3	Tramín červený	2003	Suché, Výběr z hroznů, 11% alk.
CW4	Ryzlink vlašský	2003	Suché, 11% alk.
CW5	Ryzlink rýnský	2003	Suché, Výběr z hroznů, 12.5% alk.
CW6	Tramín červený	2006	Polosladké, Bobulový výběr, 12.5% alk.
CW7	Rulandské bílé	2008	Suché, Pozdní sběr, 12.5% alk.
CW8	Chardonnay	2008	Suché, Pozdní sběr, 9.5% alk.
CW9	Rulandské bílé	2008	Suché, 11% alk.
CW10	Ryzlink rýnský	2008	Suché, 11.5% alk.
CW11	Rulandské bílé	2009	Suché, Pozdní sběr, 13% alk.
CW12	Chardonnay	2009	Polosuché, Pozdní sběr, 13.5% alk.
CW13	Chardonnay	2008	Suché, Pozdní sběr, 11.5% alk.
CW14	Rulandské bílé	2008	Suché, 13% alk.

Tab. 4 (pokr.): Seznam analyzovaných slovenských a zahraničních biovín a konvenčních vín.

ID	Odrůda	Ročník	Charakteristika
CW15	Rulandské bílé	2009	Sladké, Bobulový výběr, 11% alk.
CW16	Tramín červený	2008	Suché, 12% alk.
CW17	Tramín červený	2008	Polosladké, Výběr z hroznů, 12% alk.
CW18	Chardonnay	2009	Suché, Výběr z hroznů, 14.5% alk.
CW19	Rulandské bílé	2009	Suché, Výběr z hroznů, 13% alk.
CW20	Tramín červený	2009	Suché, 12% alk.
CW21	Chardonnay	2011	Suché, Pozdní sběr, 12% alk.
CW22	Tramín červený	2011	Suché, 11.5% alk.
CW23	Rulandské bílé	2008	Suché, 12% alk.
Konvenční vína- červená vína			
CR24	Frankovka modrá	2003	Suché, Výběr z hroznů, 12.5% alk.
CR25	Frankovka modrá	2004	Suché, 11% alk.
CR26	Frankovka modrá	2008	Suché, Pozdní sběr, 13% alk.
CR27	Frankovka modrá	2008	Suché, 11% alk.
CR28	Cabernet Sauvignon	2008	Suché, Výběr z hroznů, 13% alk.
CR29	Frankovka modrá	2008	Suché, Pozdní sběr, 12.5% alk.
CR30	Cabernet Sauvignon	2008	Suché, Pozdní sběr, 13% alk.
CR31	Cabernet Sauvignon	2008	Suché, Výběr z hroznů, 12% alk.
CR32	Rulandské modré	2008	Suché, 12% alk.
CR33	Rulandské modré	2009	Polosladké, Bobulový výběr, 13.5% alk.
CR34	Cabernet Sauvignon	2009	Suché, 12% alk.
CR35	Rulandské modré	2009	Suché, Jakostní víno, 11.5% alk.
Zahraníční vína			
Biovína – bílá vína			
BW1-IT	Chardonnay	2010	Suché, 12% alk.
BW2-CZ	Rulandské bílé	2009	Polosladké, Pozdní sběr, 11.5% alk., Čejkovice
BW3-CZ	Tramín červený	2009	Polosladké, Pozdní sběr, 13% alk., Čejkovice
BW4-A	Veltlín zelený	2011	Suché, 12.5% alk., Niederösterreich
Biovína – červená vína			
BR5-CZ	Rulandské modré	2009	Suché, Pozdní sběr, 12.5% al., Čejkovice
BR6-CZ	Cabernet Sauvignon	2007	Suché, 12.5% alk., Paulov
Konvenční vína – bílá vína			
CW1-H	Chardonnay	2010	Suché, 11% alk., Szekszárd
CW2-CZ	Tramín červený	2011	Suché, 12% alk., Čejkovice
CW3-A	Veltlín zelený	2011	Suché, 12.5% alk., Niederösterreich
Konvenční vína – červená vína			
CR4-A	Rulandské modré	2010	Suché, 13% alk., Burgenland
CR5-CZ	Rulandské modré	2010	Suché, 11.5% alk., Čejkovice
CR6-H	Cabernet Sauvignon	2009	Suché, 12% alk., Hajós-Bajai

Slovenská biovína byla dodána společností Natural Alimentaria, která je jediným certifikovaným producentem biovín na Slovensku. Tyto vína jsou certifikované Inspekční službou Naturalis SK. Producentem slovenských konvenčních odrůdových vín modrokamenského vinohradnického regionu byla společnost Agro-Movino, s.r.o. Kromě slovenských biovín byla část studie zaměřena i na charakterizaci komerčně dostupných biovín z České republiky (CZ), Rakouska (A), Itálie (IT) a Maďarska (HU), jejichž počet je značně limitován vzhledem k jejich dostupnosti v slovenské maloobchodní síti. Cílem bylo následně provést test schopnosti použitých modelů diferencovat vzorky vín podle geografické příslušnosti. Celkově bylo analyzováno 33 biovín (27 SK, 4 CZ, 1 AT, 1 IT) a 41 konvenčních vín (35 SK, 2 CZ, 2 AT, 2 HU) různých ročníků, od roku 2002 do 2011, přičemž dominantními odrůdami byly Chardonnay, Tramín červený, Rulandské bílé, Rulandské modré a Cabernet Sauvignon. Převážně se jednalo o odrůdové suchá vína s přívlastkem, výběr z

hroznů nebo pozdní sběr. Z celé skupiny bylo pouze 14 vzorků párových vín, tj. vín stejného ročníku a odrůdy, ale odlišného produkčního systému.

5.1.2 Vzorky mouk

Optimalizace extrakčních podmínek byla realizována na souboru 20 komerčně dostupných slovenských a maďarských mouk získaných ekologickými a konvenčními zemědělskými postupy, jejichž seznam je uveden v Tab. 5. Extrakční činidlo s nejvyšší účinností bylo následně použito pro přípravu extraktů špaldových mouk připravených z pšenice špaldy z reálných polních pokusů realizovaných v rámci řešení projektů, které s danou problematikou souvisely.

Tab. 5: Seznam vzorků slovenských a maďarských mouk použitých pro optimalizaci extrakčních podmínek.

ID	Druh mouky	Původ	ID	Druh mouky	Původ
F1	Bio pšeničná celozrná hladká	SK	F11	Bio žitná celozrná kamen	HU
F2	Bio pšeničná celozrná	HU	F12	Bio žitná bílá (světlá)	HU
F3	Bio pšeničná celozrná kamen	HU	F13	Konv. žitná celozrná hladká	SK
F4	Bio pšeničná bílá (světlá)	HU	F14	Bio špaldová celozrná hladká	SK
F5	Konv. pšeničná celozrná hladká	SK	F15	Bio špaldová celozrná	HU
F6	Konv. pšeničná polohrubá výběrová	SK	F16	Bio špaldová celozrná kamen	HU
F7	Konv. pšeničná hrubá	SK	F17	Bio špaldová bílá (světlá)	HU
F8	Konv. pšeničná hladká speciál	SK	F18	Konv. špaldová celozrná hladká	SK
F9	Bio žitná celozrná hladká	SK	F19	Bio špaldová hladká	SK
F10	Bio žitná celozrná	HU	F20	Bio špaldová celozrná hrubá	SK

Reálné vzorky špaldových mouk byly připraveny ze dvou odrůd špaldy, ÖKO-10 a Lajta, pěstovaných za podmínek ekologického a konvenčního zemědělství v letech 2010/2011 a 2011/2012 na území Slovenska a Maďarska. V roce 2011 byly analyzovány pouze vzorky maďarských mouk z regionů Rábcakapi (polní pokusy realizované v režimu ekologického zemědělství), Mosonmagyaróvár a Sopronkövesd (v režimu konvenčního zemědělství), v roce 2012 pak byla skupina vzorků rozšířena i o vzorky slovenských mouk pěstovaných v oblasti Sládkovičovo (ekologické zemědělství) a Lehnice (konvenční zemědělství). Pšenice špalda (ÖKO-10 i Lajta) byla pěstována na celkové výměře 120x48 m, přičemž byla ošetřena přípravky (přihnojována) podle schématu na Obr. 11. Způsob ošetření byl identický pro maďarskou i slovenskou stranu. V Tab. 6 je uveden seznam analyzovaných vzorků špaldových mouk.

ÖKO-10				
Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Parcela 4	Parcela 5
Kontrola/ reference	Azoter	NPK / Vinasz (BIO)	Biokál 01	Greensoil PK+Ca+S
Na jaře neošetřeno Biokálem (10 l/ha)				
Na jaře ošetřeno Biokálem (10 l/ha)				
24 m	24 m	24 m	24 m	24 m

120 m

24 m

24 m

Charakteristika ošetření pšenice špaldy při polních pokusech na území Maďarska a Slovenska

Parcela	Ošetření	Množství přípravku na ošetření Podzim	Jaro	Jednotka
1	Kontrola/reference	0	0	-
2	Azoter	10	0	l/ha
3	NPK/ Vinasz (BIO)	200	50	kg/ha
4	Biokál 01	10	10	l/ha
5	Greensoil PK+Ca+S	200	0	kg/ha

Obr. 11: Plán polních pokusů na území Maďarska a Slovenska a charakteristika jednotlivých způsobů ošetření pšenice špaldy.

Tab. 6: Seznam analyzovaných vzorků špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta získaných z polních pokusů realizovaných na území Maďarska a Slovenska.

ID	Odrůda	Ošetření	Původ	ID	Odrůda	Ošetření	Původ
<i>Region Mosonmagyaróvár 2011</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
30	Lajta, konv.	1	HU	34	ÖKO-10, bio	4	HU
31	ÖKO-10, konv.	1	HU	35	ÖKO-10, konv.	4	HU
32	ÖKO-10, bio	1	HU	36	ÖKO-10, konv	3	HU
33	ÖKO-10, bio	1	HU	37	ÖKO-10, konv	1	HU
40	ÖKO-10, konv.	3	HU	38	ÖKO-10, konv.	5	HU
41	ÖKO-10, konv.	4	HU	39	ÖKO-10, konv.	2	HU
42	ÖKO-10, konv.	1	HU	45	Lajta, konv.	2	HU
43	ÖKO-10, konv.	5	HU	46	Lajta, konv.	3	HU
44	ÖKO-10, konv.	2	HU	47	Lajta, konv.	4	HU
50	Lajta, konv.	2	HU	48	Lajta, konv.	5	HU
51	Lajta, konv.	4	HU	49	Lajta, konv.	1	HU
52	Lajta, konv.	5	HU				
53	Lajta, konv.	3	HU				
54	Lajta, konv.	1	HU				
<i>Region Soprokövesd 2011</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
56	Lajta, konv.	1	HU	60	Lajta, konv.	4	HU
57	Lajta, konv.	5	HU	63	Lajta, konv.	3	HU
58	Lajta, konv.	4	HU	64	Lajta, konv.	1	HU
59	Lajta, konv.	2	HU	67	Lajta, konv.	2	HU
69	Lajta, konv.	3	HU	70	Lajta, konv.	5	HU
<i>Region Rabcakapi 2011</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
65	Lajta, bio	5	HU	61	Lajta, bio	2	HU
72	Lajta, bio	1	HU	68	Lajta, bio	1	HU
82	Lajta, bio	2	HU	81	Lajta, bio	4	HU
91	Lajta, bio	3	HU	84	Lajta, bio	5	HU
92	Lajta, bio	4	HU	90	Lajta, bio	3	HU
62	ÖKO-10, bio	4	HU	80	ÖKO-10, bio	1	HU
66	ÖKO-10, bio	3	HU	71	ÖKO-10, bio	3	HU
83	ÖKO-10, bio	5	HU	85	ÖKO-10, bio	5	HU
87	ÖKO-10, bio	1	HU	86	ÖKO-10, bio	4	HU
89	ÖKO-10, bio	2	HU	88	ÖKO-10, bio	2	HU
<i>Region Soprokövesd 2012</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
96	ÖKO-10, konv.	1	HU	101	ÖKO-10, konv.	1	HU
97	ÖKO-10, konv.	2	HU	102	ÖKO-10, konv.	2	HU
98	ÖKO-10, konv.	3	HU	103	ÖKO-10, konv.	3	HU
99	ÖKO-10, konv.	4	HU	104	ÖKO-10, konv.	4	HU
100	ÖKO-10, konv.	5	HU	105	ÖKO-10, konv.	5	HU
111	Lajta, konv.	2	HU	106	Lajta, konv.	2	HU
112	Lajta, konv.	4	HU	107	Lajta, konv.	4	HU
113	Lajta, konv.	5	HU	108	Lajta, konv.	5	HU
114	Lajta, konv.	1	HU	109	Lajta, konv.	1	HU
115	Lajta, konv.	3	HU	110	Lajta, konv.	3	HU
<i>Region Mosonmagyaróvár 2012</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
121	ÖKO-10, konv.	2	HU	116	ÖKO-10, konv.	1	HU
122	ÖKO-10, konv.	4	HU	117	ÖKO-10, konv.	2	HU
123	ÖKO-10, konv.	5	HU	118	ÖKO-10, konv.	3	HU
124	ÖKO-10, konv.	1	HU	119	ÖKO-10, konv.	4	HU
125	ÖKO-10, konv.	3	HU	120	ÖKO-10, konv.	5	HU
131	Lajta, konv.	2	HU	126	Lajta, konv.	1	HU
132	Lajta, konv.	4	HU	127	Lajta, konv.	2	HU
133	Lajta, konv.	5	HU	128	Lajta, konv.	3	HU
134	Lajta, konv.	1	HU	129	Lajta, konv.	4	HU

Tab. 6 (pokr.): Seznam analyzovaných vzorků špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta získaných z polních pokusů realizovaných na území Maďarska a Slovenska.

ID	Odrůda	Ošetření	Původ	ID	Odrůda	Ošetření	Původ
135	Lajta, konv.	3	HU	130	Lajta, konv.	5	HU
<i>Region Rabcakapi 2012</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
141	Lajta, bio	1	HU	136	Lajta, bio	1	HU
142	Lajta, bio	2	HU	137	Lajta, bio	2	HU
143	Lajta, bio	3	HU	138	Lajta, bio	3	HU
144	Lajta, bio	4	HU	139	Lajta, bio	4	HU
145	Lajta, bio	5	HU	140	Lajta, bio	5	HU
151	ÖKO-10, bio	2	HU	146	ÖKO-10, bio	2	HU
152	ÖKO-10, bio	4	HU	147	ÖKO-10, bio	4	HU
153	ÖKO-10, bio	5	HU	148	ÖKO-10, bio	5	HU
154	ÖKO-10, bio	1	HU	149	ÖKO-10, bio	1	HU
155	ÖKO-10, bio	3	HU	150	ÖKO-10, bio	3	HU
<i>Region Sládkovičovo 2012</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
157	ÖKO-10, bio	1	SK	156	ÖKO-10, bio	1	SK
162	ÖKO-10, bio	2	SK	163	ÖKO-10, bio	2	SK
165	ÖKO-10, bio	3	SK	164	ÖKO-10, bio	3	SK
170	ÖKO-10, bio	4	SK	171	ÖKO-10, bio	4	SK
173	ÖKO-10, bio	5	SK	172	ÖKO-10, bio	5	SK
159	Lajta, bio	1	SK	158	Lajta, bio	1	SK
160	Lajta, bio	2	SK	161	Lajta, bio	2	SK
167	Lajta, bio	3	SK	166	Lajta, bio	3	SK
168	Lajta, bio	4	SK	169	Lajta, bio	5	SK
175	Lajta, bio	5	SK	174	Lajta, bio	4	SK
<i>Region Lehnice 2012</i>							
Na jaře neošetřeno Biokálem				Na jaře ošetřeno Biokálem			
177	ÖKO-10, konv.	5	SK	176	ÖKO-10, konv.	5	SK
179	ÖKO-10, konv.	4	SK	178	ÖKO-10, konv.	4	SK
181	ÖKO-10, konv.	3	SK	180	ÖKO-10, konv.	3	SK
183	ÖKO-10, konv.	2	SK	182	ÖKO-10, konv.	2	SK
185	ÖKO-10, konv.	1	SK	184	ÖKO-10, konv.	1	SK
195	Lajta, konv.	5	SK	186	Lajta, konv.	5	SK
188	Lajta, konv.	4	SK	187	Lajta, konv.	4	SK
190	Lajta, konv.	3	SK	189	Lajta, konv.	3	SK
192	Lajta, konv.	2	SK	191	Lajta, konv.	2	SK
194	Lajta, konv.	1	SK	193	Lajta, konv.	1	SK

5.1.2.1 Příprava extraktů špaldových mouk:

Přesně 1 g příslušného vzorku mouky se smíchalo s 20 ml roztoku příslušného rozpouštědla (50% etanol/voda (v/v), 50% aceton/voda (v/v) a voda). Po 1 hodině protřepávání na laboratorní třepačce při rychlosti 150 rpm se směs zcentrifugovala při 20 °C rychlostí 9 200 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl šetrně oddělen a mezi jednotlivými experimenty skladován v temnu při laboratorní teplotě.

5.1.3 Vzorky ovocných šťáv

Změny antioxidační aktivity v průběhu skladování byly sledovány u 100% šťávy připravené z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou a 100% šťávy z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu, oba typy vzorků byly dodány firmou McCarter a. s.

Při výrobě šťáv byly použity dvě odlišné technologie. V prvním případě byly vzorky připraveny klasickou technologií, a po šetrné pasterizaci (95 °C, 20 s) a aseptickém plnění, byly PET láhve uzavřeny klasickým šroubovým uzávěrem (SK38/16; BeriCap, Budenheim,

Německo). V druhém případě byla ve vybraných fázích výroby (skladovací tank, míchací tank) aplikována dusíková atmosféra a PET láhve byly opatřeny šroubovým uzávěrem na bázi zhášečů (absorbérů) kyslíku (SK38/16-O₂S; BeriCap, Budenheim, Německo). Šťávy pak byly skladovány při 7 °C v chladničce.

Výrobce deklarované údaje o složení jednotlivých analyzovaných šťáv:

- **100% šťáva z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou**

Složení: 100% pomerančová šťáva lisovaná za studena. Ošetřeno šetrnou pasterizací. Bez přídavku cukru. Obsahuje přirozeně se vyskytující cukry

Průměrné výživové hodnoty ve 100 ml:

Energetická hodnota: 188 kJ/45 kcal

Bílkoviny: méně jak 1.0 g

Sacharidy: 10.4 g, z toho cukry 10.4 g

Tuky: méně jak 0.5 g, z toho nasycené mastné kyseliny méně jak 0.5 g

Vláknina: méně jak 3 g

Sodík: méně jak 0.025 g

Vitamin C: 36 mg – 45 % DDD



- **100% šťáva z čerstvě lisovaných ananasů, s kousky ananasu**

Složení: 100% ananasová šťáva lisovaná za studena, s kousky ananasu (7 % hmot.). Ošetřeno šetrnou pasterizací. Bez přídavku cukru. Obsahuje přirozeně se vyskytující cukry.

Průměrné výživové hodnoty ve 100 ml:

Energetická hodnota: 216 kJ/51 kcal

Bílkoviny: méně jak 0.4 g

Sacharidy: 11.6 g, z toho cukry 11.6 g

Tuky: méně jak 0.1 g, z toho nasycené mastné kyseliny méně jak 0.1 g

Vláknina: méně jak 1 g

Sodík: méně jak 0.05 g



5.1.3.1 Příprava ovocné šťávy

Příslušný vzorek ovocné šťávy byl před analýzou centrifugován při rychlosti 10 000 rpm při 5 °C po dobu 10 min. Supernatant byl od tuhého podílu šetrně oddělen a mezi jednotlivými měřeními se uchovával v chladničce.

5.2 Laboratorní vybavení

5.2.1 Pomůcky

Bylo využito běžné laboratorní sklo Simax (Kavalier, ČR); automatické pipety (Eppendorf, USA); křemenné kyvety pro UV/VIS oblast (Hellman, Německo); ploché křemenné kyvety pro EPR (Bruker, Německo), plastové vialky (Fisher, SK).

5.2.2 Chemikálie

Při experimentech byl použit hydroxid sodný, p.a. (NaOH, Mikrochem, SK); hydrogenfosforečnan draselný, p.a. (KH₂PO₄, Mikrochem, SK); kyselina gallová (C₇H₆O₅, Merck, Německo); Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich Ltd, Německo); kyselina

tiobarbiturová p.a. ($C_4H_4N_2O_2S$, Sigma Aldrich Ltd, Německo); kyselina trichloroctová, p.a. ($C_2HCl_3O_2$, Merck, Německo); hexakynoželézitan draselný, p.a. ($K_3[Fe(CN)_6]$, Sigma Aldrich Ltd, Německo); chlorid železitý, p.a. ($FeCl_3$, Merck, Německo); uhličitán sodný, p.a. (Na_2CO_3 , Lachema, ČR); kyselina L-askorbová, p.a. (Lachema, ČR); peroxidisíran draselný, p.a. ($K_2S_2O_8$, FLuka, Švýcarsko); etanol (AFT, SK); stabilní volný radikál 2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH, Fluka, Švýcarsko), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid) salt (ABTS, Polysciences, Inc., Velká Británie); 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL, Sigma Aldrich Ltd, Německo); 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO, Sigma Aldrich Ltd, Německo), 2-aminotyl-difenyborát (Sigma Aldrich Ltd, Německo) a deionizovaná voda (Rodem 6, průměrná vodivost do $1\mu S.cm^{-1}$).

5.2.3 Přístroje

Příprava vzorků: analytické váhy AP-110 (Ohaus, Švýcarsko); laboratorní centrifuga s možností chlazení 2-16 KC (Sigma, Německo); laboratorní třepačka Innova 2000 Platform Shaker (New Brunswick Scientific, USA).

Charakterizace vzorků: UV-VIS-NIR spektrofotometr Schimadzu 3600 s příslušenstvím (Schimadzu, Japonsko); portable X-band EPR spektrometr *e-scan* (Bruker, Německo).

5.3 Metody

Mimo EPR a UV/VIS spektroskopie, se na charakterizaci mouk ve spolupráci s ostatními pracovišti VÚP Bratislava využily atomový absorpční spektrometer „PERKIN ELMER 4100“ s HGA 700 nebo s hořákem a autosamplrem AS 70 (Perkin Elmer, USA) pro stanovení kovů (Ca, Cu, Na, K, Mg, Fe, Zn) v moukách, HPLC/MS/MS kapalinový chromatograf 1200 série (Agilent Technologies, USA) s hmotnostním detektorem Agilent 6410 Triple Quad s ESI iónovým zdrojem ke stanovení aminokyselin, HPLC-RID kapalinový chromatograf (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) pro stanovení sacharidů (glukóza, fruktóza a sacharóza), plynový chromatograf GC-6890 N (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) pro stanovení profilu mastných kyselin. Dále byl stanoven obsah popela, sušiny (pomocí sušinových vah IR120, Denver Instrument GmbH, Německo), dusíku (Kjeldahlova metoda), hrubé vlákniny (ANKOM Fiber Analyzer A200, USA), případně další reologické vlastnosti (Mixolab, Chopin Technologies, Francie). Nicméně následující části jsou zaměřeny především na charakterizaci antioxidačních vlastností a radikál-zhášejících vlastností studovaných komod.

5.3.1 UV/VIS experimenty

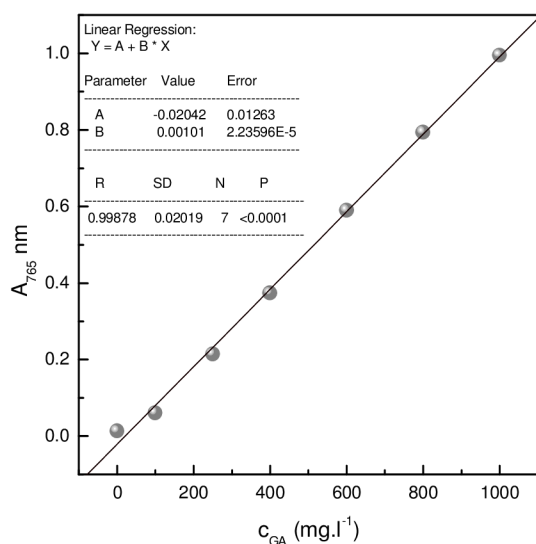
Všechny UV/VIS experimenty byly realizovány pomocí UV-VIS-NIR spektrofotometru Schimadzu 3600 s příslušenstvím.

5.3.1.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC)

Celkový obsah polyfenolů v analyzovaných vzorcích byl stanoven modifikovanou metodou s využitím Folin-Ciocalteuova činidla [206]. Přesně 200 μl vzorku (podle potřeby zředěného 12% etanolem – vína, extrakty mouk neředěné) se smíchalo s 15.8 ml destilované vody a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 3 min se přidaly 3 ml 20% uhličitánu sodného a směs byla důkladně promíchána. Po dobu 60 min se nechala vyvíjet barevná reakce

a následně byla změřena absorbance při 765 nm oproti referenci (vína – 12% etanol, extrakty mouk – 50% etanol, ovocné šťávy – voda).

Stejným postupem byla připravena kalibrační křivka s použitím standardních roztoků kyseliny gallové v koncentračním rozmezí 0–1000 mg.l^{-1} . Výsledky byly vyjádřeny jako GAE (mg.l^{-1}). Pro každou studovanou komoditu byla připravena vždy nová kalibrační křivka. Typická kalibrační křivka využitá pro charakterizaci vín je znázorněna na Obr. 12.

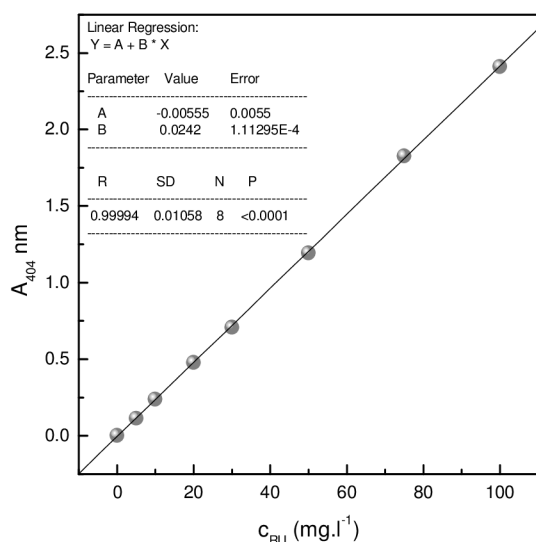


Obr. 12: Kalibrační křivka standardních roztoků kyseliny gallové – závislost absorbance při 765 nm na koncentraci (využitá pro charakterizaci vína).

5.3.1.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů (TFC)

Celkový obsah flavonoidů v příslušných vzorcích (extrakty špaldových mouk) byl stanoven modifikovanou metodou s využitím činidla 2-aminoethyl-difenylborát [183]. Přesně 100 μl 1% roztoku činidla 2-aminoethyl-difenylborátu v 50% směsi etanol/voda (v/v) se smíchalo s 2 ml extraktu špaldové mouky přímo v křemenné UV kyvetě. Směs se důkladně promíchala a po 2 minutách se změřila absorbance roztoku při 404 nm proti referenci (50% etanol ve vodě).

Identickým postupem byla připravena kalibrační křivka s využitím standardních roztoků rutinu v 50% etanole v koncentračním rozmezí 0–100 mg.l^{-1} (Obr. 13). Výsledky byly vyjádřeny jako RE (mg.kg^{-1}).



Obr. 13: Kalibrační křivka standardních roztoků rutinu – závislost absorbance roztoku při 404 nm na koncentraci rutinu.

5.3.1.3 Stanovení oxidačních produktů (TBARS)

Tvorba oxidačních reakčních produktů vín byla stanovena podle modifikované metody Zin et al. a výsledky byly vyjádřeny jako TBARS (*tiobarbituric acid reactive substances*) [207]. Přesně 2 ml 20% kyseliny trichloroctové a 2 ml 0.67% kyseliny tiobarbiturové se přidaly k 1 ml vzorku vína. Směs se umístila do vodní lázně zahřáté na teplotu 95 ± 2 °C po době 10 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs centrifugována při rychlosti 3 000rpm po dobu 20 min. Absorbance supernatantu byla změřena při 532 nm. Jako reference byl použit 12% etanol.

5.3.1.4 Stanovení schopnosti vzorků redukovat železo (FRP)

Schopnost vín redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} byla testována metodou podle Chyau et al. [208]. Příslušný vzorek vína (2 ml) se smíchal s 2 ml 0.2 mol.l^{-1} sodno-fosfátového pufru (pH 6.6) a 2 ml 1% hexakvanoželezitanu draselného, a směs se inkubovala 20 min. ve vodní lázni o teplotě 50 ± 2 °C. Ke směsi se následně přidaly 2 ml 10% kyselina trichloroctové a takto připravená směs se centrifugovala 10 min při rychlosti 3 000 rpm. 500 μl supernatantu bylo smícháno s 2.5 ml destilované vody a 100 μl 0.1% chloridu železitého (bílá vína) přímo v křemenné kyvetě. V případě červených vín se smíchalo 100 μl supernatantu, 2.9 ml dest. vody a 20 μl chloridu železitého. Absorbance směsi byla měřena při 700 nm po dobu 100 s.

5.3.1.5 Stanovení ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivity

Radikál-zhášející aktivita vzorků vín/extraktů špaldových mouk byla testována pomocí roztoku stabilního volného radikálu DPPH^{\bullet} , resp. kation radikálu $\text{ABTS}^{\bullet+}$, připraveného podle Re et al. [209]. V křemenné kyvetě se smíchal přesně 900 μl vzorku (podle potřeby zředěného 12% etanolem (vzorky vína), resp. 50% etanolem (vzorky mouk) s 2.1 ml 0.1 mmol.l^{-1} roztoku DPPH^{\bullet} v etanole, respektive 0.1 mmol.l^{-1} roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Směs byla důkladně promíchána a během 10 s po přidavku radikálu se začala monitorovat absorbance roztoku při 515 nm (DPPH^{\bullet}) a 730 nm ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) po dobu 15 min. Jako reference byl použit 12% etanol (vína) a 50% etanol (extrakty mouk). Měření absorbance roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$, resp. DPPH^{\bullet} při příslušné vlnové délce bylo využito také pro kontrolu koncentrace těchto roztoků při jejich využití v EPR experimentech. Na výpočet přesné koncentrace byly využity molární extinkční koeficienty $\epsilon_{(\text{ABTS}^{\bullet+})} = 1.47 \text{ mmol.l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [209, 210], $\epsilon_{(\text{DPPH}^{\bullet})} = 1.16 \text{ mmol.l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [211].

5.3.2 EPR experimenty

Všechny EPR experimenty byly realizovány pomocí portable X-band EPR spektrometru e-scan (Bruker, Německo) s příslušenstvím. Každé měření bylo provedeno ve dvou opakováních.

5.3.2.1 Monitorování radikál-zhášející aktivity

Vína. Přesně 300 μl příslušného vzorku vína bylo smícháno se 700 μl roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ve vodě (počáteční koncentrace $c_{0(\text{ABTS}^{\bullet+})} = 0.1 \text{ mmol.l}^{-1}$) nebo roztoku DPPH^{\bullet} v etanolu (počáteční koncentrace $c_{0(\text{DPPH}^{\bullet})} = 0.1 \text{ mmol.l}^{-1}$) [212]. V případě TEMPOL testu se smíchal přesně 300 μl roztoku radikálu TEMPOL (počáteční koncentrace $c_{0(\text{TEMPOL})} = 0.1 \text{ mmol.l}^{-1}$) se 700 μl vzorku vína. V případě referenčního systému byl do reakční směsi přidán 12% etanol namísto příslušného vzorku.

Extraktů špaldových mouk. Postup stanovení ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivity extraktů špaldových mouk v 50% etanole byl shodný s postupem popsáním výše pro vína. Jako reference byl u těchto experimentů použit 50% etanol.

Ovocné šťávy. Schopností ovocných šťáv terminovat ABTS^{•+} kation radikál byla testována identickým postupem jako v případě vín a extraktů špaldových mouk. V případě TEMPOL testu se smíchalo přesně 200 μ l příslušné ovocné šťávy s 900 μ l roztoku radikálu TEMPOL (počáteční koncentrace $c_{0(\text{TEMPOL})} = 0.01 \text{ mmol.l}^{-1}$). Jako reference byla použita destilovaná voda.

Směs příslušného radikálu a vzorky byla následně promíchána 2 ml vzduchu a umístěna do ploché EPR kyvety. Měření začalo přesně 3 min po přidavku volného radikálu do systému a sledoval se časový vývoj 10 EPR spekter během 15 min. Každé spektrum představuje akumulaci 30 individuálních scanů.

5.3.2.2 *Technika spinových lapačů v přítomnosti DMPO/K₂S₂O₈*

Přesně 100 μ l roztoku DMPO (25 μ l DMPO/840 μ l vody) ve vodě se smíchalo s 200 μ l pufru (pH = 7), 300 μ l příslušného vína a 250 μ l 0.1 mol.l⁻¹ K₂S₂O₈. Stejně jako v případě předchozích testů, byla směs následně promíchána 2 ml vzduchu a umístěna do ploché křemenné EPR kyvety. Měření začalo přesně 3 min po přidavku K₂S₂O₈, přičemž se sledoval časový vývoj 15 EPR spekter během 30 min. Každé spektrum představuje akumulaci 30 individuálních scanů. Při použití tohoto systému sledujeme antioxidační aktivitu jako výsledek konkurenčních reakcí mezi spinovým lapačem DMPO a antioxidanty přítomnými ve vzorku prostřednictvím tvorby spinových duktů, dominantně [•]DMPO-OH, pokud není v následujících částech uvedeno jinak.

5.3.2.3 *Podmínky EPR měření*

Všechna měření byla realizována pomocí ploché křemenné kyvety, vhodné pro EPR měření. Kyveta s vnitřním objemem 500 μ l byla opatřena injekční stříkačkou s objemem 2 ml pro ulehčení plnění měřeným vzorkem.

Kyveta byla umístěna do dutiny EPR spektrometru a po nastavení parametrů měření se začal sledovat časový vývoj 10 EPR spekter během 15 min ([•]DPPH, ABTS^{•+}, TEMPOL) resp. 15 EPR spekter po dobu 30 min (DMPO/K₂S₂O₈), a to přesně 3 min po přidavku radikálu ([•]DPPH, ABTS^{•+}, TEMPOL) resp. K₂S₂O₈ do systému.

Typické parametry – nastavení EPR spektrometru:

- | | |
|-------------------------------------|--|
| ▪ střed pole – central field (CF) | 346.5 mT ([•] DPPH, ABTS ^{•+});
346.1 mT (TEMPOL);
346 mT (DMPO) |
| ▪ šířka pole – sweep width (SW) | 10 mT (DMPO, 9 mT) |
| ▪ modulace – modulation amplitude | 0.05 mT (DMPO, 0.15 mT) |
| ▪ zesílení – receiver gain | $3.99 \cdot 10^3$, (DMPO, $2 \cdot 10^3$) |
| ▪ výkon mikrovlnného zdroje | 6 mW |
| ▪ frekvence mikrovlnného záření | 9.71 GHz |
| ▪ časový rozdíl mezi spektry | $\Delta t = 1.5 \text{ min}$ (DMPO, $\Delta t = 2 \text{ min}$) |
| ▪ časová konstanta | 10.24 ms |
| ▪ délka 1 scanu | 2.62 s |
| ▪ počet scanů – numer of scans (NS) | 30 |
| ▪ počet snímaných spekter | 10 (DMPO, 15) |

5.3.2.4 Zpracování experimentálních dat

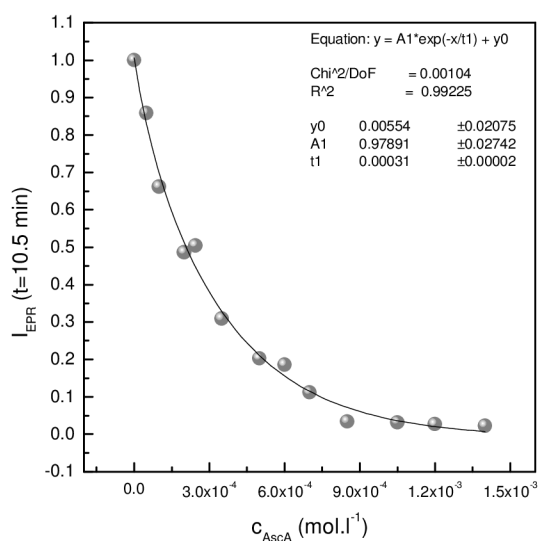
Pro všechny experimentální systémy se realizovala série 2 identických experimentů, a to pro každý vzorek. Naměřená EPR spektra byla zpracována v programech ORIGIN (MicroCalc[®]), WinEPR (Bruker[®]) a pomocí programu SCIENTIST (MicroMath[®]).

Pro kvalitativní porovnání radikál-zhášející aktivity jednotlivých složek byly zvoleny dva přístupy. V prvním případě, radikál-zhášející aktivita vín, resp. extraktů špaldových mouk oproti radikálům $\cdot\text{DPPH}$ nebo $\text{ABTS}^{+\cdot}$ charakterizovaná jak UV/VIS, tak i EPR spektroskopii, byla vyjádřena jako hodnota TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*). Hodnoty TEAC byly vypočítány pro hodnoty koncentrace $\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot}$ (dvojitý integrál EPR spektra) nebo absorbance roztoku (UV/VIS experimenty) naměřené v čase 10.5 min po přidání příslušného radikálu do systému, podle vztahu:

$$\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot}} = \frac{(c_{0(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot})} - c_{t(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot})}) * V_{(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot})} * v * Z}{V_{(\text{vzorku})}} \quad (24)$$

- kde: $c_{0(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot})}$ je počáteční koncentrace/absorbance roztoku $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{+\cdot}$);
 $c_{t(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot})}$ je koncentrace/absorbance roztoku $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) po jejich přidavku do systému ve zvoleném čase t ($t = 10.5$ min);
 $V_{(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{+\cdot})}$ je objem $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) přidaného do systému;
 $V_{(\text{vzorku})}$ je objem vzorku přidaného do systému;
 v je stechiometrický koeficient reakce $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) a TROLOX (v obou případech, $v = 1/2$);
 Z je faktor zředění.

Schopnost vín terminovat radikál TEMPOL byla vyjádřena jako hodnota AAE (*Ascorbic acid equivalent*). Přepočet koncentrace TEMPOL (dvojitý integrál EPR spektra v čase 10.5 min po jeho přidání do systému) byl realizován pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardních roztoků kyseliny askorbové v koncentračním rozmezí $c_{(\text{AA})} = 0\text{--}8.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (charakterizace vína, Obr. 14) a $c_{(\text{AA})} = 0\text{--}1.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ (charakterizace ovocných šťáv).



Obr. 14: Kalibrační křivka standardních roztoků kyseliny askorbové – závislost relativní intenzity EPR spektra (dvojitý integrál v čase $t = 10.5$ min po přidání TEMPOL do systému) na koncentraci (využitá při charakterizaci vín).

V druhém přístupu, pro odhad schopnosti jednotlivých vín terminovat radikály DPPH^{\bullet} , $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a TEMPOL byla závislost koncentrace příslušného radikálu na čase popsána kinetickou rovnicí prvního řádu a v programu SCIENTIST pomocí nelineární regrese použitím Newtonové relaxované iterační metody vypočítané formální rychlostní konstanty k' , podle vztahu:

$$\ln(I_{\text{EPR}}) = \ln(I_{\text{EPR}}^{t=0}) + k' \cdot t \quad (25)$$

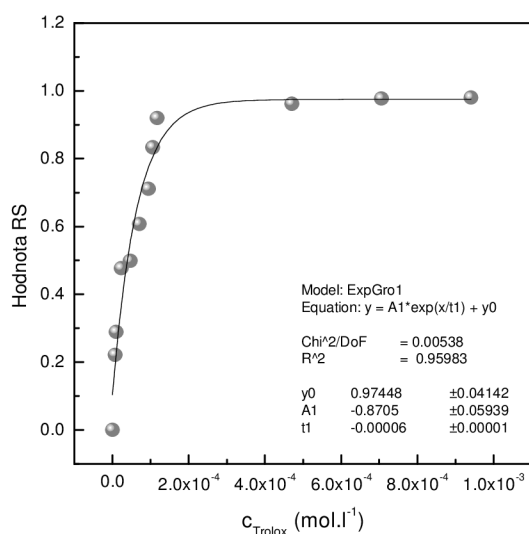
kde: I_{EPR} je dvojitý integrál EPR spektra;
 k' je formální rychlostní konstanta (min^{-1});
 t je čas po přidání $\text{DPPH}^{\bullet}/\text{ABTS}^{\bullet+}/\text{TEMPOL}$ do systému (min).

Antioxidační aktivita vzorků testována technikou spinových lapačů v přítomnosti $\text{DMPO}/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ byla vyjádřena jako hodnota $\%RS$ (*Radical scavenged, %* zhášených radikálů) [213, 214], která přímo vyjadřuje antioxidační schopnost příslušného vzorku, resp. jeho schopnost eliminovat radikály vznikající v experimentálním systému. Hodnota $\%RS$ se vypočítala podle rovnice:

$$\%RS = \left(1 - \frac{I_{sp(15)} - I_{sp(1)}}{I_{ref(15)} - I_{ref(1)}} \right) * 100 \quad (26)$$

kde: $I_{sp/ref(15)}$ představuje intenzitu 15. spektra příslušného vzorku, resp. reference
 $I_{sp/ref(1)}$ představuje intenzitu 1. spektra příslušného vzorku, resp. reference.

Tento vztah zohledňuje také proměnlivou intenzitu spektra (koncentraci spinových aduktů) na začátku měření. Hodnoty $\%RS$ byly následně přepočítány na hodnoty $\text{TEAC}_{\text{DMPO}}$ podobně jako v práci Zalibera *et. al.* [214, 215], pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardních roztoků Troloxu v koncentračním rozmezí $0-9.4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v systému $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{DMPO}$.



Obr. 15: Kalibrační křivka standardních roztoků Troloxu v systému $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{DMPO}$ – závislost hodnot $\%RS$ vypočtených podle rovnice 26 na koncentraci Troloxu.

5.3.3 Statistické zpracování dat

Na statistické porovnání experimentálních dat byla primárně použito multivariační porovnávání metodou ANOVA – procedura Tukey-HSD (Unistat v. 6.0) pro porovnání významnosti rozdílů skupinových průměrů, kterému předcházelo ověření normality dat podle Studentova rozdělení. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hodnotou $P < 0.05$. Při porovnávání statistických rozdílů kinetických závislostí jednotlivých parametrů antioxidační aktivity v závislosti na odlišných technologických postupech výroby ovocných šťáv byla použita metoda ANOVA – test shody regresních přímek, který ověřuje signifikantnost rozdílů regresních konstant.

Experimentální charakteristiky byly pro velký soubor vzorků zpracovány také metodami vícerozměrné statistiky.

Metoda hlavních komponent (PCA, *Principal component analysis*) patří do skupiny multivariačních metod využívaných při analýze skrytých vztahů mezi proměnnými tak, že se transformuje velký počet potenciálně korelujících experimentálně zjištěných parametrů – proměnných – na menší počet nekorelujících a vzájemně nezávislých hlavních komponent. Komponenty jsou konstruovány tak, že první hlavní komponenta popisuje maximum variability studovaného systému (vlastnosti studovaných vzorků) a každá další komponenta maximum zůstatkové variability. Jednotlivé původní proměnné mají v příslušné komponentě svoji váhu – vlastní vektory – pomocí nichž můžeme usuzovat vliv příslušné proměnné na variabilitu v rámci dané komponenty.

Diskriminační analýza zkoumá zákonitosti v rozdělení do skupin (diskriminační funkce) a formuluje pravidlo (klasifikační funkce), které umožní zařadit nový objekt do konkrétní skupiny. Kanonická diskriminační analýza (CDA – *Canonical discrimination analysis*) hledá a vypočítává diskriminační funkce, přičemž bere do úvahy všechny nezávislé proměnné. Do diskriminační funkce vstupují proměnné postupně a vybírá se vždy ta, která má pro diskriminaci největší přínos. Diskriminace metodou K -tého souseda (K^{th} nearest neighbour) nepočítá klasifikační funkce, ale zařazuje vzorky podle příslušnosti k ní nejbližšímu sousedu.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Komplexní studium antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností biovín a konvenčních vín

Charakterizace antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností slovenských biovín a konvenčních vín byla realizována jako součást projektu č.2/PVV „*Sledovanie georeferenčných a environmentálnych markerov slovenských biovín s cieľom ich autentifikácie a vypracovanie postupov pre ich odlíšenie od vín vyrábaných klasickými postupmi*“ řešeného na pracovišti Výzkumného ústavu potravinářského v letech 2010-2012.

V průběhu řešení projektu se na 33 vzorcích biovín (z toho 6 zahraničních) a 41 vzorcích konvenčních vín (6 zahraničních), sledovalo celkem 15 parametrů – deskriptorů antioxidační aktivity: celkový obsah polyfenolů (TPC), tiobarbiturové číslo (TBARS), schopnost redukovat železité ionty (FRP), % schopnost terminovat radikály (%ABTS^{•+}) a (%[•]DPPH), schopnost terminovat radikály ABTS^{•+} a [•]DPPH vyjádřené jako hodnoty TEAC stanovené z UV/VIS a EPR měření (TEAC_{ABTS^{•+}(UV)}, TEAC_{•DPPH (UV)}, TEAC_{ABTS^{•+} (EPR)}, TEAC_{•DPPH(EPR)}), schopnost zhášet radikál TEMPOL (AAE), hodnoty formálních rychlostních konstant poklesu koncentrace použitých radikálů ($k_{ABTS^{•+}}$, k_{DPPH} , k_{TEMPOL}) a schopnost vín terminovat radikály generované v systému chemickou reakcí v přítomnosti spinového lapače DMPO (%RS, následně přepočtena na TEAC_{DMPO}). Výsledky jednotlivých UV/VIS experimentů jsou uvedeny v Tab. 7, v Tab. 8 pak výsledky EPR experimentů.

Všechny deskriptory antioxidační aktivity studovaných vín byly statisticky zpracovány metodami ANOVA a vybranými metodami multivariační analýzy v rámci hodnocení rozdílů mezi biovín a vín konvenčními.

6.1.1 UV/VIS experimenty

6.1.1.1 Obsah polyfenolických látek ve vzorcích biovín a konvenčních vín

Vědecké studie potvrdily, že antioxidační aktivita pozitivně koreluje s obsahem TPC, jejichž zastoupení a koncentrace může být ovlivňována jak kultivačními, tak i různými enologickými postupy výroby vína [22, 24, 26]. Lze tedy uvažovat o využití parametru TPC jako potenciálního markeru pro diferenciaci ekologicky a konvenčně produkovaných vín.

Obsah TPC v souboru analyzovaných vín byl stanoven Folin-Ciocalteuovou metodou, kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky sestavené ze standardů kyseliny gallové. Výsledné hodnoty TPC, vyjádřené jako GAE, jsou uvedeny v Tab. 7.

Z prezentovaných údajů jsou zřejmé výrazné rozdíly v obsahu polyfenolů mezi jednotlivými vzorky vín. Potvrdil se očekávaný, řádově nižší obsah TPC ve vzorcích bílých vín v porovnání s vín červenými, přičemž z naměřených údajů není zřejmá přímá souvislost mezi obsahem polyfenolických látek a způsobem produkce vína.

Při vzájemné komparaci ekologických a konvenčních vín, průměrný obsah polyfenolů byl vyšší v konvenčních vínech, ve kterých se pohyboval v rozmezí 200 mg.l⁻¹ (CW2) až 661 mg.l⁻¹ (CW21) pro bílá vína, resp. 1161 mg.l⁻¹ (CR28) až 3430 mg.l⁻¹ (CR33) pro vína červená. Zatímco v bílých biovínách se TPC pohyboval v rozmezí 176 mg.l⁻¹ (BW8) až 335 mg.l⁻¹ (BW15), u červených biovín pak od 1588 mg.l⁻¹ (BR20) po 3187 mg.l⁻¹ (BR26).

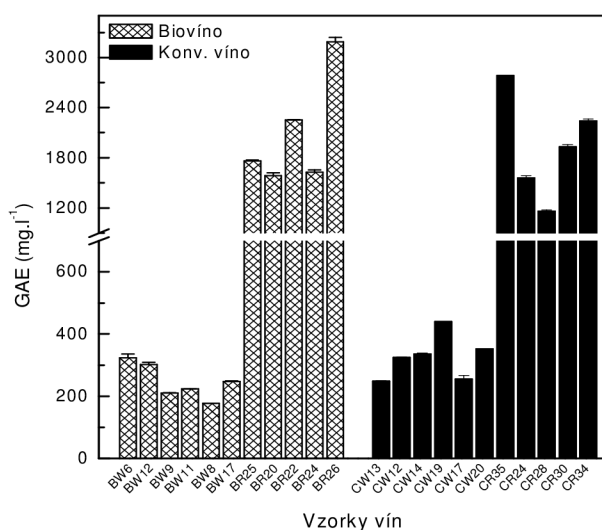
Tab. 7: UV/VIS experimentální charakteristiky slovenských a zahraničních ekologických a konvenčních vín.

ID	TPC (GAE,mg.l ⁻¹)	TBARS	FRP	%ABTS	%DPPH	TEAC _{ABTS} ⁺⁺ (mmol.l ⁻¹)	TEAC _{DPPH} (mmol.l ⁻¹)
<i>Slovenská biovína</i>							
BW1	225.0±13.9	0.4±0.0	0.5±0.0	93.4±4.7	38.2±1.9	0.3±0.0	0.2±0.0
BW2	255.8±7.5	0.2±0.0	0.6±0.0	78.3±3.9	48.4±2.4	0.7±0.0	0.3±0.0
BW3	183.6±7.5	0.1±0.0	0.6±0.0	75.3±3.8	41.9±2.1	0.3±0.0	0.2±0.0
BW4	185.7±1.6	0.2±0.0	0.4±0.0	64.3±3.2	55.6±2.8	0.3±0.0	0.2±0.0
BW5	236.3±6.1	0.4±0.0	0.5±0.0	90.6±4.5	70.3±3.5	0.8±0.0	0.3±0.0
BW6	322.9±1.9	0.1±0.0	0.7±0.0	91.6±4.6	59.8±3.0	0.7±0.0	0.7±0.0
BW7	225.0±13.9	0.1±0.0	0.6±0.0	88.8±4.4	59.8±3.0	0.7±0.0	0.7±0.0
BW8	176.6±0.1	0.1±0.0	0.7±0.0	95.4±4.8	57.4±2.9	0.8±0.0	0.1±0.0
BW9	209.9±1.6	0.2±0.0	0.7±0.0	86.7±4.3	59.9±3.0	0.7±0.0	0.3±0.0
BW10	227.1±9.0	0.6±0.1	1.0±0.0	89.0±4.4	72.8±3.6	0.4±0.0	0.8±0.0
BW11	223.6±0.1	0.5±0.0	0.8±0.0	90.2±4.5	54.9±2.7	0.4±0.0	0.4±0.0
BW12	301.3±7.4	0.6±0.0	0.9±0.0	76.7±3.8	71.2±3.6	0.6±0.0	0.4±0.0
BW13	238.9±1.8	1.8±0.0	0.8±0.0	83.4±4.2	77.2±3.9	0.3±0.0	0.1±0.0
BW14	304.5±2.9	0.8±0.0	0.9±0.0	72.0±3.6	67.8±3.4	0.6±0.0	0.3±0.0
BW15	335.2±7.6	0.2±0.0	0.9±0.03	97.7±4.9	84.2±4.2	0.8±0.0	0.4±0.0
BW16	265.2±6.0	0.1±0.0	0.7±0.0	72.5±3.6	57.1±2.9	0.6±0.0	0.3±0.0
BW17	247.4±1.7	0.4±0.0	0.9±0.0	72.8±3.6	59.5±3.0	0.3±0.0	0.1±0.0
BW18	288.7±2.2	0.5±0.0	0.8±0.0	81.5±4.1	63.2±3.4	0.3±0.0	0.1±0.0
BW19	288.8±2.4	0.5±0.0	0.8±0.0	81.5±4.1	63.2±3.4	0.4±0.0	0.11±0.0
BR20	1588.1±32.2	2.0±0.0	9.3±0.1	83.1±4.2	66.4±3.3	4.4±0.2	2.1±0.1
BR21	2041.4±25.0	1.3±0.0	5.5±0.3	85.1±4.3	80.4±4.0	6.9±0.3	4.4±0.2
BR22	2254.7±3.5	4.0±0.1	7.2±0.6	91.3±4.6	88.6±4.4	7.5±0.4	4.9±0.2
BR23	1393.7±29.7	1.1±0.1	5.5±0.0	79.6±4.0	66.3±3.3	6.5±0.3	3.4±0.2
BR24	1626.2±30.1	3.3±0.0	5.1±0.4	93.3±4.7	80.0±4.0	7.6±0.4	4.1±0.2
BR25	1763.3±10.3	2.0±0.1	4.3±0.0	83.8±4.2	61.8±3.1	5.2±0.3	2.9±0.1
BR26	3187.4±52.2	4.0±0.1	4.4±0.3	83.7±4.2	68.9±3.4	10.6±0.5	8.7±0.4
BR27	3131.4±16.6	3.69±0.07	5.38±0.04	90.1±4.5	81.9±4.1	9.35±0.47	5.10±0.26
<i>Slovenská konvenční vína</i>							
CW1	279.7±7.8	0.1±0.0	1.1±0.1	86.3±4.3	73.1±3.7	1.2±0.1	0.5±0.0
CW2	200.7±10.0	0.1±0.0	0.7±0.0	61.4±3.1	48.8±2.4	0.8±0.0	0.3±0.0
CW3	269.4±8.5	0.1±0.0	1.0±0.0	83.3±4.2	84.7±4.2	1.2±0.1	0.3±0.0
CW4	271.5±1.6	0.1±0.0	1.1±0.1	78.6±3.9	64.3±3.2	1.1±0.1	0.5±0.0
CW5	242.2±0.5	0.1±0.0	1.0±0.0	84.6±4.2	55.8±2.8	0.9±0.0	0.4±0.0
CW6	218.5±2.1	1.7±0.1	0.8±0.1	70.2±3.5	53.6±2.7	0.6±0.0	0.6±0.0
CW7	257.1±2.3	0.9±0.0	1.0±0.0	87.0±4.4	63.0±3.1	0.7±0.0	0.7±0.0
CW8	271.1±0.5	0.8±0.2	1.0±0.0	94.0±4.7	75.5±3.8	0.8±0.0	0.8±0.0
CW9	261.3±4.1	0.1±0.0	1.1±0.1	95.6±4.8	76.6±3.8	0.8±0.0	0.8±0.0
CW10	255.5±6.9	0.2±0.0	1.0±0.0	92.0±4.6	70.5±3.5	0.8±0.0	0.8±0.0
CW11	333.7±9.7	0.1±0.0	0.8±0.0	76.5±3.8	80.8±4.0	1.3±0.0	0.6±0.0
CW12	324.6±1.5	0.5±0.0	0.8±0.0	72.5±3.6	68.9±3.4	1.2±0.1	0.5±0.0
CW13	248.2±1.4	1.2±0.1	0.7±0.0	71.1±3.6	81.9±4.1	0.6±0.0	0.3±0.0
CW14	335.6±3.5	0.2±0.0	0.9±0.0	84.2±4.2	67.2±3.4	1.4±0.1	0.5±0.0
CW15	478.9±4.6	1.6±0.0	0.9±0.0	90.5±4.5	71.0±3.5	1.5±0.1	0.5±0.0
CW16	260.1±7.9	0.2±0.0	1.0±0.0	61.9±3.1	49.6±2.5	1.0±0.0	0.5±0.0
CW17	255.8±11.3	2.1±0.1	0.8±0.0	88.0±4.4	74.6±3.7	0.7±0.0	0.4±0.0
CW18	429.7±2.7	0.3±0.1	1.0±0.0	85.2±4.3	85.1±4.3	1.4±0.1	0.4±0.0
CW19	439.6±0.2	0.3±0.0	1.0±0.1	89.1±4.5	73.8±3.7	1.1±0.1	0.7±0.0
CW20	351.9±0.7	0.1±0.0	1.0±0.0	90.1±4.5	74.8±3.7	0.7±0.0	0.3±0.0
CW21	661.4±0.5	0.3±0.0	1.3±0.0	80.1±4.0	65.8±3.3	1.7±0.1	0.8±0.0
CW22	419.9±1.3	0.4±0.0	1.2±0.0	83.4±4.2	65.0±3.2	1.0±0.1	0.5±0.0
CW23	400.4±2.2	0.7±0.0	1.2±0.0	81.7±4.1	62.6±3.1	1.0±0.1	0.5±0.0
CR24	1560.4±23.6	1.7±0.0	6.4±0.0	86.5±4.3	84.4±4.2	6.1±0.3	2.7±0.1
CR25	1552.6±16.9	1.9±0.0	6.3±0.2	95.4±4.8	80.5±4.0	6.9±0.3	3.1±0.2
CR26	1078.0±5.9	2.3±0.0	4.5±1.6	79.4±4.0	67.1±3.4	4.9±0.2	3.7±0.2
CR27	1577.5±6.3	3.6±0.0	5.9±0.3	94.0±4.7	75.2±3.8	7.7±0.4	6.2±0.3

Tab. 7 (pokr.): UV/VIS experimentální charakteristiky slovenských a zahraničních ekologických a konvenčních vín.

ID	TPC (GAE,mg.l ⁻¹)	TBARS	FRP	%ABTS	%DPPH	TEAC _{ABTS} •+	TEAC _{DPPH}
						(mmol.l ⁻¹)	(mmol.l ⁻¹)
CR28	1161.0±16.3	2.4±0.0	5.4±0.4	90.7±4.5	86.6±4.3	5.6±0.3	4.8±0.2
CR29	1939.2±47.2	2.9±0.0	5.0±0.1	93.4±4.7	73.8±3.7	7.8±0.4	3.8±0.2
CR30	1932.1±24.9	3.6±0.1	5.1±0.1	95.5±4.8	73.3±3.7	8.0±0.4	3.8±0.2
CR31	2948.9±58.3	4.0±0.0	5.4±0.2	87.0±4.4	87.9±4.4	14.6±0.7	4.6±0.2
CR32	2601.0±31.0	2.2±0.1	5.3±0.0	87.0±4.4	83.4±4.2	14.7±0.7	5.4±0.3
CR33	3430.3±1.8	4.5±0.1	5.7±0.1	93.6±4.7	51.0±2.6	15.2±0.8	7.9±0.4
CR34	2241.0±22.1	3.1±0.0	4.9±0.0	73.7±3.7	76.5±3.8	6.2±0.3	3.8±0.2
CR35	2786.0±1.1	1.7±0.1	4.5±0.0	93.2±4.7	64.5±3.2	7.7±0.4	4.5±0.2
<i>Zahraniční biovína</i>							
BW1-IT	289.3±1.5	0.3±0.0	1.1±0.0	83.7±3.2	71.3±3.3	0.7±0.0	0.3±0.0
BW2-CZ	396.2±0.3	3.1±0.1	1.1±0.0	90.9±4.5	76.7±3.9	0.8±0.0	0.3±0.0
BW3-CZ	290.8±0.2	0.8±0.0	1.0±0.0	75.2±3.8	77.3±3.2	0.6±0.0	0.3±0.0
BW4-A	277.2±2.2	0.2±0.0	0.9±0.0	73.5±3.7	66.1±3.3	0.6±0.0	0.3±0.0
BR5-CZ	2527.6±8.2	1.6±0.1	5.4±0.2	93.4±4.7	65.0±3.8	7.8±0.4	3.2±0.2
BR6-CZ	1242.4±9.2	1.1±0.0	5.1±0.0	72.2±3.6	63.2±3.6	3.0±0.2	1.5±0.1
<i>Zahraniční konvenční vína</i>							
CW1-H	284.0±2.5	0.2±0.0	1.0±0.0	71.4±3.6	61.0±3.1	0.6±0.0	0.3±0.0
CW2-CZ	275.5±1.4	0.3±0.0	1.1±0.0	82.3±4.1	62.0±3.1	0.7±0.0	0.3±0.0
CW3-A	373.7±3.7	0.2±0.0	1.1±0.0	85.9±4.3	59.2±3.1	1.1±0.1	0.5±0.0
CR4-A	3195.5±16.3	2.9±0.1	5.7±0.0	94.6±4.7	76.7±3.8	9.8±0.5	4.8±0.2
CR5-CZ	1816.3±18.7	1.8±0.0	6.1±0.1	89.7±4.5	69.2±3.5	5.6±0.3	2.9±0.1
CR6-H	1959.7±2.5	2.4±0.1	5.6±0.1	88.5±4.4	68.6±3.4	5.5±0.3	2.9±0.1

Variabilita výsledků je zřejmá i z porovnání hodnot TPC odpovídajících párových vzorků vín, tj. vín stejné odrůdy a ročníku, ale odlišného systému produkce (Obr. 16), přičemž výraznější rozdíly jsou patrné u červených vín. I v tomto případě se zde uplatňuje vliv různých ročníků na obsah polyfenolických látek, např. Rulandské bílé *BW9/CW14* a *BW11/CW19* nebo Cabernet Sauvignon *BR22/CR28* a *BR26/CR34*. Ovšem tyto rozdíly mohou také souviset s rozdílným obsahem zbytkového cukru nebo obsahem alkoholu.



Obr. 16: Obsah polyfenolů ve vybraných párových vzorcích slovenských biovín a konvenčních vín stanovený proti standardu kyseliny gallové (GAE, mg.l⁻¹).

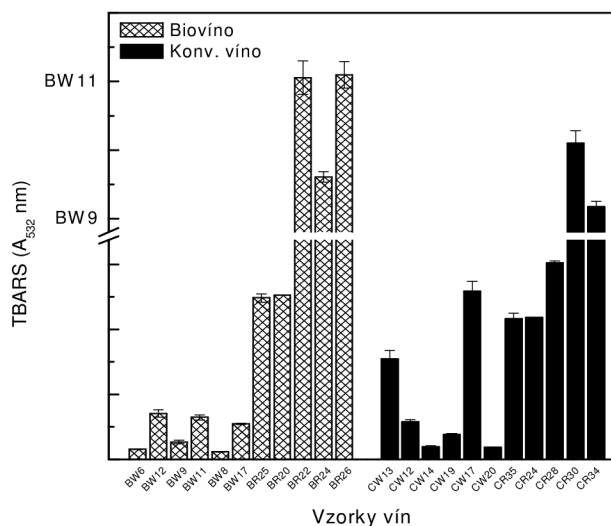
Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích zahraničních vín je porovnatelný s víny slovenskými, bez ohledu na produkční systém nebo typ vína (bílé vs. červené).

Vzájemné korelace experimentálních charakteristik obou skupin studovaných vín potvrdily vysokou korelaci radikál-zhášejících vlastností s obsahem polyfenolů. V případě hodnot $TEAC_{(UV)}$ a $TEAC_{(EPR)}$, bez ohledu na typ použitého radikálu, se hodnoty korelačních koeficientů pohybují rozmezí 0.917–0.980.

Přestože se potvrdilo, že různé kultivační a enologické postupy mohou ovlivňovat obsah polyfenolických látek ve víně, výsledky měření prokázaly, že parametr TPC nelze samostatně použít na jednoznačnou diferenciaci ekologických a konvenčních vín.

6.1.1.2 Tvorba oxidačních produktů a schopnost vín redukovat železitě ionty

Oxidační změny ve vínech byly vyjádřeny jako hodnoty TBARS. Opět se potvrdil očekávaný jednoznačný rozdíl mezi červenými a bílými víny. Ve většině případů, v bílých biovíněch hodnoty TBARS nepřesahovaly hodnotu 0.6, u bílých konvenčních vín je zřejmá větší variabilita (TBARS v rozmezí 0.1–2.1). U červených vín, bez ohledu na způsob produkce, jsou hodnoty TBARS porovnatelné.



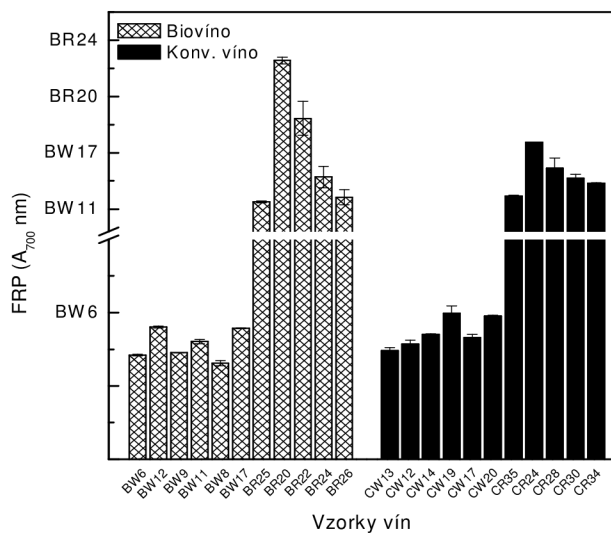
Obr. 17: Tvorba oxidačních produktů vyjádřená jako hodnoty TBARS ve vybraných párových vzorcích biovín a konvenčních vín.

Pokud se porovnají hodnoty TBARS párových vzorků (Obr. 17) je zřejmé, že ve většině případů jsou červená biovína charakterizována vyššími hodnotami TBARS, což může souviset i s nižšími dávkami aplikovaného SO_2 při výrobě biovína, čímž se víno stává náchylnější k oxidaci. Z tohoto důvodu bychom očekávaly podobný trend i mezi vzorky bílých vín. Nicméně z grafu je zřejmé, že hodnoty TBARS konvenčních vín jsou porovnatelné, v některých případech dokonce několikanásobně vyšší než u vín ekologických, např. Chardonnay *BW6/CW13* nebo Tramín červený *BW8/CW17*.

Na základě uvedených skutečností lze konstatovat, že stejně jako obsah TPC, i tvorba oxidačních produktů je ovlivňována nejen způsobem produkce vína, ale i ročníkem, odrůdovou skladbou, příp. i složením vína (tj. obsah alkoholu a zbytkového cukru). Hodnoty TBARS zahraničních vín, stejně jako obsah polyfenolů, jsou porovnatelná s hodnotami zjištěnými pro slovenská vína, bez ohledu na produkční systém a barvu vína.

Výrazný rozdíl mezi bílými a červenými víny byl potvrzen i v případě schopnosti vín redukovat železitě ionty, přičemž je zřejmé, že pouze na základě tohoto parametru není možné jednoznačně odlišit biovína od vín konvenčních, což je zřejmé i z komparace párových vzorků (Obr. 18), kdy konvenční vína jsou charakterizována jak vyššími (např. vzorky

Rulandské bílé *BW7/CW7* a *BW9/CW14*, Cabernet Sauvignon *BR26/CR34*, Chardonnay *BW18/CW21*, Tramín červený *BW3/CW3* a *BW17/CW20*, tak i výrazně nižšími hodnotami FRP (vzorky Frankovka modrá *BR20/CR24* nebo Cabernet Sauvignon *BR22/CR28*) než vína ekologická, tzn. hodnoty nevykazují jednoznačný trend.



Obr. 18: Schopnost vybraných ekologických a konvenčních párových vín redukovat Fe^{3+} ionty vyjádřená jako hodnoty FRP.

Ze vzájemné korelace (Tab. 9) experimentálních charakteristik je zřejmá pozitivní korelace hodnot FRP s obsahem polyfenolů ($R_B = 0.829$ pro biovína, resp. $R_C = 0.869$ pro vína konvenční), ale i s hodnotami TBARS ($R_B = 0.769$, resp. $R_C = 0.822$), přičemž je zřejmé, že hodnoty korelačních koeficientů konvenčních vín jsou vyšší než u vín ekologických.

6.1.1.3 ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivita vín

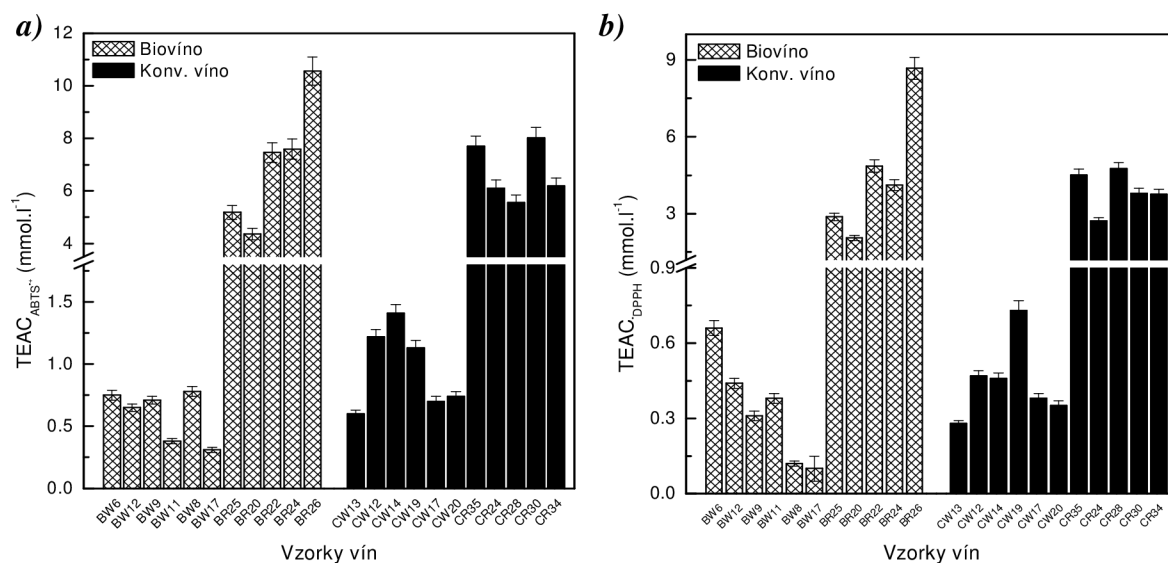
Spektroskopické stanovení antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností pomocí radikálů ABTS^{•+} a DPPH patří mezi jedny z nejčastěji používaných metod hodnocení antioxidačního statutu potravin.

Schopnost analyzovaných ekologických a konvenčních vín terminovat radikály ABTS^{•+}/DPPH testovaná pomocí UV/VIS byla vyjádřena jako procentuální pokles koncentrace daného radikálu v experimentálním systému (Tab. 7). Vzhledem k tomu, že toto vyjádření nezohledňuje případné zředění vzorků vín, ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivita byla přepočítána i na hodnoty Trolox-ekvivalent (TEAC), což umožňuje objektivnější porovnání i s výsledky EPR měření. Z tohoto důvodu se dále zaměříme především na porovnání výsledných hodnot TEAC.

Hodnoty TEAC byly vypočítány podle rovnice 24 pro hodnoty absorbance směsi, která obsahovala příslušný vzorek a roztok radikálu ABTS^{•+}/DPPH, v čase 10.5 min po přidání příslušného radikálu do systému.

Z údajů prezentovaných v Tab. 7 je zřejmé, že všechny vzorky vín projevují výrazné radikál-zhášející vlastnosti v obou sledovaných systémech, přičemž z tabulky je zřejmá jejich velká variabilita i v rámci jednotlivých skupin (bílá vs. červená vína, biovína vs. konvenční vína, odrůdy). Opět se potvrdil trend nižších radikál-zhášejících vlastností vín bílých v porovnání s i víny červenými, přičemž však není možné jednoduchou komparací, z důvodů uvedených výše, potvrdit, zda jsou výraznější radikál-zhášející vlastnosti závislé na způsobu pěstování hroznů, resp. výroby vína. Nicméně bílá konvenční vína byla ve většině případů charakterizována vyššími hodnotami TEAC v porovnání s biovíny, zatímco hodnoty

červených vín jsou porovnatelné, především u hodnot $TEAC_{ABTS^{*+}}$. Toto platí i v případě porovnání párových vzorků vín (Obr. 19a), s výjimkou červených odrůd Cabernet Sauvignon *BR22/CR28* a *BR26/CR34*, kdy hodnoty $TEAC_{ABTS^{*+}}$ biovín jsou vyšší o přibližně 25%, resp. 42% než u konvenčních vín.



Obr. 19: Hodnoty Trolox equivalent antioxidant capacity **a)** $TEAC_{ABTS^{*+}}$, **b)** $TEAC_{DPPH}$ (mmol.l⁻¹) stanovené pro vybrané vzorky párových ekologických a konvenčních vín.

Variabilita hodnot $TEAC_{DPPH}$ studovaných vín naznačuje, že tento parametr nemůže být samostatně využit jako marker pro rozlišení biovín od konvenčních vín, což potvrzuje porovnání hodnot $TEAC_{DPPH}$ párových vín (Obr. 19b), kde je zřejmá větší variabilita výsledků než tomu bylo v případě hodnot $TEAC_{ABTS^{*+}}$. Největší rozdíly hodnot $TEAC_{DPPH}$ párových ekologických a konvenčních vín byly zjištěny pro odrůdy Chardonnay *BW6/CW13* a *BW18/CW21*, Rulandské bílé *BW11/CW19* a Cabernet Sauvignon *BR26/CR34*, přičemž tyto rozdíly lze na základě analýzy ANOVA označit za statisticky významné ($P > 0.05$).

Co se týče porovnání slovenských a zahraničních vín, oba parametry TEAC, jsou porovnatelné, bez ohledu na produkční systém či barvu vína.

Na základě těchto skutečností lze konstatovat, že schopnost vín terminovat radikály $ABTS^{*+}$, resp. $\cdot DPPH$ může být ovlivněna kultivačními a enologickými postupy výroby vína, nicméně z naměřených údajů je zřejmý výraznější vliv ročníků a druhové skladby na monitorované charakteristiky.

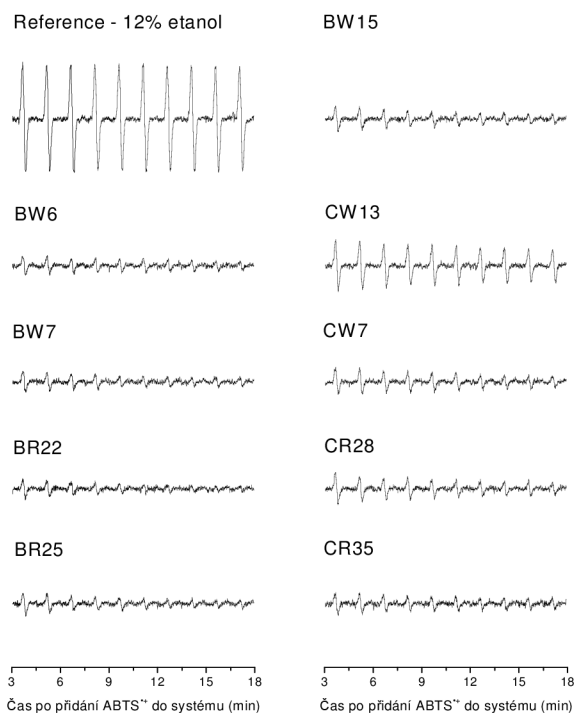
6.1.2 EPR experimenty

Pomocí EPR spektroskopie byly realizovány testy radikál-zhášející aktivity studovaných vín pomocí radikálů $ABTS^{*+}$, $\cdot DPPH$ a TEMPOL, resp. antioxidační aktivity vzorků vůči *in-situ* generovaným $\cdot OH$ radikálům.

6.1.2.1 $ABTS^{*+}/DPPH$ radikál-zhášející aktivita vín

Z průběhu EPR spekter vybraných vzorků párových vín je zřejmá dobrá stabilita referenčního systému (12% etanol). Prakticky okamžitě po přidání radikálů $ABTS^{*+}$ (Obr. 20), resp. $\cdot DPPH$ (Obr. 21) do systému obsahujícího příslušný vzorek studovaného vína dochází

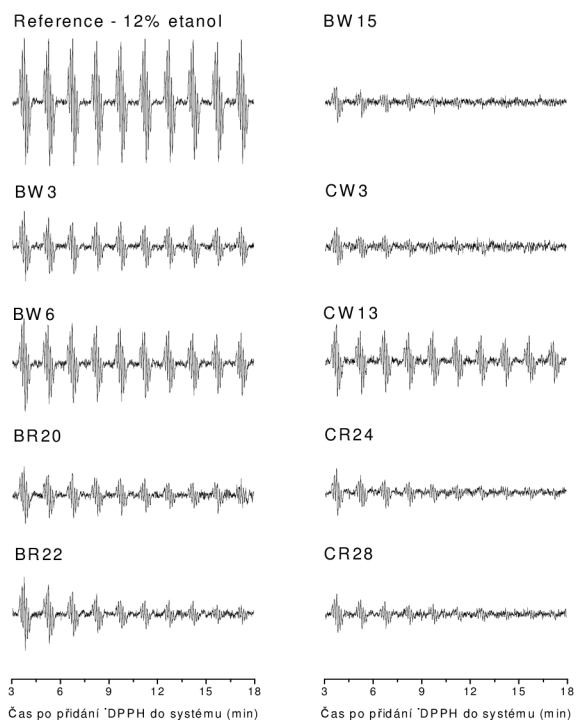
k výraznému poklesu intenzity EPR spektra. Z porovnání vybraných vzorků párových vín (obr. 20) je zřejmé, že pokles intenzity $\text{ABTS}^{\bullet+}$ je výraznější u biovín, bez ohledu na typ vína.



Obr. 20: Časový vývoj EPR spekter naměřený v systému obsahujícím 12% etanol (reference) a příslušný vzorek ekologického a konvenčního vína (Cabernet Sauvignon-Rosé BW15, Chardonnay BW6/CW13, Rulandské bílé BW7/CW7, Cabernet Sauvignon BR22/CR28, Rulandské modré BR25/CR35) v přítomnosti radikálu $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Detailní informace o jednotlivých vzorcích vín jsou uvedeny v Tab. 4.

Podobně jako tomu bylo v případě $\text{ABTS}^{\bullet+}$, po přidavku radikálu DPPH^{\bullet} do systému studovaného vína pozorujeme výrazný pokles intenzity spekter, přičemž tento pokles je výraznější u konvenčních vín. Z Obr. 21 je zřejmé, že pokles intenzity DPPH^{\bullet} je ovlivňován odrůdovou skladbou a ročníkem.

Obr. 21: Časový vývoj EPR spekter naměřený v systému obsahujícím 12% etanol (reference) a příslušný vzorek ekologického a konvenčního vína (Cabernet Sauvignon-Rosé BW15, Tramín červený BW3/CW3, Chardonnay BW6/CW13, Frankovka modrá BR20/CR24, Cabernet Sauvignon BR22/CR28)) v přítomnosti radikálu DPPH^{\bullet} . Detailní informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tab. 4.

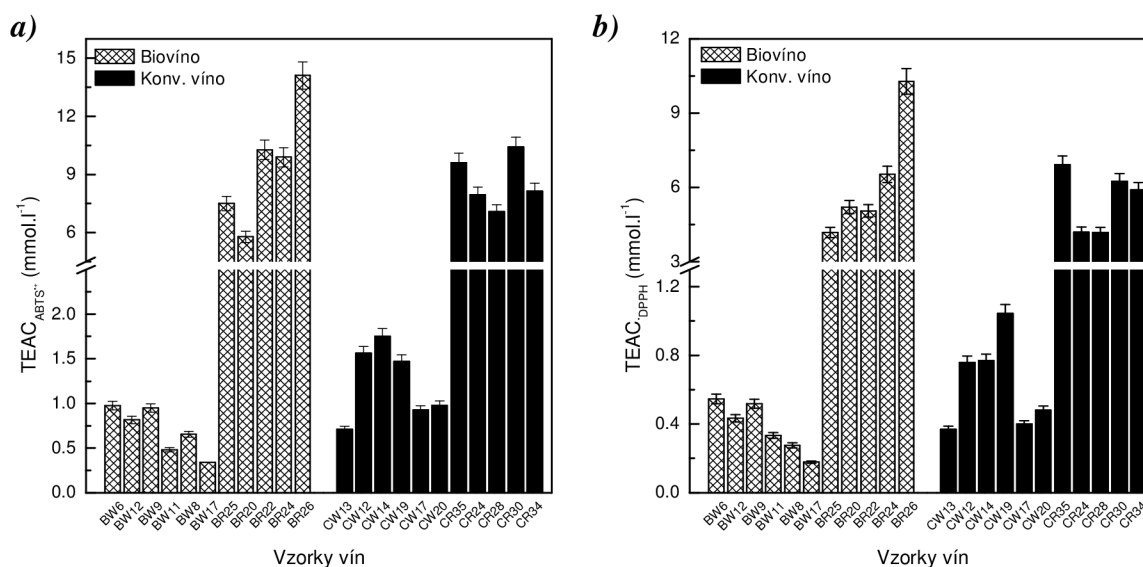


Pro kvalitativní porovnání radikál-zhášející aktivity jednotlivých vín byly zvoleny dva přístupy. V prvním případě, byla radikál-zhášející aktivita studovaných vín oproti radikálům $\cdot\text{DPPH}$ nebo $\text{ABTS}^{+\cdot}$ vyjádřena jako hodnota TEAC podle postupu uvedeného v experimentální části.

Pro odhad schopnosti jednotlivých vín terminovat radikály $\cdot\text{DPPH}$, $\text{ABTS}^{+\cdot}$, ale i TEMPOL, byla závislost koncentrace příslušného radikálu na čase popsána kinetickou rovnicí prvního řádu podle rovnice 25.

Z výsledků měření je zřejmé (Tab. 8), že většina hodnot $\text{TEAC}_{(\text{EPR})}$ kopíruje výše popsané trendy pro hodnoty $\text{TEAC}_{(\text{UV})}$, především ve vztahu k rozdílům mezi červenými a bílými víny, ale i biovíny a konvenčními víny. Shodu výsledků $\text{TEAC}_{(\text{EPR})}/\text{TEAC}_{(\text{UV})}$ podporují i hodnoty vzájemných korelačních koeficientů, které se pohybují v rozmezí 0.999–1.000 pro $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$, resp. 0.952–0.962 pro $\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}}$ (Tab. 9).

Na základě porovnání ekologických a konvenčních vín, zvláště pro červená a bílá vína, lze konstatovat, že červená konvenční vína byla charakterizována vyššími průměrnými hodnotami $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$ (11.4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) i $\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}}$ (6.3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) než biovína (9.3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, resp. 5.4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), bez ohledu na ročník nebo odrůdu. Stejný trend byl pozorován i u bílých vín.



Obr. 22: Hodnoty Trolox equivalent antioxidant capacity **a)** $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$, **b)** $\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}}$ ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) stanovené pro vybrané vzorky párových ekologických a konvenčních vín

Stejný trend byl také pozorován při komparaci párových vzorků vín (Obr. 22), a to pro oba parametry TEAC. Z prezentovaných výsledků je zřejmé, že zatímco hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$ i $\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}}$ pro ekologická a konvenční vína jsou u vzorků Rulandské bílé $\text{BW7}/\text{CW7}$ a Cabernet Sauvignon $\text{BR24}/\text{CR30}$ porovnatelné, ve zbývajících případech se rozdíly mezi biovíny a konvenčními víny pohybují v rozmezí 20–100%. U biovín i konvenčních vín bylo prokázáno, že výsledné hodnoty Trolox-ekvivalent jsou ovlivňovány nejen odrůdovou skladbou, ale i ročníkem, kdy se rozdíly v hodnotách TEAC stejných odrůd, ale různých ročníků, pohybují mezi 50–100%, např. bio Cabernet Sauvignon $\text{BR24}/\text{BR26}$ nebo konvenční vína Chardonnay $\text{CW13}/\text{CW12}/\text{CW21}$ a Tramín červený $\text{CW3}/\text{CW17}$.

Pozorované rozdíly v hodnotách TEAC pro ABTS^{•+} a •DPPH, zřejmé i z UV/VIS měření, souvisí s velkou pravděpodobností také s odlišnými redoxními potenciály, a tedy i reaktivitou jednotlivých radikálů se složkami vín, ale i skladbou polyfenolů přítomných ve vzorku [167, 212, 213, 216].

Popis pozorovaného poklesu EPR signálu příslušného radikálu pomocí kinetického modelu (jako neefektivnější, tj. nejlépe vystihující experimentálně pozorovaný pokles intenzity EPR spektra se ukazuje být kinetický model platný pro reakce prvního řádu) poskytuje další charakteristiky radikál-zhášejících vlastností příslušného systému, k_{DPPH} , resp. $k_{ABTS^{•+}}$, jejichž fyzikální interpretací je hodnota formální rychlostní konstanty zániku příslušného radikálu. Z Tab. 8 je zřejmé, že hodnoty rychlostních konstant $k_{ABTS^{•+}}$ a k_{DPPH} biovín a konvenčních vín jsou porovnatelné, bez ohledu na odrůdu, ročník nebo typ vína. Vypočítané parametry popisující kinetiku terminace příslušného radikálu složkami studované vzorky, se na základě nízkých korelačních koeficientů (Tab. 9) s dalšími experimentálními charakteristikami jeví jako vhodné deskriptory pro účely odlišení biovín od konvenčních vín pomocí vícerozměrných statistických metod.

Tab. 8: EPR experimentální charakteristiky slovenských a zahraničních ekologických a konvenčních vín.

ID	TEAC _{ABTS^{•+}} (mmol.l ⁻¹)	k _{ABTS^{•+}} (min ⁻¹)	TEAC _{•DPPH} (mmol.l ⁻¹)	k _{•DPPH} (min ⁻¹)	AAE (mmol.l ⁻¹)	k _{TEMPOL} (min ⁻¹)	%RS	TEAC _{DMPO} (μmol.l ⁻¹)
<i>Slovenská biovína</i>								
BW1	0.5±0.0	0.2±0.1	0.4±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	56.0±2.8	46.7±2.4
BW2	1.0±0.1	0.1±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	74.8±3.7	86.4±4.4
BW3	0.5±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	63.0±3.2	59.5±3.0
BW4	0.4±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	61.8±3.1	60.6±3.0
BW5	0.8±0.0	0.2±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	55.4±2.8	46.7±2.3
BW6	1.0±0.1	0.1±0.0	0.6±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	59.9±3.0	53.9±2.7
BW7	1.0±0.1	0.2±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	60.9±3.0	55.6±2.8
BW8	0.7±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	52.0±2.6	41.7±2.1
BW9	1.0±0.1	0.2±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	58.2±2.9	51.0±2.6
BW10	1.0±0.1	0.3±0.1	0.6±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	56.6±2.8	48.4±2.4
BW11	0.5±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	77.1±1.2	95.9±4.8
BW12	0.8±0.0	0.1±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	79.2±3.2	92.6±4.6
BW13	0.5±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	74.2±0.6	91.4±4.6
BW14	0.8±0.0	0.1±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	71.5±0.3	85.9±4.3
BW15	0.9±0.1	0.1±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	74.9±2.3	211.3±10.6
BW16	0.8±0.0	0.1±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	80.3±0.5	103.1±5.2
BW17	0.3±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	68.4±1.0	72.0±3.6
BW18	0.4±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	64.9±6.6	54.5±2.7
BW19	0.4±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	64.9±6.6	41.4±2.1
BR20	5.8±0.2	0.1±0.0	5.2±0.3	0.2±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	91.3±4.6	170.1±8.5
BR21	9.1±0.5	0.2±0.0	4.3±0.2	0.2±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	85.0±4.2	124.6±6.2
BR22	10.3±0.5	0.2±0.0	5.0±0.3	0.3±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	88.8±4.4	148.0±7.4
BR23	8.4±0.4	0.1±0.0	2.6±0.1	0.2±0.1	0.2±0.0	0.0±0.0	74.1±3.7	84.2±4.2
BR24	9.9±0.5	0.1±0.0	6.5±0.3	0.1±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	76.1±3.8	90.1±4.5
BR25	7.5±0.4	0.1±0.0	4.2±0.2	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	91.2±0.0	77.1±3.9
BR26	14.1±0.7	0.1±0.0	10.3±0.5	0.2±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	94.5±0.4	168.9±8.4
BR27	12.0±0.3	0.1±0.0	6.7±0.2	0.2±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	92.2±0.7	186.5±9.3
<i>Slovenská konvenční vína</i>								
CW1	1.6±0.1	0.2±0.1	1.1±0.1	0.2±0.1	0.4±0.0	0.1±0.0	38.7±1.9	25.2±1.3
CW2	0.8±0.0	0.1±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	0.8±0.0	0.3±0.0	39.1±2.0	25.6±1.3
CW3	1.6±0.1	0.1±0.0	0.6±0.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	48.7±2.4	37.1±1.9
CW4	1.4±0.1	0.1±0.0	1.0±0.1	0.3±0.1	0.8±0.0	0.1±0.0	52.0±2.6	41.6±2.1
CW5	1.2±0.1	0.1±0.0	0.9±0.0	0.1±0.0	1.3±0.1	0.2±0.0	57.7±2.9	50.2±2.5
CW6	0.7±0.0	0.1±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	-8.1±0.4	-12.3±0.6
CW7	0.9±0.1	0.1±0.0	0.6±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	12.5±0.6	1.6±0.1

Tab. 8 (pokr.): EPR experimentální charakteristiky slovenských a zahraničních ekologických a konvenčních vín.

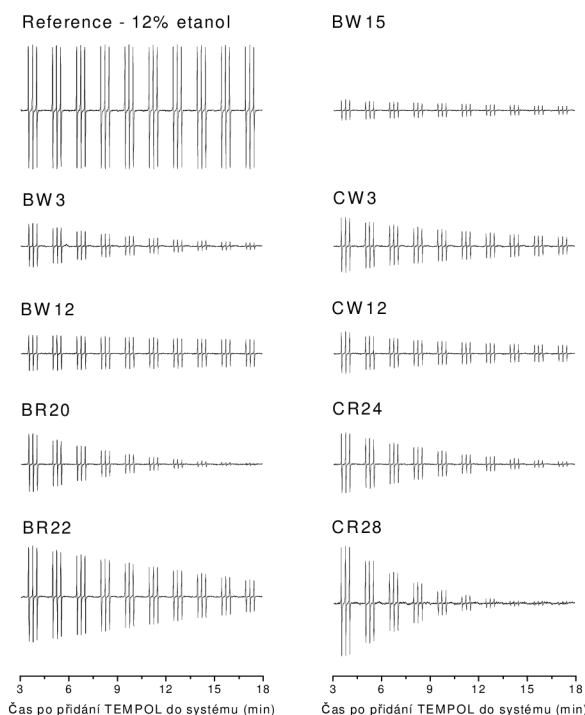
ID	TEAC _{ABTS} ^{•+} (mmol.l ⁻¹)	k _{ABTS} ^{•+} (min ⁻¹)	TEAC _{•DPPH} (mmol.l ⁻¹)	k _{•DPPH} (min ⁻¹)	AAE (mmol.l ⁻¹)	k _{TEMPOL} (min ⁻¹)	%RS	TEAC _{DMPO} (μmol.l ⁻¹)
CW8	1.0±0.1	0.1±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	1.1±0.1	0.2±0.0	41.0±2.0	27.7±1.4
CW9	1.0±0.1	0.0±0.0	0.6±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	87.5±4.4	139.2±7.0
CW10	1.0±0.1	0.2±0.0	0.6±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	48.8±2.4	37.3±1.9
CW11	1.7±0.1	0.1±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	24.5±1.2	11.4±0.6
CW12	1.6±0.1	0.1±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	1.0±0.1	0.2±0.0	35.8±1.8	22.1±1.1
CW13	0.7±0.0	0.1±0.1	0.4±0.0	0.1±0.0	1.4±0.1	0.2±0.0	27.0±1.3	13.5±0.7
CW14	1.8±0.1	0.1±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	1.4±0.1	0.2±0.0	52.3±2.6	42.0±2.1
CW15	1.9±0.1	0.1±0.0	0.8±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	8.8±0.4	-1.2±0.1
CW16	1.3±0.1	0.1±0.0	0.8±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	10.8±0.5	0.3±0.0
CW17	0.9±0.1	0.2±0.1	0.4±0.0	0.2±0.0	1.0±0.1	0.4±0.0	9.3±0.5	-0.8±0.0
CW18	1.9±0.1	0.1±0.1	0.6±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.0±0.0	78.1±1.8	100.8±5.0
CW19	1.5±0.1	0.1±0.1	1.0±0.1	0.1±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	75.1±1.2	89.6±4.5
CW20	1.0±0.1	0.1±0.1	0.5±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	67.6±3.6	165.8±8.3
CW21	2.3±0.0	0.1±0.0	1.0±0.1	0.1±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	84.5±0.5	120.1±6.0
CW22	1.2±0.0	0.0±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	1.4±0.0	0.2±0.0	88.5±0.7	142.0±7.1
CW23	1.3±0.0	0.2±0.0	0.7±0.0	0.4±0.0	1.0±0.0	0.2±0.0	80.6±3.2	114.3±5.7
CR24	8.0±0.4	0.1±0.0	4.2±0.2	0.1±0.0	0.9±0.0	0.1±0.0	89.7±4.5	154.9±7.7
CR25	9.2±0.5	0.2±0.1	5.9±0.3	0.2±0.0	1.7±0.1	0.3±0.0	84.5±4.2	121.3±6.1
CR26	6.1±0.3	0.1±0.1	3.3±0.2	0.1±0.0	0.3±0.0	0.0±0.0	65.1±3.3	63.5±3.2
CR27	10.1±0.5	0.1±0.0	5.9±0.3	0.2±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	81.2±4.1	107.7±5.4
CR28	7.1±0.4	0.2±0.0	4.2±0.1	0.2±0.0	0.7±0.0	0.2±0.0	65.0±3.2	63.2±3.2
CR29	10.4±0.5	0.2±0.0	6.1±0.3	0.2±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	79.2±4.0	100.3±5.0
CR30	10.4±0.5	0.2±0.1	6.2±0.3	0.1±0.0	0.6±0.0	0.2±0.0	73.8±3.7	83.6±4.2
CR31	18.8±0.9	0.1±0.0	7.0±0.4	0.2±0.0	1.3±0.0	0.2±0.0	83.7±4.2	118.2±5.9
CR32	19.4±1.0	0.1±0.0	7.1±0.4	0.2±0.0	1.0±0.1	0.2±0.0	74.7±3.7	86.0±4.3
CR33	19.8±1.0	0.2±0.0	13.4±0.7	0.2±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	87.6±4.4	139.5±7.0
CR34	8.1±0.4	0.1±0.0	5.9±0.3	0.2±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	92.0±1.6	63.4±3.2
CR35	9.6±0.5	0.2±0.1	6.9±0.4	0.1±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	91.9±1.1	187.1±9.4
<i>Zahraniční biovína</i>								
BW1-IT	0.8±0.0	0.1±0.1	0.4±0.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	78.7±4.1	89.3±4.5
BW2-CZ	0.9±0.0	0.1±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	1.3±0.1	0.2±0.0	77.8±3.4	103.6±5.2
BW3-CZ	0.8±0.1	0.1±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	0.9±0.1	0.2±0.0	75.7±4.0	97.9±4.9
BW4-A	0.7±0.0	0.1±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.2±0.0	57.1±1.7	51.2±2.6
BR5-CZ	9.1±0.2	0.1±0.0	4.2±0.0	0.1±0.0	0.8±0.1	0.1±0.0	72.7±0.2	81.0±4.1
BR6-CZ	3.7±0.2	0.0±0.0	2.0±0.1	0.2±0.0	0.6±0.0	0.1±0.0	90.7±0.8	169.5±8.5
<i>Zahraniční konvenční vína</i>								
CW1-H	0.6±0.0	0.0±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.2±0.0	79.8±3.5	112.1±5.6
CW2-CZ	0.8±0.0	0.0±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	1.5±0.0	0.3±0.0	89.6±1.2	147.2±7.4
CW3-A	1.2±0.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	0.7±0.1	0.1±0.0	70.1±2.9	69.5±3.5
CR4-A	12.6±0.1	0.2±0.1	6.3±0.1	0.2±0.0	0.9±0.0	0.1±0.0	87.2±0.7	140.4±7.0
CR5-CZ	6.8±0.1	0.0±0.0	4.1±0.0	0.2±0.0	1.3±0.0	0.2±0.0	82.6±4.0	102.1±5.1
CR6-H	6.7±0.0	0.1±0.0	4.0±0.0	0.2±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	85.4±3.2	140.3±7.0

6.1.2.2 Radikál-zhášející aktivita vín oproti radikálu TEMPOL

Časový vývoj EPR spekter vybraných vzorků párových vín po přidání radikálu TEMPOL do systému je znázorněn na Obr. 23. Zatímco je signál reference stabilní, přidavek příslušného vzorku vína do systému vede k výraznému poklesu signálu. Vzhledem k tomu, že po přidavku konvenčních vín byl pozorován okamžitý zánik signálu TEMPOL, byly tyto vzorky zředěny 12% etanolem – v poměru 1:1. Z tohoto faktu lze vyvodit předběžný závěr, že výraznější antioxidační vlastnosti v tomto systému projevují konvenční vína.

Schopnost vín terminovat radikál TEMPOL byla vyjádřena jako hodnota AAE z důvodu, že neexistuje přímý stechiometrický přepočítání mezi reaktivitou tohoto radikálu a Troloxem,

kteří slouží jako porovnávací standard pro výpočet hodnoty TEAC. Je však známá velmi citlivá odezva volného radikálu TEMPOL na přítomnost kyseliny askorbové a dalších kyselin s podobných redoxním potenciálem v reakčním systému. Přepočet koncentrace TEMPOL (dvojitý integrál EPR spektra v čase 10.5 min po jeho přidání do systému) byl realizován pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardních roztoků kyseliny askorbové v koncentračním rozmezí $c_{(AA)} = 0-8.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ($R^2 = 0.993$).



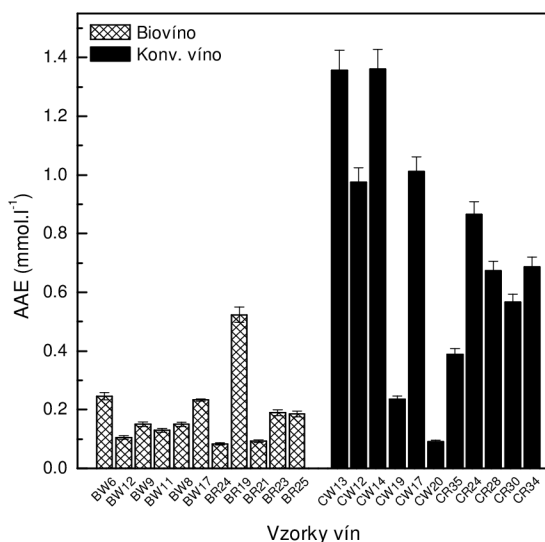
Obr. 23: Časový vývoj EPR spekter naměřený v systému obsahujícím 12% etanol (reference) a příslušný vzorek ekologického a konvenčního vína (Cabernet Sauvignon-Rosé BW15, Tramín červený BW3/CW3, Chardonnay BW12/CW12, Frankovka modrá BR20/CR24, Cabernet Sauvignon BR22/CR28) v přítomnosti radikálu TEMPOL. Detailní informace o jednotlivých vzorcích vín jsou uvedeny v Tab. 4.

Z Tab. 8 je zřejmé, že mezi vzorky vín jsou značné rozdíly, přičemž na rozdíl od předcházejících systémů, rozdíl v AAE mezi bílými a červenými víny není jednoznačný, a mezi hodnotami pro jednotlivé vzorky je velká variabilita. Nicméně průměrné hodnoty AAE červených vín jsou přibližně třikrát vyšší než hodnoty vypočtené pro bílá vína, bez ohledu na to, zda je se jedná o biovína nebo konvenční vína. Naproti tomu, z komparace párových vzorků vín (Obr. 24) jasně vyplývá, že hodnoty AAE jsou významně ovlivněny příslušností daného vzorku k produkčnímu systému. Konvenční vína byla charakterizována vyššími hodnotami AAE než biovína, výjimkou byly párové vzorky Rulandské bílé BW7/CW7 a Tramín červený BW17/CW20, u kterých byl pozorován opačný trend, avšak je potřebné opětovně vzít v úvahu nutnost ředění vzorků konvenčních vín. Z Tab. 8 i z Obr. 24 je zřejmá vysoká variabilita hodnot AAE u vín stejné odrůdy, ale různých ročníků, bez ohledu na produkční systém, např. Chardonnay BW6/BW12/BW18, resp. CW13/CW12/CW21.

Zatímco u předchozích systémů byly hodnoty TEAC zahraničních a slovenských vín porovnatelné, v případě hodnot AAE, byla zahraniční vína charakterizována vyššími hodnotami AAE než slovenská vína, bez ohledu na druh vína (červené vs. bílé, bio- vs. konvenční víno).

Vzhledem k tomu, že pro hodnoty AAE byly zjištěny velmi nízké korelace s dalšími deskriptory antioxidační aktivity, v případě biovín dokonce záporné (Tab. 9), lze tento parametr potenciálně využít jako marker pro diferenciaci vín podle produkčního systému.

Co se týče porovnání formálních rychlostních konstant k_{TEMPOL} , stejně jako v případě $k_{ABTS^{•+}}$ a k_{DPPH} , byla zjištěna jen nevýznamná závislost hodnot rychlostních konstant terminace TEMPOL na produkčním systému, typu vína, ale i odrůdě a ročníku. Na základě nízkých hodnot korelačních koeficientů (Tab. 9) se zbývajícím experimentálními charakteristikami lze parametr k_{TEMPOL} považovat za vhodný deskriptor pro účely diferenciací vín.



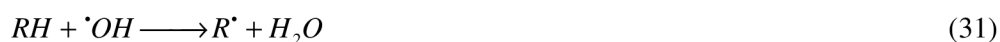
Obr. 24: Antioxidační aktivita vybraných vzorků párových ekologických a konvenčních vín vyjádřená jako AAE (mmol.l⁻¹).

6.1.2.3 Antioxidační aktivita proti $^{\bullet}OH$ radikálům v přítomnosti DMPO

Termickým rozkladem radikálového iniciátoru $K_2S_2O_8$ přímo v experimentálním systému vznikají nestabilní síranové anion radikály ($SO_4^{\bullet-}$, rov. 27), které mohou následně reagovat přímo s antioxidantem (rov. 28), spinovým lapačem DMPO (rov. 29) nebo s vodou (rov. 30) [213, 214, 217].



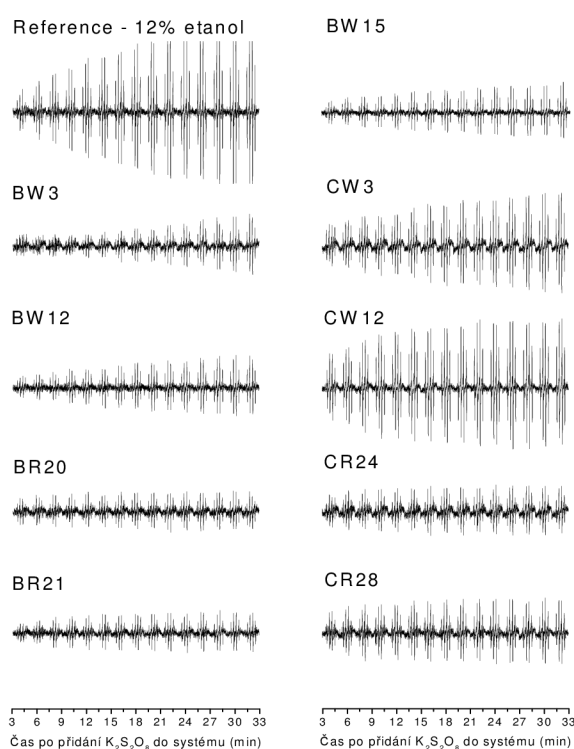
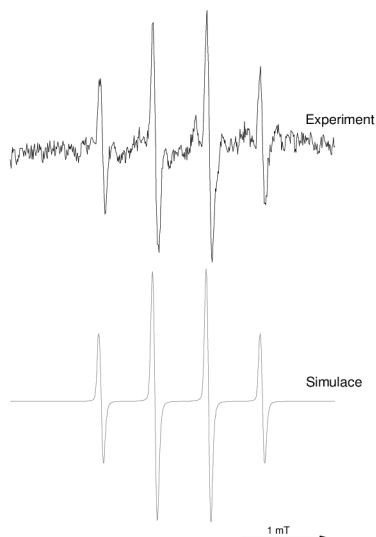
Vzniklý hydroxylový radikál (rov. 30) je schopný reagovat s antioxidantem, ale i s dalšími složkami systému a iniciovat tak ve vzorku oxidační stres za tvorby dalších radikálů podle schématu [213, 217]:



Typický vývoj EPR spektra vybraných vzorků vín, v systému, ve kterém byly reaktivní radikály generovány termálním rozkladem radikálového iniciátoru $K_2S_2O_8$ v přítomnosti spinového lapače DMPO je zobrazen na Obr. 25. Pozorované rozdíly, stejně jako charakter

EPR spektra je v souladu s předpokládaným mechanismem tvorby radikálů v experimentálním systému a publikovanými pracemi [212, 213]. Roztok 12% etanolu (referenční systém) byl charakterizován maximální amplitudou EPR spektra, a odráží tak maximální koncentrace spinových aduktů, přičemž ve spektru, s ohledem na vysokou koncentraci vody dominují spinové adukty \cdot DMPO-OH ($a_N=1.49$ mT, $a_H=1.51$ mT, $g=2.0059$, Obr. 26). Po přidání vzorku vína do experimentálního systému dochází k zřetelnému poklesu relativní intenzity EPR spektra, což odráží pokles \cdot DMPO-OH aduktů v důsledku kompetitivní reakce mezi složkami vína a spinovým lapačem DMPO. Z Obr. 25 je zřejmé, že pokles relativní intenzity spektra je výraznější u vzorků červených vín v porovnání s bílými. Na základě komparace ekologických a konvenčních vín lze konstatovat, že ekologická vína projevují výraznější radikál-zhášející vlastnosti než vína konvenční, přičemž v případě biovín, není patrný jednoznačný rozdíl mezi bílými a červenými víny.

Obr. 25: Časový vývoj EPR spektra naměřeného v systému obsahujícím příslušné objemy 12% etanolu (reference), resp. příslušné vzorky ekologického a konvenčního vína (Cabernet Sauvignon-Rosé BW15, Tramín červený BW3/CW3, Chardonnay BW12/CW12, Frankovka modrá BR20/CR24, Cabernet Sauvignon BR22/CR28), $K_2S_2O_8$ pufru (pH=7) a spinového lapače DMPO. Detailní informace o jednotlivých vzorcích vín je uveden v Tab. 4.

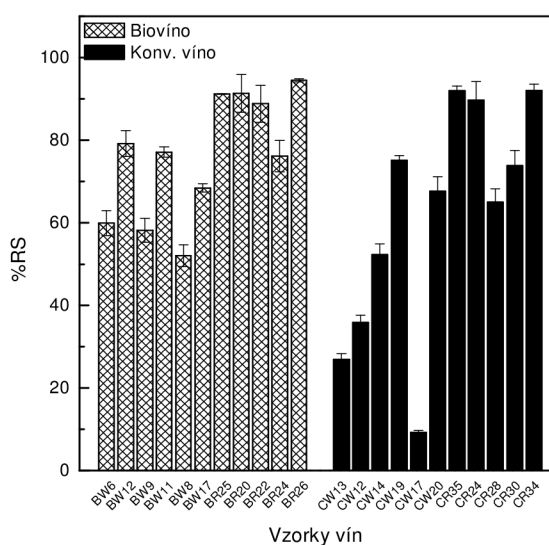


Obr. 26: Experimentální (—) a simulované (—) EPR spektrum naměřené v systému obsahujícím příslušné objemy vzorky BW8 (Tramín červený 2008), $K_2S_2O_8$, DMPO a pufru (pH = 7). EPR spektrum bylo změřeno za podmínek popsanych v experimentální části.

S cílem kvantifikace antioxidační aktivity byla vyjádřena hodnota %RS (Radical scavenged, % zhášených radikálů) [213, 214], která přímo vyjadřuje antioxidační schopnost

příslušného vzorku, resp. jeho schopnost eliminovat radikály vznikající v experimentálním systému. Hodnota %RS se vypočítala podle rovnice 26.

Stejně jako tomu bylo u předchozích testovacích systémů, i v případě hodnot %RS se potvrdil očekávaný rozdíl mezi červenými a bílými víny. Na základě porovnání obou produkčních systémů, je možné konstatovat, že hodnoty %RS biovín byly vyšší než u vín vyrobených konvenčními postupy. Bez ohledu na odrůdu nebo ročník, průměrné hodnoty %RS červených konvenčních vín dosahovaly přibližně 80 %, zatímco v biovíněch 86 %. Průměrné hodnoty %RS bílých vín dosahovaly hodnot 42 % pro konvenční vína, resp. 66 % pro biovína. Tyto výsledky byly potvrzeny i pro párové vzorky vín (Obr. 27), s výjimkou odrůd Rulandské modré *BR25/CR35* s porovnatelnými hodnotami %RS a Chardonnay *BW18/CW21*, kde hodnota %RS konvenčního vína byla přibližně o 23 % vyšší než u odpovídajícího párového vzorku biovína. Variabilita výsledků je rovněž ovlivněna ročníkem, např. konvenční víno Chardonnay *CW13/CW12/CW21*.



Obr. 27: Antioxidační aktivita párových vzorků ekologických a konvenčních vín vyjádřená jako hodnota %RS.

Hodnoty %RS zahraničních biovín jsou porovnatelné se slovenskými vzorky, zatímco u konvenčních zahraničních vín jsou hodnoty %RS nepatrně vyšší než u vín slovenských, bez ohledu na typ vína nebo odrůdu.

Vzájemné korelace (Tab. 9) experimentálních dat potvrdily průměrné korelace hodnot %RS se zbývajícími charakteristikami, s výjimkou hodnot AAE a k_{TEMPOL} , přičemž korelační koeficienty vypočítané pro biovína ($R = 0.270-0.777$) byly vyšší než pro vína konvenční ($R = 0.032-0.608$).

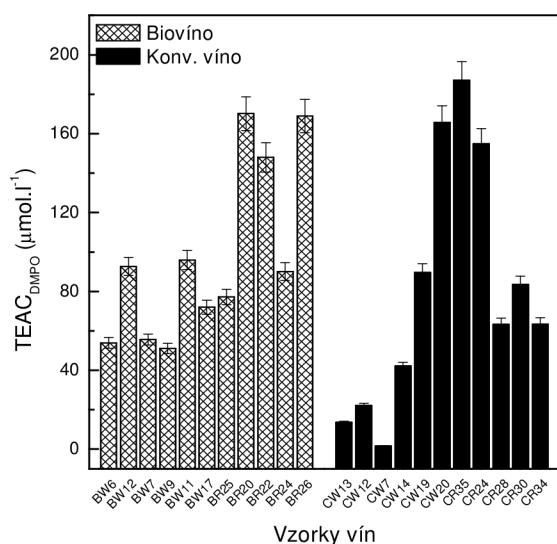
Hodnoty %RS byly přepočteny na hodnoty $TEAC_{DMPO}$ pomocí kalibrační křivky sestavené za standardních roztoků Trolox v koncentračním rozmezí $c = 0-9.4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ($R^2 = 0.992$) v systému $K_2S_2O_8/DMPO$.

Z údajů prezentovaných v Tab. 8 je zřejmé, že mezi vzorky vín jsou značné rozdíly, přičemž stejně jako v případě radikál-zhášející aktivity vín vyjádřené jako AAE, rozdíl v hodnotách $TEAC_{DMPO}$ mezi bílými a červenými víny není jednoznačný. S tím jsou spojeny i nejednoznačné rozdíly mezi biovíny a konvenčními víny. Nicméně bez ohledu na odrůdu nebo ročník, průměrné hodnoty bílých biovín jsou přibližně o 30 % vyšší než hodnoty vypočtené pro bílá konvenční vína, zatímco u červených vín činí tento rozdíl 20 %. Avšak,

vzhledem k vysoké variabilitě výsledků mezi jednotlivými vzorky, lze na základě analýzy ANOVA označit tyto rozdíly za statisticky nevýznamné ($P = 0.1593$, resp. $P = 0.2034$).

Vysoká variabilita $TEAC_{DMPO}$ je zřejmá i z porovnání párových vzorků bio- a konvenčních vín, které je znázorněno na Obr. 28. Ve většině případů byla bílá konvenční vína charakterizována nižšími hodnotami $TEAC_{DMPO}$ v porovnání s biovíny, s výjimkou párových vzorků Tramín červený *BW17/CW20*, kde jsou hodnoty konvenčního vína o cca 50 % vyšší než u odpovídajícího biovína. Podobné trendy byly zjištěny i pro párové vzorky červených vín. Z prezentovaných výsledků jsou mezi biovíny i konvenčními víny patrné i rozdíly nejen v rámci odrůd, ale i ročníků, např. Chardonnay *BW6/BW12*, Tramín červený *BW11/BW17*, resp. *CW19/CW20* nebo Cabernet Sauvignon *BR24/BR26*.

Z tabulky vzájemných korelací (Tab. 9) jsou zřejmé, stejně jako v případě hodnot %RS, průměrné korelace s většinou experimentálních charakteristik, s výjimkou hodnot AAE, k_{TEMPOL} , $k_{ABTS^{•+}}$ a k_{DPPH} , přičemž korelační koeficienty vypočítané pro biovína jsou vyšší v porovnání s konvenčními víny.



Obr. 28: Radikál-zhášeující aktivita vybraných vzorků párových vín oproti $\cdot\text{OH}$ radikálům, které byly generovány termálním rozkladem $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ v experimentálním systému, vyjádřená jako hodnoty $TEAC_{DMPO}$ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$).

Z údajů prezentovaných v Tabulce 8 vyplývá, že zatímco u předchozích systémů byly hodnoty $TEAC$ zahraničních a slovenských vín porovnatelné, v tomto případě byla zahraniční vína charakterizována vyššími průměrnými hodnotami $TEAC_{DMPO}$ než slovenská vína, bez ohledu na typ vína nebo produkční systém. Nicméně, ze statistického hlediska lze tento rozdíl označit za nevýznamný ($P = 0.0801$).

6.1.3 Statistické zpracování experimentálních dat

Vzhledem k uvedeným skutečnostem a faktu, že ani jeden deskriptor antioxidační aktivity není možné samostatně použít na diferenciaci a klasifikaci vín podle způsobu produkce, výsledky experimentů byly zpracovány pomocí vícerozměrných statistických metod.

Tab. 9: Korelační matice antioxidačních charakteristik ve vzorcích biovín a konvenčních vín

<i>Biovino</i>	<i>TPC</i>	<i>TBARS</i>	<i>FRP</i>	<i>%ABTS⁺</i>	<i>%DPPH</i>	<i>TEAC_{ABTS⁺(UV)}</i>	<i>TEAC_{DPPH(UV)}</i>	<i>TEAC_{ABTS⁺(EPR)}</i>	<i>k_{ABTS⁺}</i>	<i>TEAC_{DPPH(EPR)}</i>	<i>k_{DPPH}</i>	<i>AAE</i>	<i>k_{TEMPOL}</i>	<i>%RS</i>	<i>TEAC_{DMPO}</i>	
<i>TPC</i>	1.000															
<i>TBARS</i>	0.900	1.000														
<i>FRP</i>	0.829	0.769	1.000													
<i>%ABTS⁺</i>	0.201	0.225	0.175	1.000												
<i>%DPPH</i>	0.510	0.586	0.494	0.302	1.000											
<i>TEAC_{ABTS⁺(UV)}</i>	0.978	0.890	0.834	0.226	0.517	1.000										
<i>TEAC_{DPPH(UV)}</i>	0.961	0.878	0.750	0.203	0.482	0.973	1.000									
<i>TEAC_{ABTS⁺(EPR)}</i>	0.980	0.896	0.837	0.219	0.513	0.999	0.976	1.000								
<i>k_{ABTS⁺}</i>	0.117	0.130	0.195	0.353	0.130	0.141	0.189	0.163	1.000							
<i>TEAC_{DPPH(EPR)}</i>	0.958	0.909	0.809	0.219	0.458	0.957	0.961	0.960	0.138	1.000						
<i>k_{DPPH}</i>	0.368	0.506	0.421	0.235	0.444	0.345	0.318	0.343	0.143	0.297	1.000					
<i>AAE</i>	-0.186	-0.235	-0.033	-0.011	-0.307	-0.181	-0.205	-0.194	0.070	-0.118	0.027	1.000				
<i>k_{TEMPOL}</i>	-0.274	-0.372	-0.142	0.053	-0.415	-0.306	-0.295	-0.316	-0.043	-0.220	-0.311	0.686	1.000			
<i>%RS</i>	0.777	0.718	0.724	-0.032	0.436	0.729	0.706	0.738	-0.112	0.741	0.270	-0.218	-0.171	1.000		
<i>TEAC_{DMPO}</i>	0.662	0.600	0.607	0.201	0.566	0.606	0.592	0.600	-0.068	0.629	0.308	-0.140	-0.037	0.801	1.000	

<i>Konvenční víno</i>	<i>TPC</i>	<i>TBARS</i>	<i>FRP</i>	<i>%ABTS⁺</i>	<i>%DPPH</i>	<i>TEAC_{ABTS⁺(UV)}</i>	<i>TEAC_{DPPH(UV)}</i>	<i>TEAC_{ABTS⁺(EPR)}</i>	<i>k_{ABTS⁺}</i>	<i>TEAC_{DPPH(EPR)}</i>	<i>k_{DPPH}</i>	<i>AAE</i>	<i>k_{TEMPOL}</i>	<i>%RS</i>	<i>TEAC_{DMPO}</i>	
<i>TPC</i>	1.000															
<i>TBARS</i>	0.835	1.000														
<i>FRP</i>	0.869	0.822	1.000													
<i>%ABTS⁺</i>	0.367	0.343	0.414	1.000												
<i>%DPPH</i>	0.169	0.169	0.315	0.414	1.000											
<i>TEAC_{ABTS⁺(UV)}</i>	0.959	0.831	0.861	0.364	0.217	1.000										
<i>TEAC_{DPPH(UV)}</i>	0.917	0.872	0.909	0.412	0.147	0.920	1.000									
<i>TEAC_{ABTS⁺(EPR)}</i>	0.957	0.830	0.862	0.367	0.222	1.000	0.919	1.000								
<i>k_{ABTS⁺}</i>	0.254	0.318	0.343	0.289	0.033	0.229	0.286	0.233	1.000							
<i>TEAC_{DPPH(EPR)}</i>	0.964	0.852	0.878	0.393	0.080	0.943	0.952	0.943	0.338	1.000						
<i>k_{DPPH}</i>	0.183	0.188	0.165	0.133	0.247	0.237	0.178	0.240	0.297	0.189	1.000					
<i>AAE</i>	0.081	0.052	0.146	-0.058	0.176	0.139	0.007	0.140	-0.014	0.058	-0.034	1.000				
<i>k_{TEMPOL}</i>	0.012	0.074	0.071	-0.137	0.087	0.067	-0.030	0.067	0.237	0.023	0.040	0.774	1.000			
<i>%RS</i>	0.596	0.321	0.608	0.458	0.283	0.530	0.545	0.530	0.045	0.557	0.032	0.202	-0.058	1.000		
<i>TEAC_{DMPO}</i>	0.550	0.262	0.522	0.500	0.190	0.470	0.472	0.467	0.018	0.501	-0.022	0.071	-0.122	0.893	1.000	

6.1.3.1 Statisticky významné deskriptory antioxidační aktivity pro komparaci slovenských biovín a konvenčních vín – jednorozměrná analýza

Za účelem zjištění specifických a statisticky významných markerů na identifikaci a rozlišení biovín od konvenčních vín, byly sledované deskriptory antioxidační aktivity podrobeny statistickému porovnání (metodou ANOVA – procedura Tukey-HSD) pro porovnání skupinových průměrů, Unistat v. 6.0) na signifikantnost rozdílů v komparovaných vínech, přičemž se hodnotil rozdíl mezi produkčními systémy (organická vs. konvenční), odrůdami, ročníky a typem vín (bílá vs. červená). Za statisticky významné jsou považovány rozdíly, u kterých je $P < 0.05$.

Při porovnání slovenských biovín a konvenčních vín (Tab. 10), v němž byly zahrnuty všechny ročníky, odrůdy a barva, se zjistili statisticky významné rozdíly v parametrech AAE, k_{TEMPOL} a %RS. V případě parametrů AAE a k_{TEMPOL} se zjistily kvantitativně vyšší hodnoty těchto ukazatelů v konvenčních vínech, zatímco v případě biovín byly vyšší hodnoty %RS.

Tab. 10: Statisticky významné rozdíly antioxidačních charakteristik mezi biovínami a konvenčními víny.

Prvek	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost ($P < 0.05$)
Biovína (B) vs. konvenční (C) vína (zahrnuje všechny ročníky, odrůdy a barvu vín)				
AAE	C - B	0.4760	0.0895	0.0000
k_{TEMPOL}	C - B	0.0757	0.0212	0.0007
%RS	B - C	13.6732	5.9920	0.0261
Rozdíly mezi Slovenskými a zahraničními biovínami (zahrnuje všechny ročníky, odrůdy, barvu vína a zem původu)				
AAE	B-CZ - B	0.5842	0.1001	0.0000
Biovína (B) vs. konvenční (C) vína – bílá vína (zahrnuje všechny ročníky a odrůdy)				
TPC	C - B	78.0709	26.7073	0.0057
FRP	C - B	0.2639	0.0516	0.0000
%DPPH	C - B	8.6652	3.2652	0.0115
TEAC _{ABTS+(UV)}	C - B	0.5043	0.0841	0.0000
TEAC _{DPPH(UV)}	C - B	0.2266	0.0591	0.0004
TEAC _{ABTS+(EPR)}	C - B	0.6396	0.1120	0.0000
TEAC _{DPPH(EPR)}	C - B	0.3671	0.0553	0.0000
AAE	C - B	0.4297	0.1146	0.0006
k_{TEMPOL}	C - B	0.0635	0.0283	0.0306
%RS	B - C	18.6839	7.0098	0.0111
Biovína (B) vs. konvenční (C) vína – červená vína (zahrnuje všechny ročníky a odrůdy)				
AAE	C - B	0.5662	0.1456	0.0010
k_{TEMPOL}	C - B	0.0997	0.0302	0.0038

Po rozšíření databáze slovenských biovín o vzorky biovín zahraničních, statisticky významné rozdíly se zjistily pouze mezi slovenskými a českými (B-CZ) víny v hodnotách AAE, které byly vyšší u zahraničních vín (Tab. 10).

V případě samostatné komparace bílých bio- a konvenčních vín, se zjistily signifikantní rozdíly v obsahu TPC, hodnotách FRP, %DPPH, TEAC, AAE a k_{TEMPOL} , které byly vyšší ve vínech konvenčních, zatímco hodnoty %RS byly vyšší v ekologických vínech. V červených vínech se projeví signifikantní rozdíly v deskriptorech AAE a k_{TEMPOL} , opět vyšších v konvenčních vínech (Tab. 10).

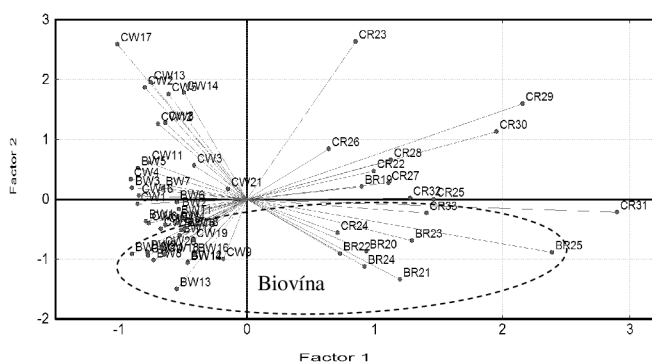
Při testování rozdílů mezi slovenskými červenými a bílými víny, které zahrnovalo všechny ročníky, odrůdy a typ produkce, se ukázaly statisticky významné rozdíly u většiny deskriptorů antioxidační aktivity, s výjimkou hodnot AAE a formálních rychlostních konstant zániku všech sledovaných radikálů.

V případě porovnání ročníků vín, bez ohledu na odrůdu, barvu vína a typ produkce, významné rozdíly se zjistily především v parametrech %DPPH, AAE a k_{TEMPOL} . Nejvýznamnější rozdíl se ukázal mezi ročníkem 2004 a všemi dalšími ročníky.

6.1.3.2 Diskriminace slovenských ekologických a konvenčních vín s využitím deskriptorů antioxidační aktivity – vícerozměrná analýza

Vzhledem k velké variabilitě dat a nejednoznačným rozdílům mezi ekologickými a konvenčními víny byl soubor experimentálních charakteristik – 15 deskriptorů – statisticky zpracován pomocí multivariační analýzy za účelem metodou PCA vizualizovat rozdíly mezi biovínami a konvenčními víny a metodou diskriminační analýzy navíc tyto rozdíly i kvantifikovat.

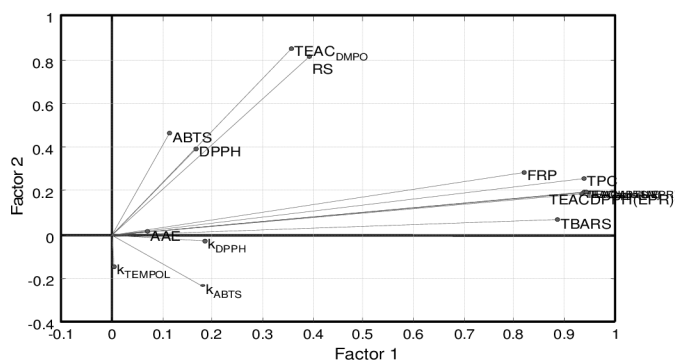
Metodou hlavních komponent (PCA) bylo původních 15 antioxidačních deskriptorů transformováno na nové proměnné – hlavní komponenty, přičemž první 3 komponenty, bez ohledu na charakteristiky vzorků (původ, odrůda, ročník, typ, ...), uspokojivě vysvětlují 72 % variability celého systému, přičemž vezmou-li se do úvahy vlastní vektory s váhou > 1, na popis vlastností systému je nutno použít 4 komponenty, které vysvětlují variabilitu dat na 80 %. Z hlediska váhy jednotlivých parametrů pro konstrukci komponent se jako nejvýznamnější ukázaly být v 1. komponentě hodnoty TPC, $TEAC_{(UV)}$ a $TEAC_{(EPR)}$, zatímco u druhé komponenty hodnoty AAE, k_{TEMPOL} , %RS a $TEAC_{DMPO}$, ve 3. komponentě pak hodnoty $k_{ABTS^{•+}}$, k_{DPPH} a %RS.



Obr. 29: Diferenciace slovenských biovín (B) a konvenčních vín (C) na základě faktorové analýzy 15 deskriptorů antioxidační aktivity – graf faktorových skóre.

Faktorová analýza s rotací varimax (PCF), i když ne úplně, oddělila biovína od konvenčních vzorků tím, že je lokalizovala do dolní poloviny grafu faktorových skóre (Obr. 29) PCF selektovala hodnoty %RS a $TEAC_{DMPO}$, ale i hodnoty AAE a formálních rychlostních konstant zániku radikálů $ABTS^{•+}$, k_{DPPH} a $TEMPOL$ jako markery diskriminující biovína a konvenční vína s největším účinkem (Obr. 30).

Při diskriminaci vzorků vín podle způsobu produkce pomocí CDA se využil soubor všech experimentálních charakteristik jako diskriminačních parametrů, úspěšnost klasifikace vzorků vín do odpovídající skupiny biovín, resp. konvenčních vín dosáhla 85.5 %, kdy 3 ekologická a 6 konvenčních vín bylo nesprávně zařazeno. CDA vymezila hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ z UV/VIS i EPR měření, AAE, $TEAC_{DPPH(EPR)}$ a %RS jako parametry s největším diskriminujícím účinkem.



Obr. 30: Diferenciace slovenských biovín (B) a konvenčních vín (C) na základě faktorové analýzy 15 deskriptorů antioxidační aktivity – graf faktorů (varimax rotace) indikující význam jednotlivých deskriptorů pro účely diferenciace biovín a konvenčních vín.

Pro účely diferenciace a klasifikace ekologických a konvenčních vín byla použita i metoda *K*-tého nejbližšího souseda (pro $k=1$, $k=2$ a $k=3$), která rozlišila biovína od konvenčních vín se 100% správností ($k=1$) a při hodnotě $k=2$ a $k=3$ klesla na 85.5 %, resp. 82.3 %.

Pokud je při klasifikaci vín brán do úvahy i typ vína (červená vs. bílá), tj. vzorky jsou klasifikovány do 4 podskupin (bio-bílé, konvenční-bílé, bio-červené, konvenční-červené), musí být konstruovány 3 diskriminační funkce, přičemž dominantní roli pro jejich konstrukci mají hodnoty $TEAC_{ABTS\cdot+}$ z UV/VIS i EPR měření, dále pak %RS, TPC, $TEAC_{DMPO}$ a AAE. Úspěšnost klasifikace v tomto případě dosahuje 90.4 %, přičemž červené biovíno *BR24* a bílá biovína *BW5* a *BW15* byla zařazena jako konvenční červená, resp. bílá vína, zatímco 3 bílá konvenční vína (*CW2*, *CW18* a *CW19*) byla zařazena mezi bílá ekologická vína. Výsledky všech diskriminačních a klasifikačních postupů jsou uvedeny v Tab. 11.

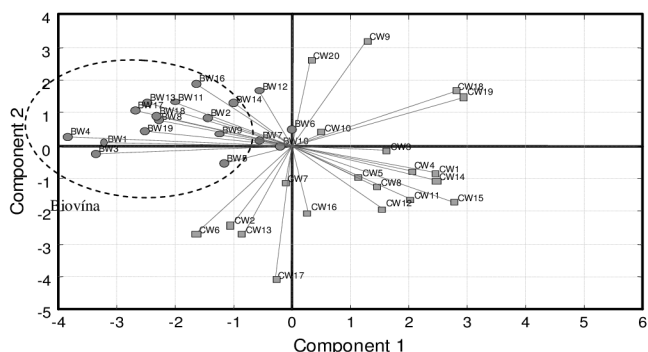
Tab. 11: Úspěšnost diferenciace slovenských biovín a konvenčních vín metodami kanonické diskriminační analýzy a *K*-tého nejbližšího souseda

Metoda	Všechna vína (%)	Všechna vína (4 skupiny – BW vs. CW vs. BR vs. CR) (%)	Bílá vína (%)	Červená vína (%)
Kanonická diskriminační analýza	85.5	90.4	100	95.2
<i>K</i> -tý soused	<i>k=1</i>	100.0	100.0	100.0
	<i>k=2</i>	85.5	83.9	85.4
	<i>k=3</i>	82.2	75.8	90.2

Přestože uvedené výsledky jsou velmi slibné, variabilita systému a úspěšnost klasifikovaných vzorků (klasifikační skóre) je ovlivňováno skutečností, že klasifikace byla provedena společně pro bílá a červená ekologická a konvenční vína. V dalším kroku, byla proto vína diferencovaná zvláště pro bílá vína a červená vína. Výsledky diskriminace pro bílá i červená vína jsou uvedeny v Tab. 11.

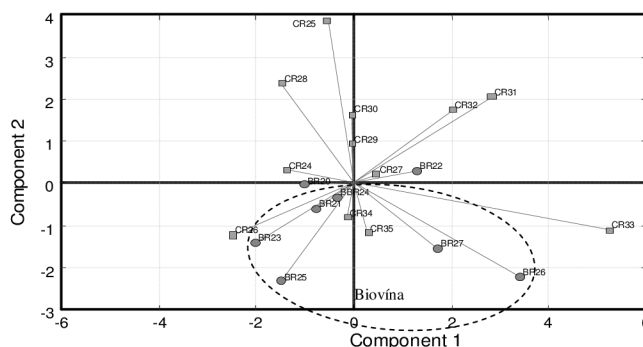
Z výsledků PCA bílých vín vyplývá, že první 3 hlavní komponenty vysvětlují přibližně 60 % variability původních dat. Toto nižší % naznačuje, že původní parametry antioxidační aktivity mezi sebou prakticky nekorelují a převážná většina z nich je má velkou váhu na plnou charakterizaci antioxidačních vlastností biovín a konvenčních vín. Graf hlavních komponent (Obr. 31) velmi výrazně rozčlenil bílá vína nejen do statisticky odlišných kvadrantů, ale především do dvou shluků, v kterých jsou jasně diferencované biovína od konvenčních vín. V první komponentě největší diskriminační schopnost prokázali deskriptory $TEAC_{DPPH(EPR)}$ a $TEAC_{ABTS\cdot+}$ z UV/VIS i EPR měření, zatímco v druhé komponentě %RS,

TEAC_{DMPO}, AAE, a k_{TEMPOL} , ve třetí komponentě pak hodnoty AAE a k_{TEMPOL} . Úspěšnost klasifikace bílých bio- a konvenčních vín metodou CDA dosáhla 97.4 %.



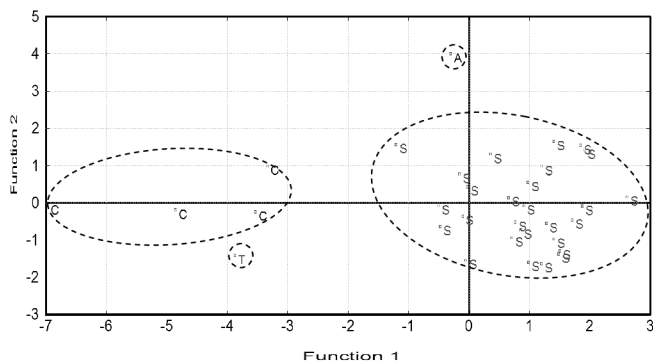
Obr. 31: Diferenciace slovenských bílých biovín (BW) a konvenčních vín (CW) na základě analýzy hlavních komponent 15 deskriptorů antioxidační aktivity.

U červených vín byla dosažena podobná efektivita diskriminace jako v případě bílých vín. Metoda PCA prokázala, že i červená biovína vína mohou být rozlišena od konvenčních vín. Na Obr. 32 (graf faktorových skóre) jsou zřejmé dva shluky vektorů, i když ne jednoznačně oddělené. První 3 hlavní komponenty kumulativně vysvětlují cca 64 % variability celého souboru dat. Největší váhu pro konstrukci komponent mají, vedle hodnot TPC a TEAC_{ABTS•+} z UV/VIS i EPR měření, hodnoty AAE, k_{TEMPOL} , %RS a TEAC_{DMPO}. Úspěšnost klasifikace červených vín podle produkčního systému dosáhla 94.7 %, přičemž největší váhu pro diskriminaci opět prokázaly hodnoty TEAC_{ABTS•+} z UV/VIS i EPR měření, AAE a TEAC_{DMPO}.



Obr. 32: Diferenciace slovenských červených biovín (BR) a konvenčních vín (CR) na základě analýzy hlavních komponent 15 deskriptorů antioxidační aktivity.

Přestože jsme měli k dispozici limitovaný počet zahraničních vzorků biovín (4 česká, 1 italská a rakouská), pokusili jsme se o jejich diferenciaci od vín slovenských. Metoda PCF vyselektovala jako nejvhodnější parametr pro diskriminaci hodnoty AAE, přičemž CDA analýza prokázala 97% úspěšnost klasifikace biovín do skupin podle země původu (Obr. 33).



Obr. 33: Kanonická diskriminační analýza biovín podle země původu (S – slovenská, C – česká, T – italská, A – rakouská).

Kromě diskriminace slovenských a zahraničních biovín, byla provedena i klasifikace vín podle příslušnosti k produkčnímu systému a krajiny původu, opět odděleně pro bílá a červená vína. Z výsledků CDA vyplývá, že bílá vína byla klasifikována na 95.8 % podle produkčního systému a krajiny původu, přičemž 2 vzorky slovenských vín byly nesprávně zařazeny do skupiny rakouských konvenčních vín. Co se týče diferenciací červených vín podle zvoleného kritéria, klasifikační skóre dosáhlo 80.8 % správně zařazených vzorků, přičemž ze všech vzorků červených vín bylo 5 slovenských vzorků chybně zařazeno do skupiny českých vín, ať už ekologických nebo konvenčních.

Z výsledků analýz vyplývá, že antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti vín jsou ovlivňovány několika faktory, a to způsobem produkce (ekologické vs. konvenční), ročníkem a odrůdovou skladbou. I když výsledky jednotlivých spektroskopických analýz odhalily značnou variabilitu a často nejednoznačné rozdíly mezi jednotlivými skupinami vín, zjištěné rozdíly jsou však dostačující pro úspěšnou diferenciaci a klasifikaci vín podle způsobu produkce s využitím metod vícerozměrné statistiky. Navíc se ukazuje, že uvedené deskriptory antioxidačních vlastností jsou využitelné i na regionální diferenciaci vzorků vín, i když s ohledem na limitovaný počet vzorků zahraničních vín jsou tyto závěry jen předběžné.

Na základě výsledků této studie lze konstatovat, že metodu EPR spektroskopie lze využít na rozlišování vín podle způsobu produkce buď samostatně, nebo v kombinaci EPR s UV/VIS spektroskopii s využitím metod multivariační statistické analýzy pro zpracování experimentálních dat.

Výsledky dosažené v oblasti charakterizace vín a jejich diferenciací podle způsobu pěstování byly podkladem pro vznik několika rukopisů odborných článků zaslaných nebo připravených do zahraničních odborných časopisů, dále jsou podkladem pro vznik několika odborných studií, abstraktů příspěvků na domácích a zahraničních konferencích, kde byli prezentováni buď ve formě odborných přednášek nebo posterů. Detaily jsou uvedeny v dalších částech dizertační práce.

6.2 Studium antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností ekologických a konvenčních špaldových mouk

Charakterizace antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností ekologických a konvenčních špaldových mouk byla realizována v rámci řešení projektu HUSK – 0901/1.2.1/0010 „*Využitie regionálnych zdrojov na produkciu funkčných potravín*“, který byl podpořený z prostředků Evropského fondu regionálního rozvoje v rámci programu příhraniční spolupráce Maďarská republika-Slovenská republika 2007-2013, a byla řešena i v rámci projektu bilaterální spolupráce mezi VUT Brno a VÚP Bratislava SK-CZ-0161 11.

Vzhledem k tomu, že se zastoupení hlavních složek (např. obsah minerálních látek, vitamínů, vlákniny, ale také polyfenolických látek, resp. dalších složek s potenciálním antioxidačním účinkem) v zrně příslušné odrůdy mění jen statisticky, značný vliv na chemickou skladbu zrna mají půdní, klimatické, agrotechnické technické, a v neposlední řadě i technologické postupy jeho následného zpracování [168]. Všechny uvedené faktory mohou výrazně ovlivnit vlastnosti zrna a obsah potenciálně zajímavých složek z hlediska jejich dalšího využití, např. při výrobě funkčních potravin. Z toho důvodu je třeba zabývat se problematikou izolace funkčních složek z mouk (polyfenoly, flavonoidy, organické kyseliny), především vztahem mezi podmínkami extrakce a obsahem těchto složek v připravených extraktech, jejich stabilitou, a je potřebné realizovat i komplexní charakterizaci vlastností takto získaných látek (např. u polyfenolů z antioxidačního hlediska) a posoudit jejich vhodnost pro další využití v potravinářském průmyslu.

Celkově se sledovalo 8 parametrů – deskriptorů antioxidační aktivity: celkový obsah polyfenolů, celkový obsah flavonoidů, schopnost terminovat radikály ABTS^{•+} a [•]DPPH stanovené z UV/VIS a EPR měření. S ohledem na velké množství a variabilitu získaných experimentálních údajů byla všechna data zpracována metodou ANOVA a vícerozměrnými statistickými metodami – metodou hlavních komponent a kanonickou diskriminační analýzou, obdobně jako u vzorků vín, s cílem diferencovat mouky podle příslušných kritérií – původ, podmínky pěstování, odrůda.

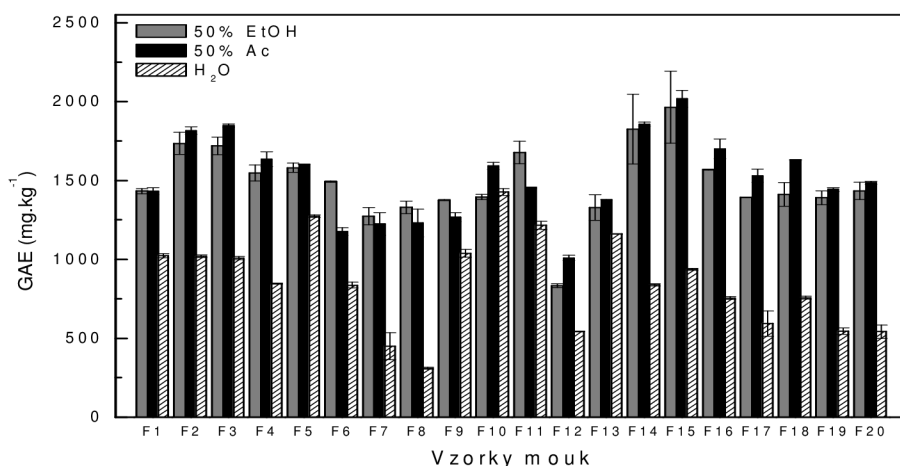
6.2.1 Vliv extrakčních podmínek na antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti ekologických a konvenčních mouk

Před analýzou vzorků špaldových mouk, které byly připraveny ze zrn odrůdy pšenice špalda ÖKO-10 a Lajta pocházejících ze společně realizovaných polních pokusů, se posuzoval vliv extrakčních podmínek na obsah funkčních složek v extraktech komerčně dostupných ekologických a konvenčních mouk slovenského a maďarského původu s cílem optimalizovat podmínky extrakce a všech následných experimentů. Jednalo se o mouky pšeničné, žitné a špaldové, z hlediska technologického zpracování o mouky celozrnné, hrubé, hladké a celozrnné hladké.

Pomocí UV/VIS a EPR spektroskopie se posuzoval vztah mezi druhem použitého extrakčního činidla (50% etanol/voda (v/v), 50% aceton/voda (v/v) a voda) a antioxidačními vlastnostmi připravených extraktů, s cílem vybrat nejvhodnější extrakční systém pro izolaci tzv. funkčních složek z mouk (polyfenoly a flavonoidů), které lze potenciálně využít jako přídatné látky v potravinářském průmyslu. Při klasifikaci a diskriminaci testovacích vzorků se pro všechny extrakční systémy využily nejen deskriptory antioxidační aktivity, ale i obsah minerálních látek (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn) stanovený metodou AAS.

6.2.1.1 UV/VIS experimenty

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven identickým postupem jako ve vzorcích vín. Z Obr. 34 je zřejmé, že hodnoty TPC jsou výrazně ovlivňovány volbou rozpouštědla. Bez ohledu na druh mouky, způsob technologického zpracování (mletí), způsob pěstování nebo původ se koncentrace polyfenolů v etanolových extraktech pohybovala v rozmezí od 833 mg.kg⁻¹ (F12) do 1964 mg.kg⁻¹ (F15), v acetonových extraktech od 1176 mg.kg⁻¹ (F12) do 2018 mg.kg⁻¹ (F15), zatímco ve vodných extraktech od 309 mg.kg⁻¹ (F8) do 1427 mg.kg⁻¹ (F10).



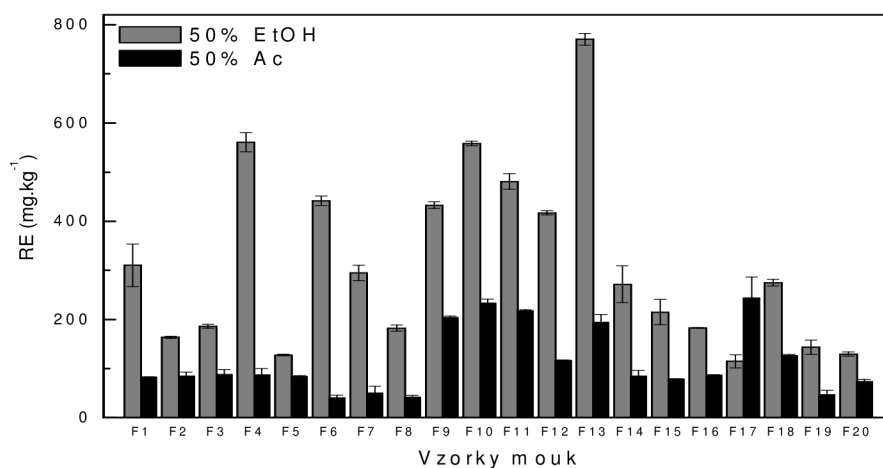
Obr. 34: Obsah polyfenolů v extraktech analyzovaných mouk vyjádřený jako hodnoty GAE (mg.kg⁻¹). Detailní informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tab. 5.

Nejvyšší průměrné hodnoty TPC se dosáhly u extraktů v 50% acetonu a 50% etanolu, přičemž tyto dvě rozpouštědla jsou při zohlednění chyby měření z hlediska efektivity porovnatelné. Z výsledků měření dále vyplývá, že relativně nejvyšší byl obsah polyfenolů stanoven v acetonových extraktech ze špaldových mouk, následovaných pšeničnými a žitnými moukami. U etanolových extraktů je průměrný obsah TPC z hlediska druhové skladby nejvyšší u pšeničných > špaldových > žitných mouk, zatímco u vodných extraktů byl relativně nejvyšší obsah TPC u vzorků připravených z žitných mouk. Z Obr. 34 není zřejmá souvislost mezi obsahem polyfenolů a způsobem technologického zpracování, což je v souladu se studií autorů Sedej *et al.*, kteří porovnávali obsah TPC v pšeničných a pohankových moukách s různým stupněm mletí [218].

Celkový obsah flavonoidů v připravených extraktech byl stanoven pomocí 2-aminoethyl-difenyborátu a výsledky byly vyjádřeny jako rutin ekvivalent (Obr. 35). Obsah flavonoidů nebyl stanoven u vodných extraktů, z důvodu tvorby zákalu, který rušil vlastní spektrofotometrické stanovení.

Z výsledků měření vyplývá, že koncentrace flavonoidů je rovněž závislá na druhu použitého extrakčního činidla. Na rozdíl od polyfenolů, nejvyšší koncentrace TFC byly stanovené v etanolových extraktech žitných mouk (c ~ 531±144 mg.kg⁻¹), následovaných extrakty pšeničných a špaldových mouk s průměrným obsahem TFC na úrovni 176±60 mg.kg⁻¹. Naproti tomu, nejnižší obsah TFC byl stanoven v acetonových extraktech pšeničných mouk F6, F7 a F8.

Z výsledků měření na základě vzájemných korelací není zřejmá souvislost mezi obsahem polyfenolů, resp. flavonoidů a charakteristikami studovaných mouk (původ, druh, způsob pěstování, způsob zpracování), anebo jsou tyto korelace statisticky málo významné. Z hodnot korelačních koeficientů je také zřejmá nízká korelace obsahu polyfenolů a flavonoidů ($R^2 < 0.281$), což může souviset s odlišností použitých metod, a v neposlední řadě možností zatížení výsledků rušivými vlivy (např. v případě polyfenolů, přítomnost redukujících látek nebo vitamínů) [170]. Avšak s ohledem na tyto skutečnosti je možné očekávat, že jak TPC, tak i TFC bude možné efektivně využít pro účely diskriminace vzorků pomocí multivariační statistiky.



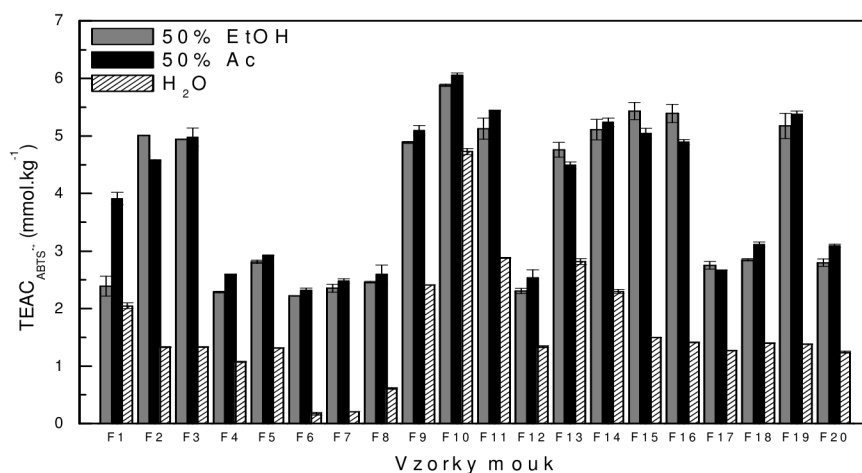
Obr. 35: Obsah flavonoidů v etanolových a acetonových extraktech analyzovaných mouk vyjádřený jako hodnoty RE(mg.kg⁻¹). Detailní informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tab. 5.

Antioxidační a radikál-zhášející aktivita extraktů mouk ve všech třech rozpouštědlech charakterizovaná metodou UV/VIS spektroskopie s využitím radikálů ABTS^{•+} a [•]DPPH byla vyjádřena jako procentuální pokles koncentrace příslušného radikálu, v důsledku jeho terminace složkami příslušného extraktu.

Schopnost většiny extraktů terminovat kation-radikál ABTS^{•+} se pohybovala v rozmezí 70–80 %, s výjimkou vodných extraktů pšeničných mouk F6 a F7, jejichž kapacita terminovat tento radikál dosahovala pouze 20 %. Schopnost etanolových a acetonových extraktů terminovat radikál [•]DPPH dosahovala ve většině případů max. 40 %, výjimku opět tvořily vzorky bílých mouk (F6, F7, F8 a F12) u kterých pokles koncentrace [•]DPPH v experimentálním systému nepřekročil hodnotu 20 %. Ve vodných extraktech bylo monitorování poklesu koncentrace [•]DPPH znesnadněno tvorbou zákalu.

Vzhledem k tomu, že na základě tohoto vyjádření není porovnání extrakčních systémů objektivní, především z důvodu odlišného řazení příslušných extraktů mouk, radikál-zhášející aktivita extraktů byla rovněž kvantifikována přepočtem absorbance roztoku v definovaném čase (t=10.5 min od začátku terminační reakce) na hodnoty TEAC podle rovnice 24. Hodnoty TEAC_{ABTS^{•+}} vypočítané pro všechny extrakty mouk ze skupiny testovacích vzorků jsou znázorněny na Obr. 36. Stejně jako v případě celkového obsahu polyfenolů a flavonoidů, radikál-zhášející aktivita extraktů je výrazně závislá na druhové skladbě, přičemž jsou zřejmé rozdíly i v rámci druhově příbuzných vzorků, což je možné dát do souvislosti se způsobem mletí.

Z Obr. 36 je rovněž zřejmé, že celozrnné mouky jsou charakterizovány vyššími hodnotami $TEAC_{ABTS^{•+}}$, s výjimkou pšeničné a špaldové celozrnné mouky *F5*, resp. *F18* s porovnatelnými hodnotami $TEAC$ bílých mouk. Nejvyšší průměrné hodnoty $TEAC$ byly stanoveny v etanolových a acetonových extraktech žitných mouk s porovnatelnými hodnotami (4.6 mmol.kg^{-1} , resp. 4.7 mmol.kg^{-1}). Naproti tomu, vodné extrakty pšeničných a špaldových mouk byly charakterizovány nejnižšími hodnotami $TEAC_{ABTS^{•+}}$ ($\sim 1.6 \text{ mmol.kg}^{-1}$).



Obr. 36: Radikál-zhášející kapacita extraktů v přítomnosti kation-radikálu $ABTS^{•+}$ vyjádřená jako $TEAC_{ABTS^{•+}}$ vyhodnocena z UV/VIS měření (mmol.kg^{-1}). Detailní informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tab. 5.

Naproti tomu, schopnost etanolových a acetonových extraktů mouk terminovat radikál $^{\bullet}DPPH$ vyjádřená jako hodnoty $TEAC_{DPPH}$ není výrazně ovlivňována volbou rozpouštědla, druhovou skladbou ani produkčním systémem. Nejvýrazněji se uplatňuje vliv technologického zpracování, kdy bílé mouky jsou charakterizovány přibližně o 50 % nižšími hodnotami $TEAC_{DPPH}$ než mouky celozrnné. Hodnoty $TEAC$ v etanolových extraktech se pohybovaly v rozmezí $0.2 \text{ mmol.kg}^{-1} - 0.9 \text{ mmol.kg}^{-1}$, zatímco v acetonových extraktech od $0.1 \text{ mmol.kg}^{-1} - 1.0 \text{ mmol.kg}^{-1}$. Vzorek mouky *F7* byl charakterizován nejnižší hodnotou $TEAC_{DPPH}$, zatímco vzorek *F10* nejvyšší, bez ohledu na použitý extrakční systém.

Zatímco u komparace ekologických a konvenčních vín se potvrdily vysoké korelace obsahu polyfenolů s antioxidační aktivitou, v případě testovaných vzorků mouk byly zjištěny průměrné, resp. velmi nízké hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem polyfenolů a flavonoidů a antioxidační aktivitou ($R < 0.528$, resp. $R < 0.130$) [219-221].

6.2.1.2 EPR experimenty

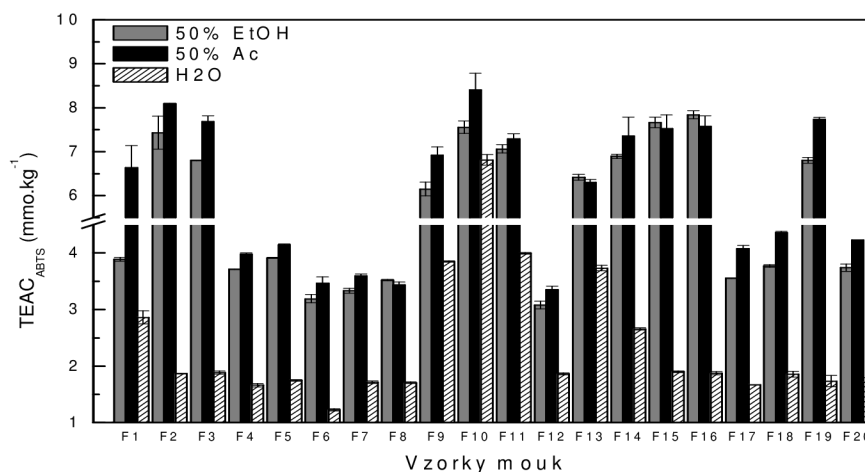
Hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ vypočítané pro extrakty mouk ve všech rozpouštědlech jsou znázorněny na Obr. 37. Z prezentovaných údajů vyplývá, že i když všechny extrakty vykazovaly radikál-zhášející vlastnosti, výraznější jsou pro extrakty připravené do 50% etanolu a 50% acetonu.

Jsou zřejmé rozdíly mezi ekologickými a konvenčními moukami v závislosti na volbě rozpouštědla, kdy hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ biomouk jsou přibližně o 30–40% vyšší než hodnoty stanovené v moukách konvenčních (např. acetonové a vodné extrakty pšeničné a špaldové celozrnné mouky hladké *F1/F5*, resp. *F14/F18*).

Radikál-zhášející aktivita extraktů mouk je v souladu s naším očekáváním výrazně závislá na druhové skladbě (v pořadí pšeničná > špaldová > žitná), avšak i mezi extrakty ze vzorků

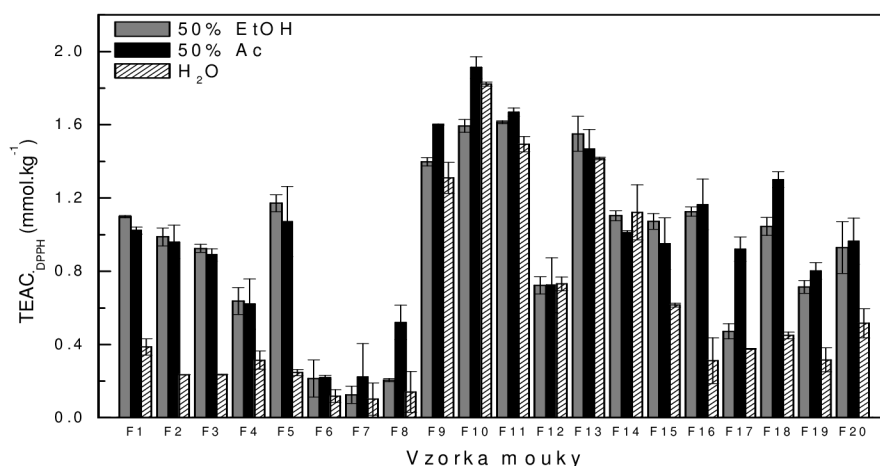
identického druhu se projevily výrazné rozdíly. Tento jev může souviset se způsobem technologického zpracování (zejména mletí). Při porovnání vzorků druhově identických mouk s odlišným způsobem mletí je zřejmé, že ve většině případů celozrnné mouky projevují vyšší antioxidační vlastnosti než mouky bílé (hladké).

Na základě výsledků měření se ukazuje i souvislost mezi radikál-zhášející aktivitou mouk a způsobem pěstování, resp. původem vzorku, avšak tyto rozdíly jsou většinou ovlivňovány nejen volbou rozpouštědla, ale především způsobem technologického zpracování.



Obr. 37: Radikál-zhášející kapacita extraktů v přítomnosti kation radikálu $ABTS^{*+}$ vyjádřená jako $TEAC_{ABTS^{*+}}$ ($mmol.kg^{-1}$) vyhodnocena z EPR měření. Detailní informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tab. 5.

Stejný trend byl pozorován pro hodnoty $TEAC_{DPPH}$ (Obr. 38), přičemž v souladu s našimi předcházejícími zkušenostmi, jsou hodnoty $TEAC_{ABTS^{*+}}$ přibližně 4x vyšší než hodnoty $TEAC_{DPPH}$ [212, 216]. Nejnižší hodnoty $TEAC_{DPPH}$ byly zjištěny pro vzorky bílých pšeničných mouk, naopak nejvyšší $TEAC_{DPPH}$ hodnoty vykazovaly extrakty žitných mouk, bez ohledu na použité rozpouštědlo.



Obr. 38: Radikál-zhášející kapacita extraktů v přítomnosti radikálu $^{\bullet}DPPH$ vyjádřená jako $TEAC_{DPPH}$ ($mmol.kg^{-1}$) vyhodnocena z EPR měření. Detailní informace o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tab. 5.

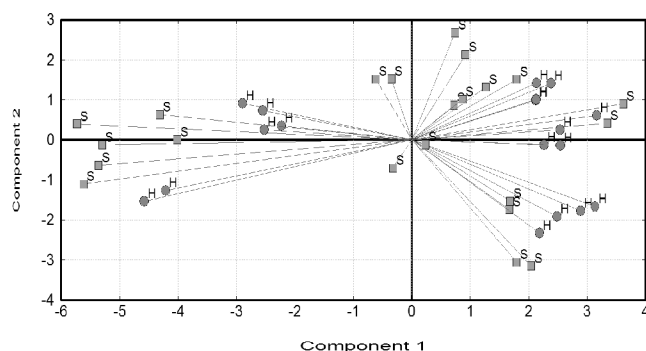
Opět se potvrdila vysoká korelace mezi hodnotami $TEAC_{(UV)}$ a $TEAC_{(EPR)}$. Hodnoty korelačních koeficientů se pohybují v rozmezí $R \sim 0.900-0.982$. Ačkoli se v případě $ABTS^{•+}$ a $^•DPPH$ testů zjistila průměrná, resp. nízká korelace hodnot $TEAC$ s obsahem polyfenolů, ukazuje se, že hodnoty $TEAC$ jsou v obou případech výrazně závislé na druhu použitého rozpouštědla.

6.2.1.3 Statistické zpracování výsledků

Soubor všech experimentálních charakteristik byl zpracovaný metodami vícerozměrné statistiky, metodou hlavních komponent a kanonickou diskriminační analýzou, s cílem realizovat komplexní hodnocení všech experimentálních charakteristik studovaných mouk v jednom kroku a zhodnotit vzájemné korelace experimentálních parametrů a jejich vliv na vlastnosti celého souboru.

Pro každé rozpouštědlo byly vzorky klasifikovány a diferencovány podle 4 kritérií: původ vzorku (SK/HU – slovenský/maďarský), způsob pěstování (B/K – ekologické/konvenční), druh mouky (W/R/S – pšeničná/žitná/špaldová) a způsob technologického zpracování (R/S/G/G_S – hladká/hrubá/celozrnná/celozrnná hladká).

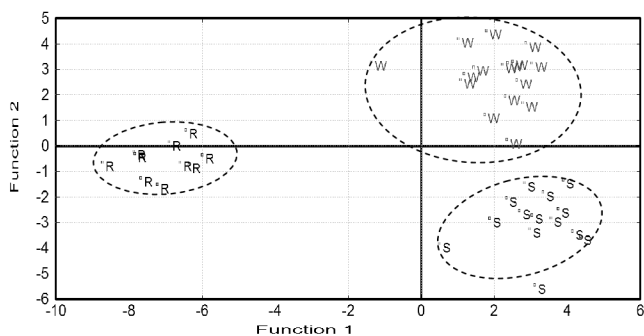
Výsledky statistické analýzy pro etanolové extrakty mouk jsou znázorněné na Obr. 39 až Obr. 41. Při klasifikaci a diskriminaci testovacích vzorků byly využité jak deskriptory antioxidační aktivity, tak i obsah minerálních prvků (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn), s cílem zakomponovat do klasifikační procedury maximum proměnných, u kterých lze předpokládat ovlivnění variability, a tím zvýšit korektnost klasifikační procedury. Diferenciace etanolových extraktů podle původu (SK vs. HU) pomocí analýzy hlavních komponent je znázorněna na Obr. 39. Z obrázku je zřejmé, že vzorky mouk se podařilo jen částečně klasifikovat. Z variační tabulky vyplývá, že první 3 hlavní komponenty popisují kumulativně 77 % celkové variability systému. Na klasifikaci vzorků podle zvoleného kritéria mají nejvýraznější vliv antioxidační charakteristiky, především schopnost terminovat $^•DPPH$ (hodnoty vlastních vektorů > 0.302), ale i obsah minerálních látek (především Ca, Cu, K, Mg, Fe)



Obr. 39: Klasifikace etanolových extraktů mouk podle geografického původu (S – SK vs. H – HU) pomocí analýzy hlavních komponent.

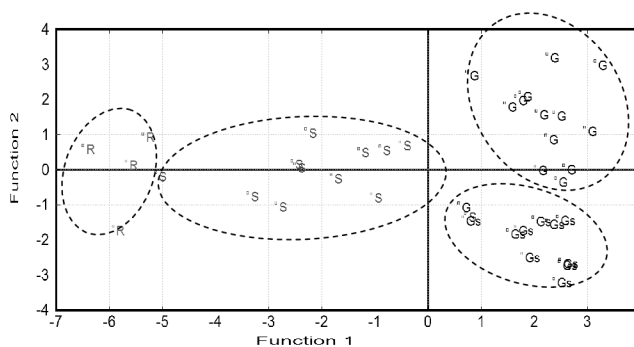
Obdobné výsledky byly dosaženy i při diskriminaci těchto extraktů podle způsobu pěstování. Zatímco při klasifikaci podle druhové skladby mají největší váhu antioxidační charakteristiky a obsah Cu, Ca a Zn, při diskriminaci podle způsobu technologického zpracování pak dominantní váhu mají výsledky EPR a UV/VIS experimentů s $ABTS^{•+}$. Ukazuje se, že vliv rozpouštědla na popis variability systému je prakticky zanedbatelný, ale váha jednotlivých proměnných pro konstrukci hlavních komponent je výrazně závislá na druhu extrakčního činidla, což je logickým důsledkem závislosti jednotlivých experimentálních charakteristik na použitém extrakčním činidle, jak je diskutováno výše.

Na Obr. 40 a Obr. 41 jsou znázorněny výsledky kanonické diskriminační analýzy etanolových extraktů mouk podle druhové skladby, resp. způsobu technologického zpracování. Z obrázků je zřejmé, že v případě diskriminace podle druhové skladby se dosáhla 100% úspěšnost klasifikace mouk, zatímco v případě diferenciaci mouk podle způsobu technologického zpracování 3 vzorky mouk (*F1*, *F8* a *F20*) byli nesprávně zařazené mezi celozrnné a hrubé mouky, čímž úspěšnost klasifikace klesla na 93%.



Obr. 40: Kanonická diskriminační analýza etanolových extraktů mouk podle druhové skladby (W/R/S – pšeničná/žitná/špaldová mouka).

Obr. 41: Kanonická diskriminační analýza etanolových extraktů mouk podle způsobu technologického zpracování (R/S/G/G_s – hladká/hrubá/celozrnná/celozrnná hladká mouka).



Vliv extrakčního činidla použitého na přípravu extraktů na úspěšnost diskriminace vzorků mouk podle sledovaných kritérií je zřejmý z Tab. 12. Z prezentovaných údajů je zřetelná vysoká úspěšnost klasifikace vzorků mouk pro všechny extrakční systémy a zvolená kritéria (> 85 %), přičemž při klasifikaci mouk podle druhové skladby se ve všech 3 případech dosáhla 100% správná klasifikace.

Tab. 12: Výsledky kanonické diskriminační analýzy vzorků mouk, resp. jejich extraktů v různých rozpouštědlech podle různých diskriminačních kritérií.

Parametr	Extrakční systém	Úspěšnost klasifikace (%)	Počet nesprávně klasifikovaných vzorků
Krajina původu	50% etanol/voda	95.0	2
	50% aceton/voda	95.0	2
	Voda	87.5	5
Způsob pěstování	50% etanol/voda	90.0	4
	50% aceton/voda	87.5	5
	Voda	95.0	2
Druhová skladba	50% etanol/voda	100.0	0
	50% aceton/voda	100.0	0
	Voda	100.0	0
Technologické zpracování	50% etanol/voda	93.0	3
	50% aceton/voda	95.0	2
	Voda	87.5	5

Z porovnání výsledků pro jednotlivé extrakční systémy je zřejmé, že klasifikační skóre pro extrakty v 50% etanolu a 50% acetonu je porovnatelné, resp. vyšší ve prospěch 50% etanolu. Pouze v případě klasifikace podle způsobu technologického zpracování se u acetonových extraktů dosáhlo lepší klasifikační skóre. Vodné extrakty jsou charakteristické nejlepším klasifikačním skóre podle způsobu pěstování (~ 95 %), zatímco klasifikační skóre podle krajiny původu a způsobu technologického zpracování je v porovnání s ostatními systémy nejnižší, cca 88 %.

Na základě výsledků EPR a UV/VIS měření lze konstatovat, že druh extrakčního činidla výrazně ovlivňuje složení extraktů, včetně koncentrace polyfenolů a flavonoidů, a tedy i výslednou antioxidační aktivitu extraktů mouk. Z hlediska výtěžnosti tzv. funkčních složek (polyfenolů a flavonoidů), je nejúčinnějším extrahovadlem 50% etanol/voda a 50% aceton/voda, jejichž extrakční účinnost je porovnatelná. Z praktických důvodů, a z důvodů dalšího potencionálního využití izolátů jako přídatných látek v potravinářském průmyslu, byl pro izolaci polyfenolických látek z mouk získaných ze společných polních pokusů realizovaných v letech 2010-2012 zvolený 50% etanol/voda jako nejvhodnější extrakční systém.

6.2.2 Charakterizace antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností ekologických a konvenčních špaldových mouk z polních pokusů

Vzorky špaldových mouk byly připraveny ze dvou odrůd pšenice špaldy, ÖKO-10 a Lajta, pěstovaných v režimu ekologického a konvenčního zemědělství v produkčním období 2010/2011 a 2011/2012 na území Slovenska a Maďarska. Polní pokusy byly realizované v maďarských regionech Rábcakapi (*R*, ekologické), Mosonmagyaróvár (*M*, konvenční) a Sopronkövesd (*So*, konvenční), a to pro obě produkční sezóny. V roce 2011/2012 byly polní pokusy realizované také na území Slovenska v oblasti Sládkovičovo (*Sl*, ekologické) a Lehnice (*L*, konvenční).

Ze špaldových mouk byly připraveny extrakty do 50% etanolu. Pomocí UV/VIS a EPR spektroskopie se monitorovaly radikál-zhášející vlastnosti připravených extraktů v přítomnosti radikálů ABTS^{•+} a DPPH, stejně tak i celkový obsah polyfenolů a flavonoidů.

Všechny deskriptory antioxidační aktivity studovaných extraktů špaldových mouk byly zpracovány metodami ANOVA a multivariační statistické analýzy s cílem posoudit vliv různých faktorů, např. rok produkce, způsob pěstování, odrůdy špaldy nebo geografického původu, na monitorované charakteristiky špaldových mouk.

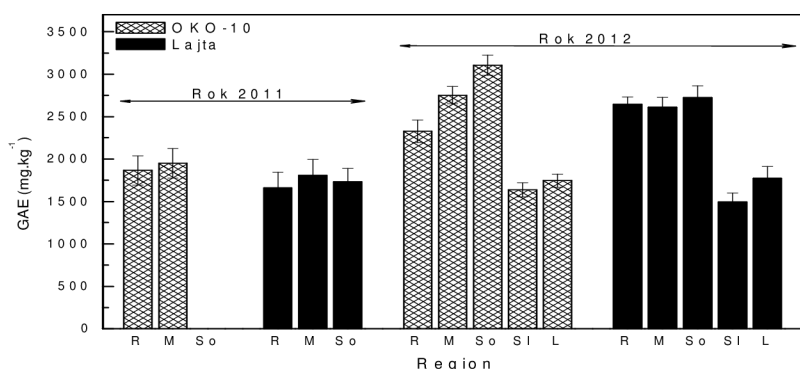
6.2.2.1 Obsah polyfenolů a flavonoidů ve vzorcích špaldových mouk

Průměrný obsah polyfenolů v etanolových extraktech špaldových mouk analyzovaných v roce 2011 a 2012 je znázorněn na Obr. 42, přičemž vzorky jsou rozděleny podle roku produkce, odrůdy a regionu.

Z prezentovaných údajů je zřejmý jednoznačný sezónní vliv na obsah TPC v extraktech špaldových mouk ($P = 0.0000$), přičemž mouky roku 2012 byly charakterizovány vyšším obsahem polyfenolů než vzorky z roku 2011. Bez ohledu na ročník, odrůdu nebo region, konvenční vzorky byly charakterizovány přibližně o 15 % vyšším obsahem TPC než vzorky ekologické. Tyto výsledky jsou v dobré shodě s výsledky studie Žuchowski *et al.*, kteří porovnávali obsah polyfenolů a fenolických kyselin v ekologicky a konvenčně pěstované ozimé pšenici seté [222]. Nejvyšší a nejnižší průměrné koncentrace polyfenolů byly zjištěny

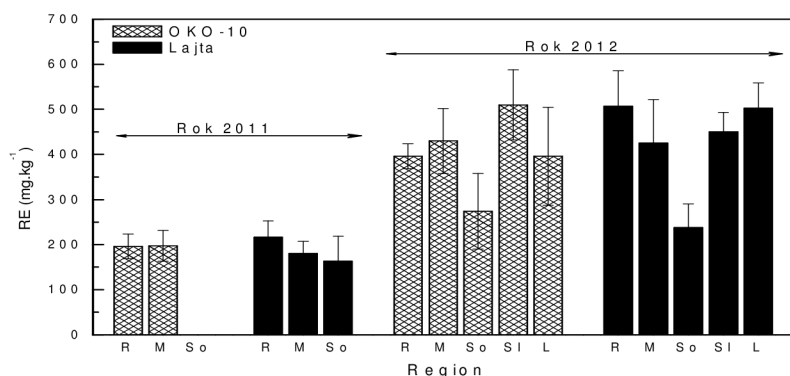
v extraktech mouk připravených z pšenice špaldy vypěstované v regionu Sopronkövesd ($2915 \pm 233 \text{ mg.kg}^{-1}$), resp. Sládkovičovo ($1566 \pm 117 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Z prezentovaných výsledků je také zřejmé, že obsah TPC v extraktech špaldových mouk analyzovaných v roce 2011 není výrazně ovlivněn způsobem produkce, regionem, ani odrůdovou skladbou. Naproti tomu, obsah TPC v roce 2012 je ovlivňován jak kultivačními postupy, tak i původem (SK vs. HU). Přestože je rozdíl mezi odrůdami v roce 2012 statisticky nevýznamný ($P \sim 0.2419$), extrakty z odrůdy ÖKO-10 byly charakterizovány vyšším obsahem TPC ve srovnání s odrůdou Lajta ($2358 \pm 509 \text{ mg.kg}^{-1}$, resp. $2186 \pm 492 \text{ mg.kg}^{-1}$).



Obr. 42: Průměrný obsah polyfenolů v etanolových extraktech špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta, sklizených v letech 2011 a 2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska (R – Rábcakapi, M – Mosonmagyaróvár, So – Sopronkövesd, Sl – Sládkovičovo, L – Lehnice) vyjádřený jako hodnoty GAE (mg.kg^{-1}). Detaily vzorků jsou uvedeny v Tab. 6.

Na Obr. 43 je znázorněn průměrný obsah flavonoidů v etanolových extraktech špaldových mouk vyjádřený jako hodnoty rutin ekvivalent. Z výsledků měření vyplývá, že koncentrace flavonoidů je přibližně o 50 % vyšší ve vzorcích mouk analyzovaných v roce 2012. Výjimku představují vzorky z regionu Sopronkövesd s obsahem flavonoidů na úrovni $225 \pm 79 \text{ mg.kg}^{-1}$, což je porovnatelná hodnota s průměrným obsahem TFC ve vzorcích roku 2011. Bez ohledu na ročník, odrůdu nebo region, vyšší koncentrace flavonoidů byly zjištěny v extraktech mouk připravených z pšenice špaldy pěstované v režimu ekologického zemědělství, a to přibližně o 20 %.



Obr. 43: Průměrný obsah flavonoidů v etanolových extraktech špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta, sklizených v letech 2011 a 2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska (R – Rábcakapi, M – Mosonmagyaróvár, So – Sopronkövesd, Sl – Sládkovičovo, L – Lehnice) vyjádřený jako hodnoty RE (mg.kg^{-1}). Detaily vzorků jsou uvedeny v Tab. 6.

Z výsledků měření však není zřejmá souvislost mezi obsahem flavonoidů a různými typy ošetření pšenice špaldy během vegetačního období. Slovenské vzorky byly charakterizovány vyšším obsahem TFC ve srovnání s maďarskými vzorky, přičemž nejvyšší průměrné koncentrace flavonoidů ($507 \pm 62 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) byly zjištěny v extraktech mouk připravených z pšenice špaldy vypěstované v oblasti Sladkovičovo. Zatímco při porovnání vzorků sezóny 2010/2011 platí stejné trendy jako tomu bylo u celkového obsahu polyfenolů, při komparaci vzorků z roku 2012 se zjistil, přibližně o 6 %, vyšší obsah TFC v extraktech odrůdy ÖKO-10 v porovnání s odrůdou Lajta, tento rozdíl je však ze statistického hlediska zanedbatelný.

Rozdíly obsahu polyfenolů a flavonoidů mohou souviset s nerovnoměrným pomletím obilných zrn, ale i s adaptabilitou jednotlivých odrůd, nebo různým způsobem ošetření. Toto může souviset i s tím, že v roce 2012 byly, na základě analýzy půd vykonaných v rámci společných polních pokusů, do půdy přidávány mikro- a makronutrienty, zejména komplexy Cu^{2+} a Zn^{2+} , což do jisté míry může ovlivnit obsah sekundárních metabolitů v studovaných plodinách. Ze vzájemných korelací přesto není zřejmá přímá souvislost mezi obsahem polyfenolů, resp. flavonoidů a způsobem ošetření během kulivačního období, což je v dobré shodě se studii Langenkämpera *et. al.* a Konopky *et. al.*, kteří posuzovaly vliv ekologických a minerálních hnojiv na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu pšenice seté [220, 221]. Stejně jako v případě testovacích vzorků, z hodnot korelačních koeficientů jsou zřejmé velmi nízké korelace obsahu polyfenolů a flavonoidů ($R < 0.065$), a to bez ohledu na ročník, odrůdu, region nebo původ [219].

6.2.2.2 ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivity špaldových mouk charakterizovaná pomocí UV/VIS spektroskopie

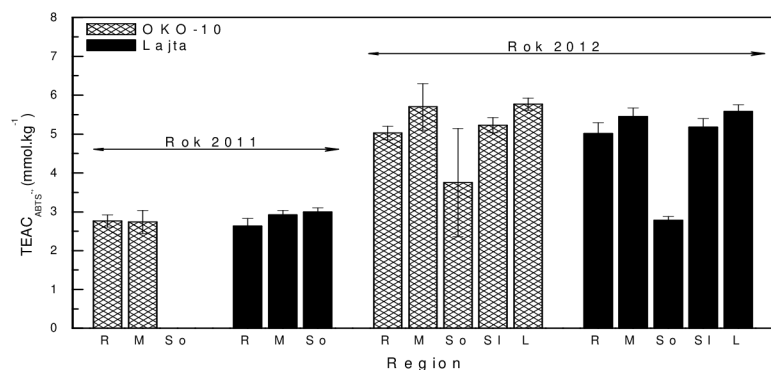
Antioxidační a radikál-zhášející aktivita etanolových extraktů špaldových mouk charakterizovaná metodou UV/VIS spektroskopie s využitím radikálů ABTS^{•+} a DPPH se vyjádřila jako procentuální pokles koncentrace příslušného radikálu. Schopnost většiny extraktů terminovat kation-radikál ABTS^{•+} se pohybovala v rozmezí 65-90 % bez ohledu na ročník, odrůdu nebo původ. Z výsledků měření rovněž vyplývá, že konvenční vzorky byly charakterizovány větší ABTS^{•+} radikál-zhášející aktivitou než vzorky připravené z pšenice špaldy pěstované v režimu ekologického zemědělství. Rozdíly se zjistily i mezi roky 2011 a 2012, kdy se schopnost extraktů terminovat ABTS^{•+} pohybovala na úrovni 84 %, resp. 70 %.

DPPH radikál-zhášející aktivita extraktů se pohybovala v rozmezí 20–50 %, přičemž nejnižší hodnoty byly zjištěny u ekologických vzorků bez ohledu na ročník nebo původ. Mimoto, schopnost extraktů špaldových mouk připravených z odrůdy Lajta byla o cca 10% vyšší než u odrůdy ÖKO-10.

Pro objektivní porovnání s výsledky EPR měření, a pro eliminaci rozdílů vyplývajících z odlišného ředění vzorků, byl procentuální pokles koncentrace daného radikálu v systému přepočítán na hodnotu TEAC.

Z Obr. 44, na kterém jsou znázorněny průměrné hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{\bullet+}}$, je zřejmý sezónní vliv. Co se týče rozdílů mezi ekologickými a konvenčními vzorky, a rozdílů mezi odrůdami, platí podobné trendy jako v případě celkového obsahu polyfenolů a flavonoidů, tzn. vyšší hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{\bullet+}}$ konvenčních mouk, a mouk připravených z odrůdy ÖKO-10. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi maďarskými a slovenskými moukami s hodnotami TEAC na úrovni $3.8 \pm 1.2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, resp. $5.4 \pm 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

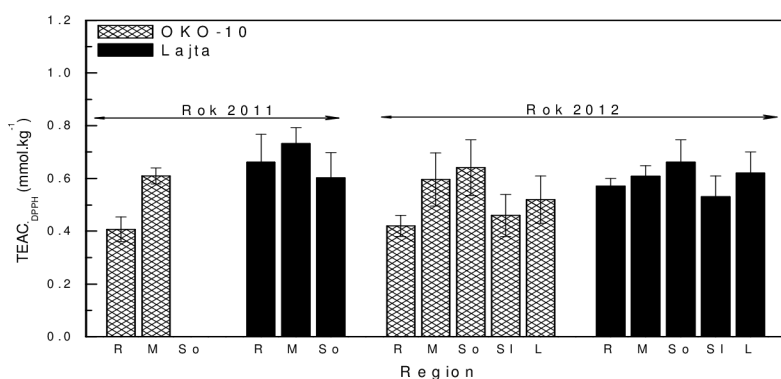
Zatímco jsou hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ extraktů mouk v roce 2011 porovnatelné pro regiony s režimem konvenčního zemědělství (Mosonmagyaróvár vs. Sopronkövesd), rozdíly mezi regiony s režimem ekologického (Rábcakapi) a konvenčního zemědělství jsou ze statistického hlediska významné ($P = 0.0008$). V roce 2012 jsou porovnatelné průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ všech regionů, s výjimkou regionu Sopronkövesd. Přestože je rozdíl mezi ekologickými a konvenčními vzorky roku 2012 zanedbatelný, ekologické vzorky špaldových mouky byly charakterizovány vyššími hodnotami $TEAC_{ABTS^{•+}}$ ($\sim 5.1 \pm 0.2 \text{ mmol.kg}^{-1}$).



Obr. 44: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ (mmol.kg^{-1}) etanolových extraktů špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta, sklizených v letech 2011 a 2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska (R – Rábcakapi, M – Mosonmagyaróvár, So – Sopronkövesd, SI – Sládkovičovo, L – Lehnice). Detaily vzorků jsou uvedeny v Tab. 6.

Schopnost etanolových extraktů špaldových mouk analyzovaných v roce 2011 a 2012 terminovat radikál DPPH vyjádřená jako $TEAC_{DPPH}$ je znázorněn na Obr. 45. Přestože z grafu není zřejmý jednoznačný rozdíl mezi roky 2011 a 2012, ze statistického porovnání vyplývá, že špaldové mouky analyzované v roce 2011 jsou charakteristické vyššími hodnotami $TEAC_{DPPH}$ než vzorky roku 2012, a to přibližně o 14 %. V souladu s předchozími testy, vyšší hodnoty TEAC byly zjištěny v konvenčních vzorkách.

Zatímco slovenské vzorky byly charakterizovány vyššími hodnotami $TEAC_{ABTS^{•+}}$ než vzorky maďarské, v případě $TEAC_{DPPH}$ byl pozorován opačný trend. Schopnost extraktů špaldových mouk terminovat radikál DPPH je rovněž ovlivňována odrůdovou skladbou.

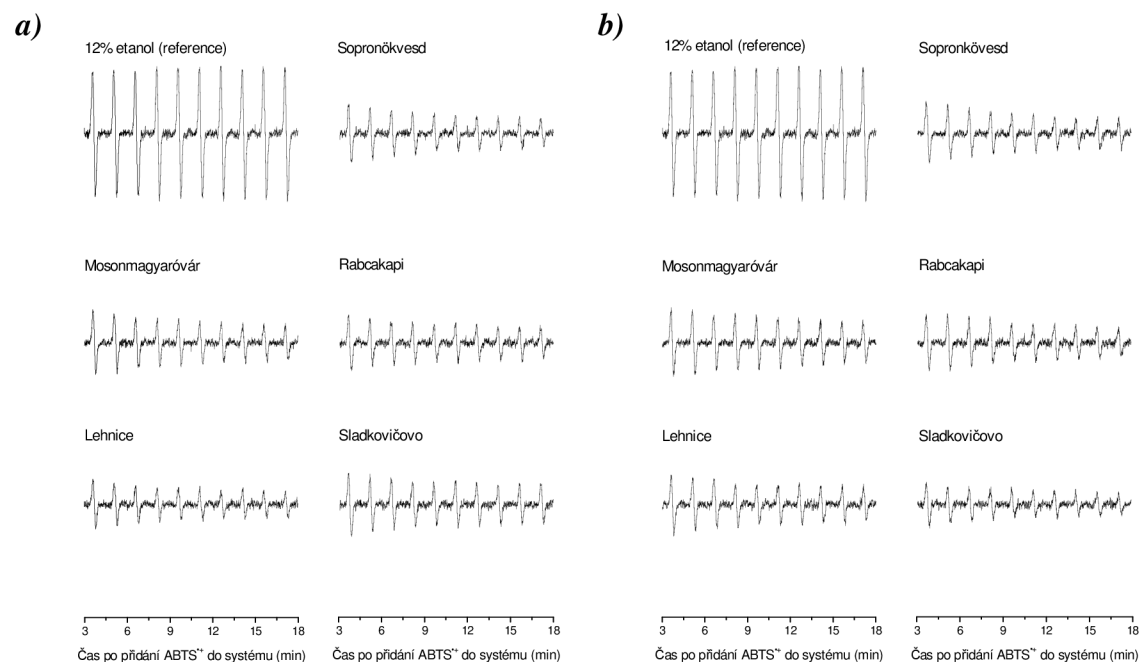


Obr. 45: Průměrné hodnoty $TEAC_{DPPH}$ (mmol.kg^{-1}) etanolových extraktů špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta, sklizených v letech 2011 a 2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska (R – Rábcakapi, M – Mosonmagyaróvár, So – Sopronkövesd, SI – Sládkovičovo, L – Lehnice). Detaily vzorků jsou uvedeny v Tab. 6.

Při detailnějším porovnání vzorků špaldových mouk analyzovaných v roce 2011 je zřejmé, že hodnoty $TEAC_{DPPH}$ nejsou nijak výrazně ovlivňovány produkčním systémem, ani regionem původu. Naproti tomu, výrazně se zde uplatňuje vliv odrůdové skladby, přičemž odrůda Lajta byla charakterizována mírně vyššími průměrnými hodnotami $TEAC_{DPPH}$ než odrůda ÖKO-10 ($0.7 \pm 0.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$, resp. $0.6 \pm 0.3 \text{ mmol.kg}^{-1}$). Stejný trend, co se týče rozdílů mezi dvěma odrůdami, byl pozorován i v případě extraktů špaldových mouk roku 2012, přičemž tyto hodnoty $TEAC_{DPPH}$, jsou přibližně o 15 % nižší než u vzorků 2011. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny i mezi produkčními systémy a jednotlivými regiony.

6.2.2.3 ABTS^{•+}/DPPH radikál-zhášející aktivity špaldových mouk charakterizovaná pomocí EPR spektroskopie

Antioxidační a radikál-zhášející aktivita etanolových extraktů špaldových mouk testovaná pomocí EPR spektroskopie s využitím radikálů ABTS^{•+}, resp. DPPH byla stanovena identickým postupem jako v případě testovacích vzorků mouk. Sledoval se zánik signálu ABTS^{•+} v důsledku přidavku extraktu příslušné špaldové mouky do systému. Na Obr. 46 je znázorněn časový vývoj EPR spekter v systému obsahujícím roztok kation-radikálu ABTS^{•+} a 50% etanol (reference), resp. vzorek špaldové mouky připravené z odrůd ÖKO-10 (**a**) a Lajta (**b**), které byly vypěstovány v sezóně 2011/2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska, bez chemického ošetření (v schématu na Obr. 11 vzorky označené jako *kontrola*).



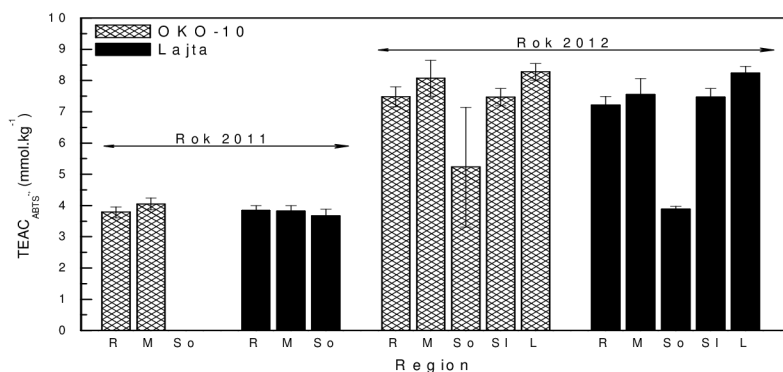
Obr. 46: Časový vývoj EPR spekter naměřený v systému obsahujícím 50% etanol (reference), resp. vzorek špaldové mouky připravené z odrůdy pšenice špaldy **a**) ÖKO-10, **b**) Lajta pěstované v letech 2011/2012 v různých regionech Slovenska a Maďarska v režimu ekologického (Rabcakapi, Sladkovičovo) a konvenčního (Sopronkövesd, Mosonmagyaróvár, Lehnice) zemědělství, v přítomnosti radikálu ABTS^{•+}.

Z průběhu EPR spekter je zřejmá velmi dobrá stabilita referenčního systému (50% etanol). Podle očekávání, obě odrůdy vykazují velmi dobré radikál-zhášející vlastnosti, když okamžitě

po přidání příslušného extraktu dochází k poklesu koncentrace ABTS^{*+} v závislosti na schopnosti extraktů terminovat uvedený kation-radikál. Z Obr. 46 vyplývá, že pokles intenzity je porovnatelný pro obě odrůdy. Nicméně odrůda ÖKO-10 z oblasti Lehnice vykazuje výraznější radikál-zhášející vlastnosti v porovnání s ostatními regiony, zatímco v případě odrůdy Lajta byl výraznější pokles intenzity zaznamenán pro vzorek pocházející z oblasti Sládkovičovo, což ukazuje na předpokládané rozdíly radikál-zhášejících vlastností v souvislosti s odlišnými produkčními systémy a regiony.

Hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$, resp. následný přepočítaný na tyto hodnoty byl realizován pro hodnoty koncentrace ABTS^{*+} v čase $t = 10.5$ min od jeho přidání od systému podle rovnice 24. Průměrné hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$ etanolových extraktů špaldových mouk připravených z různých odrůd pšenice špaldy, pěstovaných v různých regionech a za podmínek odlišných produkčních systémů jsou znázorněny na Obr. 47. V souladu s očekáváním, se potvrdil výrazný sezónní vliv na sledovaný parametr. Bez ohledu na ročník, průměrné hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$ slovenských mouk byly přibližně o 30 % vyšší ve srovnání s moukami maďarskými, s čímž jsou spojeny i zjištěné rozdíly mezi jednotlivými regiony. Průměrné hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$ pšenice špaldy vypěstované v různých regionech v sezónách 2010/2011 a 2011/2012 klesají v pořadí Lehnice > Sládkovičovo > Mosonmagyaróvár > Rábcakapi > Sopronkövesd. Bez ohledu na ročník, odrůdu nebo region, schopnost extraktů špaldových mouk terminovat tento kation-radikál není výrazně ovlivňována volbou produkčního systému (průměrné $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$ hodnoty ekologických a konvenčních mouk se pohybují na úrovni $6.1 \pm 1.8 \text{ mmol.kg}^{-1}$, resp. $5.8 \pm 2.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$), ani odrůdovým zastoupením.

Na základě komparace produkčních ročníků lze konstatovat, že hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$ stanovené pro vzorky špaldových mouk sezóny 2010/2011 jsou porovnatelné z hlediska odrůdového zastoupení a způsobu pěstování. Stejný trend byl pozorován i pro vzorky produkčního roku 2011/2012. Zatímco v roce 2011 je regionální vliv na $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$ hodnoty zanedbatelný, v roce 2012 je rozdíl mezi regiony ze statistického hlediska významný ($P = 0.0000$), především mezi slovenskými a maďarskými regiony.

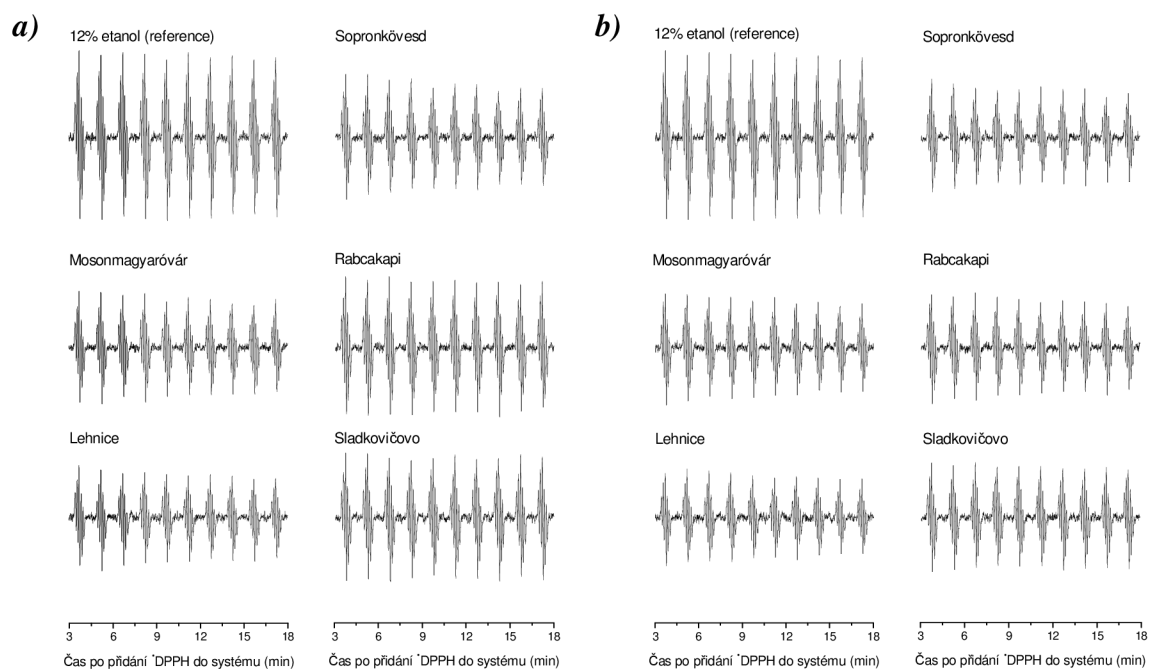


Obr. 47: Průměrné hodnoty $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{*+}}$ (mmol.kg^{-1}) etanolových extraktů špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta, sklizených v letech 2011 a 2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska (R – Rábcakapi, M – Mosonmagyaróvár, So – Sopronkövesd, SI – Sládkovičovo, L – Lehnice). Detaily vzorků jsou uvedeny v Tab. 6.

Radikál-zhášející aktivita etanolových extraktů špaldových mouk testovaná pomocí EPR spektroskopie s využitím radikálu $^{\bullet}\text{DPPH}$ byla stanovena identickým postupem jako v případě testovacích vzorků mouk, a ekologických a konvenčních vín. Sledoval se zánik signálu

\cdot DPPH v důsledku přidavku extraktu příslušné špaldové mouky do systému. Na Obr. 48 je znázorněn časový vývoj EPR spekter v systému, který obsahoval roztok tohoto radikálu a 50% etanol (reference), resp. vzorek špaldové mouky připravené z odrůd ÖKO-10 (a) a Lajta (b)), které byly vypěstovány v sezóně 2011/2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska bez aplikace chemického ošetření (v schématu na Obr. 11 vzorky označené jako kontrola).

Z Obr. 48 je zřejmé, že po přidání příslušného extraktu špaldové mouky do systému pozorujeme jen mírný pokles intenzity spektra, bez ohledu na odrůdu nebo region. Z porovnání radikál-zhášející aktivity odrůd ÖKO-10 a Lajta vyplývá, že pokles koncentrace \cdot DPPH je výraznější v případě vzorků mouk připravených z odrůdy Lajta, přičemž radikál-zhášející aktivita těchto vzorků je porovnatelná pro všechny regiony. Naproti tomu, vzorky připravené z odrůdy ÖKO-10 pěstované v režimu ekologického zemědělství (region Rabcakapi a Sladkovičovo) jsou charakterizovány nižší schopností terminovat radikál \cdot DPPH než vzorky získané konvenčními pěstitelskými postupy. V případě zbývajících systémů (způsobů) ošetření (schéma na Obr. 11) byl pro obě odrůdy pozorován podobný trend.



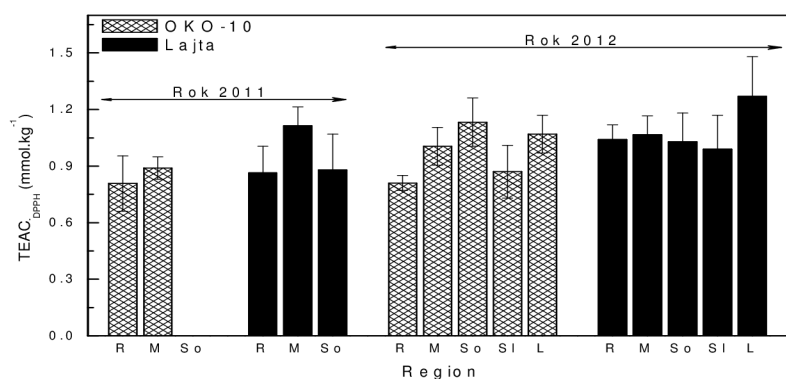
Obr. 48: Časový vývoj EPR spekter naměřený v systému obsahujícím 50% etanol (reference), resp. vzorek špaldové mouky připravené z odrůdy pšenice špaldy **a)** ÖKO-10, **b)** Lajta pěstované v letech 2011/2012 v různých regionech Slovenska a Maďarska v režimu ekologického (Rabcakapi, Sladkovičovo) a konvenčního (Sopronkövesd, Mosonmagyaróvár, Lehnice) zemědělství, v přítomnosti radikálu \cdot DPPH.

Průměrné hodnoty $TEAC_{\cdot DPPH}$ etanolových extraktů špaldových mouk jsou znázorněny na Obr. 49. I tímto postupem se jednoznačně potvrdila vyšší antioxidační kapacita vzorků sezóny 2011/2012, s hodnotami $TEAC$ na úrovni $1.0 \pm 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Zatímco v případě hodnot $TEAC_{ABTS \cdot +}$ byl vliv produkčního systému na uvedený parametr zanedbatelný, v tomto případě jsou rozdíly mezi ekologickými a konvenčními moukami statisticky významné ($P = 0.0000$), přičemž průměrné vyšší hodnoty byly zjištěny

u konvenčních vzorků. Kromě toho, průměrné hodnoty $TEAC_{DPPH}$ pšenice špaldy ze slovenských regionů Lehnice a Sládkovičovo byly přibližně o 10 % vyšší než u vzorků maďarských mouk. Co se týče porovnání regionálních rozdílů, radikál-zhášející kapacita klesá v pořadí Lehnice > Mosonmagyaróvár > Sopronkövesd > Sládkovičovo > Rábcakapi.

Stejně jako při $ABTS^{++}$, radikál-zhášející aktivita extraktů špaldových mouk analyzovaných v roce 2011 není prakticky ovlivňována produkčním systémem, ani odrůdovou skladbou, zatímco v případě vzorků sezóny 2011/2012 byla radikál-zhášející kapacita vyšší u vzorků špaldy pěstované v režimu konvenčního zemědělství. Rovněž se potvrdily vyšší hodnoty $TEAC_{DPPH}$ odrůdy Lajta v porovnání s odrůdou ÖKO-10.



Obr. 49: Průměrné hodnoty $TEAC_{DPPH}$ (mmol.kg⁻¹) etanolových extraktů špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta, sklizených v letech 2011 a 2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska (R – Rábcakapi, M – Mosonmagyaróvár, So – Sopronkövesd, SI – Sládkovičovo, L – Lehnice). Detaily vzorků jsou uvedeny v Tab. 6.

Hodnoty korelačních koeficientů potvrdily vysoké pozitivní korelace mezi hodnotami $TEAC_{(EPR)}$ a $TEAC_{(UV)}$, přičemž vyšší korelace byly zjištěny pro hodnoty $TEAC_{ABTS^{++}}$ ($R > 0.980$). Zatímco z hodnot vzájemných korelačních koeficientů je zřejmá velmi nízká korelace obsahu polyfenolů s hodnotami $TEAC$ pro oba radikály, celkový obsah flavonoidů velice dobře koreluje s hodnotami $TEAC_{ABTS^{++}}$ ($R > 0.815$).

Samotné rozdíly v hodnotách $TEAC_{ABTS^{++}}$ a $TEAC_{DPPH}$ mezi jednotlivými vzorky mohou být vedle odrůdových a regionálních vlivů ovlivněny odlišným způsobem ošetření pšenice špaldy během růstu, ale i růstovými podmínkami, např. množstvím srážek. Guo *et. al.* ve své studii potvrdily, že růstové podmínky (např. množství srážek, průměrná teplota) mohou významně ovlivnit celkový obsah polyfenolů, flavonoidů a tedy i celkovou antioxidační aktivitu pohanky [223]. V našem případě, byly oba roky (2010/2011, 2011/2012) charakteristické nedostatkem srážek. Na základě meteorologických údajů, které máme k dispozici, v oblasti Mosonmagyaróvár bylo v roce 2011 úhrnné množství srážek 446.3 mm a v roce 2012 do konce října 406.7 mm, přičemž 50-letý průměr je 594 mm. Velice podobný byl vývoj srážek i v slovenských produkčních oblastech. Mimoto, sezóna 2010=2011 byla charakteristická velkými výkyvy teplot, zejména v zimním období, a neobvykle nízkými teplotami kolem -20 °C, což do jisté míry mohlo ovlivnit kvalitu produkce.

Kromě výše uvedeného, ze vzájemných korelací není zřejmá přímá souvislost mezi antioxidační aktivitou a způsobem ošetření špaldy (rozdíly statisticky nevýznamné, $P > 0.7744$), což potvrdily i předchozí studie Langenkämpera *et. al.* a Konopky *et. al.*, zaměřené na posouzení vlivu ekologických a minerálních hnojiv na obsah polyfenolů

a antioxidační aktivitu pšenice seté [220, 221]. Opět platí, že tyto rozdíly mohou souviset i s obohacením půdy mikronutrienty (především Cu, Zn) [224].

6.2.2.4 Statistické zpracování dat

Za účelem zjištění specifických a statisticky významných markerů na identifikaci a rozlišení analyzovaných špaldových mouk byly, obdobně jako u vzorků vín, sledované deskriptory antioxidační aktivity podrobeny statistickému porovnání (metodou ANOVA) s cílem komplexně posoudit signifikantnost rozdílů v komparovaných moukách, přičemž se hodnotily rozdíly mezi sezónou, produkčními systémy, původem, odrůdami, ale i regionální rozdíly a rozdíly spojené s odlišným ošetřením vzorků během pěstování.

Tab. 13: Statisticky významné rozdíly antioxidačních charakteristik mezi vzorky špaldových mouk připravených z odrůd pšenice špaldy ÖKO-10 a Lajta sklizených v letech 2011 a 2012 v různých oblastech Maďarska a Slovenska.

Prvek	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost ($P < 0.05$)
Rok 2011 (1) vs. rok 2012 (2) (zahrnuje produkční systémy, odrůdy, regiony, systémy ošetření)				
TPC	2 - 1	455.8573	77.8291	0.0000
TFC	2 - 1	222.6711	15.8761	0.0000
%ABTS ⁺⁺	1 - 2	13.7697	1.3559	0.0000
%DPPH	1 - 2	4.1389	1.0336	0.0001
TEAC _{ABTS⁺⁺(UV)}	2 - 1	2.1252	0.1388	0.0000
TEAC _{DPPH(UV)}	2 - 1	0.0801	0.0165	0.0000
TEAC _{ABTS⁺⁺(EPR)}	2 - 1	3.3019	0.2047	0.0000
TEAC _{DPPH(EPR)}	2 - 1	0.1093	0.0289	0.0002
Slovenské (SK) vs. maďarské (HU) mouky (zahrnuje ročníky, produkční systémy, odrůdy, regiony, systémy ošetření)				
TPC	HU - SK	604.0067	80.5108	0.0000
%ABTS ⁺⁺	HU - SK	10.8155	1.7074	0.0000
%DPPH	HU - SK	4.6979	1.1256	0.0001
TEAC _{ABTS⁺⁺(UV)}	SK - HU	1.6773	0.1999	0.0000
TEAC _{DPPH(UV)}	HU - SK	0.0782	0.0183	0.0000
TEAC _{ABTS⁺⁺(EPR)}	SK - HU	2.6247	0.3005	0.0000
TEAC _{DPPH(EPR)}	SK - HU	0.0821	0.0324	0.0122
Biomouky (B) vs. konvenční (K) mouky (zahrnuje ročníky, odrůdy, regiony, systémy ošetření)				
TPC	K - B	304.1577	80.4290	0.0002
%ABTS ⁺⁺	K - B	7.5716	1.6003	0.0000
%DPPH	K - B	6.3619	0.9280	0.0000
TEAC _{DPPH(UV)}	K - B	0.0801	0.0161	0.0000
TEAC _{DPPH(EPR)}	K - B	0.1527	0.0268	0.0000
ÖKO-10 (O) vs. Lajta (L) (zahrnuje ročníky, produkční systémy, regiony, způsoby ošetření)				
%DPPH	L - O	4.7031	0.9695	0.0000
TEAC _{DPPH(UV)}	L - O	0.0720	0.0160	0.0000
TEAC _{DPPH(EPR)}	L - O	0.0934	0.0280	0.0011

Při porovnání produkčních roků 2011 vs. 2012 (Tab. 13) v němž byly zahrnuty oba produkční systémy, obě odrůdy, regiony i systémy ošetření, se zjistily statisticky významné rozdíly ve všech deskriptorech antioxidační aktivity. Kvantitativně vyšší hodnoty všech ukazatelů byly zjištěny ve vzorcích získaných v roce 2012, s výjimkou %ABTS⁺⁺ a %DPPH. Stejných výsledků bylo dosaženo i při porovnání mouk z hlediska jejich původu, kdy se zjistily signifikantní rozdíly v hodnotách TPC, %ABTS⁺⁺, %DPPH, TEAC_{DPPH(UV)}

vyšších u maďarských mouk, zatímco hodnoty $TEAC_{ABTS^{*+}}$ z UV/VIS a EPR měření a $TEAC_{DPPH(EPR)}$ byly vyšší ve slovenských vzorcích. V případě komparace bio- a konvenčních špaldových mouk se ukázaly významné rozdíly ve všech sledovaných parametrech, s výjimkou hodnotíc TFC a $TEAC_{ABTS^{*+}(UV/EPR)}$, přičemž kvantitativně vyšší hodnoty všech ukazovatelů se zjistily u mouk konvenčních.

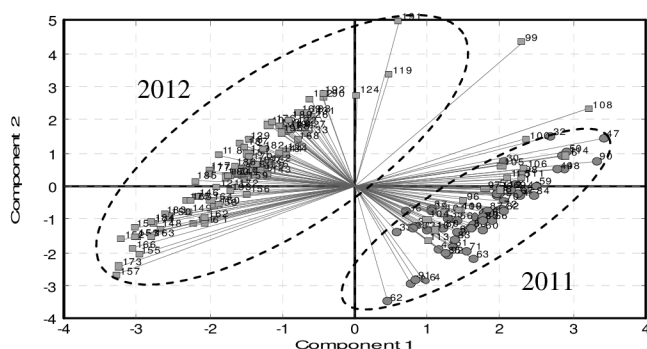
Při testování rozdílů mezi odrůdami ÖKO-10 a Lajta, které zahrnovalo oba ročníky, produkční systémy, původ/region i systémy ošetření, se ukázaly signifikantní rozdíly ve všech deskriptorech charakterizujících schopnost špaldových mouk terminovat radikál $\cdot DPPH$ a v obsahu polyfenolů (Tab. 13). Kvantitativně vyšší hodnoty těchto ukazovatelů se zjistily v moukách odrůdy Lajta, výjimkou byl obsah TPC vyšší v odrůdě ÖKO-10.

Podle očekávání, zjistily se statisticky významné rozdíly u všech deskriptorů antioxidační aktivity v závislosti na regionu původu, přičemž tyto rozdíly jsou ovlivňovány nejen rokem produkce, ale i odrůdovou skladbou a způsobem pěstování.

Co se týče porovnání různých systémů ošetření, zjištěné rozdíly lze ze statistického hlediska označit jako nevýznamné, přičemž se neprokázal výrazný vliv jak jarního ošetření pomocí Biokálu, tak i zbývajících způsobů ošetření (schéma na Obr. 11) na sledované parametry.

Přestože výsledky analýzy ANOVA poskytly různorodé informace, které je obtížné pro jejich rozsah a počet vzorků vzájemně porovnat a vyhodnotit, všechny experimentálních charakteristiky studovaných mouk byly zpracovány metodami vícerozměrné statistiky, metodou hlavních komponent a kanonickou diskriminační analýzou. Vzorky byly klasifikovány a diferencovány podle několika kritérií.

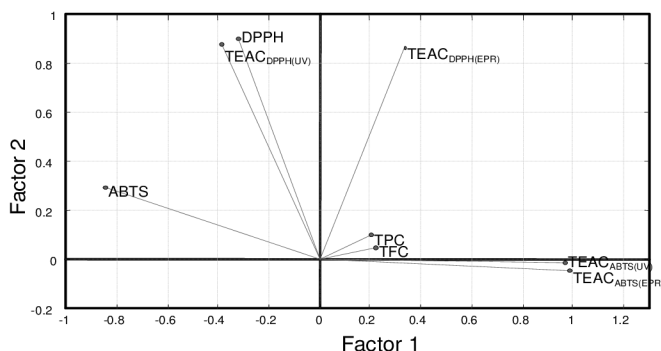
Výsledky PCA analýzy pro etanolové extrakty špaldových mouk podle roku produkce jsou znázorněny na Obr. 50. Graf hlavních komponent jasně vymezuje dva výrazné shluky vzorků špaldových mouk separovaných podle produkčního roku 2011 vs. 2012. Nicméně, vzorky se nepodařilo úplně klasifikovat, kdy vzorky roku 2012 příslušející k regionu Sopron byly částečně zařazeny mezi vzorky roku 2011.



Obr. 50: Klasifikace etanolových extraktů špaldových mouk podle roku produkce (2011 vs. 2012) pomocí analýzy hlavních komponent.

Z variační tabulky vyplývá, že první 3 hlavní komponenty popisují kumulativně 87 % celkové variability systému, přičemž tyto komponenty mají vlastní hodnoty (*eigenvalue*) > 1. Z hlediska váhy jednotlivých parametrů pro konstrukci komponent se jako nejvýznamnější ukázaly být v 1. komponentě hodnoty $\%ABTS^{*+}$, $TEAC_{ABTS^{*+}(UV)}$ a $TEAC_{ABTS^{*+}(EPR)}$, zatímco u druhé komponenty hodnoty $\%DPPH$ a $TEAC_{DPPH(EPR)}$, ve 3 komponentě pak hodnoty TFC. Obdobné výsledky byly dosaženy i při diskriminaci těchto extraktů podle způsobu pěstování, i druhové skladby. Faktorová analýza (Obr. 51) potvrdila, že – s ohledem na rozptyl vektorů –

všechny deskriptory antioxidační aktivity mají svou váhu při diskriminaci špaldových mouk podle zvoleného kritéria.



Obr. 51: Graf faktorů ilustrující význam jednotlivých deskriptorů pro diferenciaci vzorků špaldových mouk podle roku produkce (2011 vs. 2012).

Při diskriminaci vzorků špaldových mouk podle roku produkce (2011 vs. 2012) pomocí CDA se dosáhla 96.8% úspěšnost klasifikace vzorků do odpovídající skupiny, přičemž 5 vzorků špaldových mouk roku 2012 (odrůda Lajta pocházející z regionu Sopron) bylo zařazeno do skupiny vzorek příslušejících k produkčnímu roku 2011. Kanonická diskriminační analýza selektovala TPC, TEAC_{DPPH(EPR)} a %DPPH jako markery diskriminující špaldové mouky roku 2011 a 2012 s největší vahou.

V případě klasifikace vzorků podle krajiny původu nejvyšší diskriminační váhu mají deskriptory TEAC_{ABTS+DPPH} z EPR měření a TPC, přičemž úspěšnost diskriminace dosáhla 98.7 %, se dvěma nesprávně klasifikovanými maďarskými vzorky. Výsledky kanonické diskriminační analýzy špaldových mouk podle různých kritérií jsou uvedeny v Tab. 14.

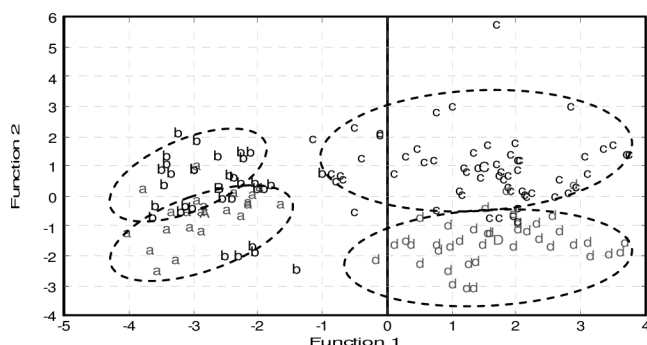
Tab. 14: Výsledky kanonické diskriminační analýzy vzorků špaldových mouk, resp. jejich extraktů v 50% etanole podle různých diskriminačních kritérií.

Parametr	Úspěšnost klasifikace (%)	Počet nesprávně klasifikovaných vzorků
Ročník (2011 vs. 2012)	96.8	5
Produkční systém (B vs. K)	83.9	23
Krajina původu (SK vs. HU)	98.7	2
Odrůda (O vs. L)	75.5	38
Region (M vs. S vs. R vs. Sl vs. L)	76.8	36
Ošetření	25.8	113
Produkční systém+ročník	83.2	26
Krajina původu + ročník	99.4	1
Odrůda + ročník	80.0	31
Region + ročník	85.8	22

Úspěšnost klasifikace vzorků špaldových mouk, resp. jejich extraktů v 50% etanole podle regionálního původu dosáhla 76.8 %, přičemž % správně klasifikovaných vzorků pro jednotlivé regiony klesá v pořadí Lehnice/Sládkovičovo (90 %) > Rabca (80 %) > Sopron (70 %) > Moson (65.1 %). Toto nižší procento správně klasifikovaných vzorků může souviset i s relativní blízkostí maďarských regionů. (vzdálenost Mosonmagyaróvár – Rabcakapi cca 30 km, Mosonmagyaróvár – Sopronkövesd cca 60 km).

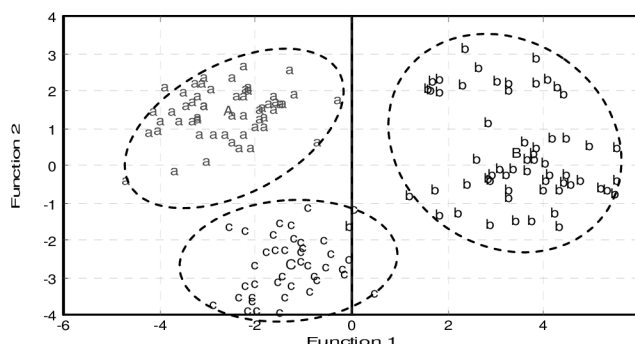
Co se týče klasifikace vzorků podle způsobu ošetření, diskriminační skóre dosáhlo pouze 25.8 % správně klasifikovaných vzorků, což v souladu s výsledky ANOVA analýzy potvrzuje, že různé způsoby ošetření pšenice špaldy výrazně neovlivňují její antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti.

Pokud je při diskriminaci vzorků podle produkčního systému, krajiny původu nebo odrůdové skladby brán do úvahy i ročník, ve většině případů se zvýší % správně klasifikovaných vzorků. Na Obr. 52 a Obr. 53 jsou znázorněny výsledky kanonické diskriminační analýzy etanolových extraktů mouk podle roku ve spojení se produkčním systémem, resp. krajinou původu. Z obrázků je zřejmé, že v případě diskriminace podle prve zmiňovaného kritéria se nepodařilo vzorky jednoznačně klasifikovat, nicméně z grafu jsou zřejmé 4 skupiny vzorků, v kterých jsou poměrně jasně diferencované vzorky ekologických a konvenčních mouk podle roku 2011, resp. 2012. V případě diferenciací mouk podle krajiny původu, při níž se zohledňoval i produkční rok, úspěšnost klasifikace dosáhla 99.4 %.



Obr. 52: Kanonická diskriminační analýza etanolových extraktů špaldových mouk **a**) podle produkčního systému (B vs. K) a roku produkce (a – 2011-B, b – 2011-K, c – 2012-B, d – 2012-K);

Obr. 53: Kanonická diskriminační analýza etanolových extraktů špaldových mouk podle krajiny původu (SK vs. HU) a roku produkce (a – 2011-HU, b – 2012-HU, c – 2012-SK).



Kombinace EPR a UV/VIS spektroskopie byla využita při studiu antioxidačních vlastností špaldových mouk, resp. jejich extraktů v 50% etanolu, s cílem posoudit vliv několika faktorů, včetně sezóny nebo odrůdové skladby na sledované parametry. V rámci realizovaných polních pokusů se také sledoval vliv regionálních rozdílů a odlišných režimů pěstování (ekologické vs. konvenční, různé způsoby ošetření pšenice špaldu).

Z prezentovaných výsledků je zřejmé, že antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti špaldových mouk byly výrazně ovlivňovány produkčními roky charakteristickými odlišnými environmentálními podmínkami (množství srážek, průměrná teplota, nadmořská výška). Toto je v souladu s publikovanými pracemi, které potvrzují, že environmentální faktory ovlivňují koncentraci polyfenolických látek, a tedy i celkovou antioxidační aktivitu v obilninách výrazněji než např. produkční systémy nebo odrůdové zastoupení [225-227]. V našem případě, jak už bylo uvedeno výše, mohou rozdíly mezi jednotlivými produkčními roky rovněž souviset i s dodatečnou aplikací komplexních přípravků obsahujících mikronutrienty Zn a Cu v roce 2012, jejichž přítomnost může zvýšit obsah některých sekundárních metabolitů [224]. Nicméně z jednoduchých korelací není zřejmá přímá souvislost mezi

obsahem polyfenolů a flavonoidů a zvýšeným obsahem Zn a Cu v analyzovaných špaldových moukách roku 2012.

Podle očekávání se sledované parametry mění i v závislosti na původu vzorků, přičemž na základě výsledků není zřejmý jednoznačný rozdíl mezi maďarskými a slovenskými moukami. Avšak ve většině případů byly maďarské vzorky charakterizovány nepatrně vyšší antioxidační aktivitou než vzorky slovenské. Tyto rozdíly mohou být spojeny jak s odlišnostmi mezi produkčními roky, tak i s vyšším počtem vzorků maďarských mouk, vzhledem k tomu, že slovenské vzorky se analyzovaly pouze v roce 2012, což může ovlivnit výsledné porovnání experimentálních dat. Na základě výsledků se ukázala i podobnost mezi regiony, a to jak maďarskými, tak i slovenskými, což může souviset s relativní blízkostí jednotlivých regionů (podobná nadmořská výška, porovnatelné množství srážek nebo průměrná teplota). Pokud se u některého monitorovaného parametru ukázaly výraznější rozdíly mezi jednotlivými regiony, tyto rozdíly byly většinou spjaty s odlišnými produkčními systémy.

Z výsledků měření dále vyplývá, že volba produkčního systému (ekologické vs. konvenční) rovněž ovlivňuje sledované parametry antioxidačních vlastností špaldových mouk, avšak tento vliv je výrazně nižší v porovnání se sezónním nebo regionálním vlivem. Z prezentovaných údajů není zřejmý jednoznačný trend mezi moukami připravenými z pšenice špaldy pěstované v režimu ekologického, resp. konvenčního zemědělství. Nicméně na základě analýzy ANOVA lze konstatovat, že mouky připravené ze špaldy pěstované v režimu konvenčního zemědělství vykazovaly mírně vyšší antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti než biomouky, přičemž tyto rozdíly se mění v závislosti na ročníku, odrůdové skladbě nebo původu. Sledované parametry se prakticky nemění ani v závislosti na odlišném způsobu ošetření pšenice špaldy. Bez ohledu na rok, odrůdu nebo původ, byly pro každý systém ošetření (schéma na Obr. 11) získány porovnatelné hodnoty jak celkových polyfenolů a flavonoidů, tak i antioxidační aktivity. Zanedbatelný vliv aplikovaných hnojiv na podpoření růstu pšenice špaldy v období vegetace potvrdily nejen výsledky analýzy ANOVA na signifikantnost rozdílů mezi jednotlivými systémy ošetření, ale i vícerozměrných statistických analýz s přibližně 25 % správně klasifikovaných vzorků podle tohoto kritéria.

Podobnost výsledků se ukázala i co se týče odrůdových rozdílů. Bez ohledu na produkční rok, obě odrůdy byly charakterizovány podobnými antioxidačními vlastnostmi. Nicméně, rozdíly mezi odrůdami se mění v závislosti na sledovaném parametru, ale i v souvislosti s rokem produkce, původem vzorky nebo volbou produkčního systému.

Na základě uvedených skutečností lze konstatovat, že sledované parametry antioxidační aktivity špaldových mouk jsou různou měrou ovlivňovány nejen environmentálními faktory (sezónní rozdíly), ale i původem, odrůdovou skladbou, volbou produkčního systému, ale i způsobem ošetření pšenice špaldy během vegetace, i když tento vliv se na základě získaných údajů jeví jako nevýznamný. I když výsledky jednotlivých spektroskopických analýz odhalily značnou variabilitu a často nejednoznačné rozdíly mezi jednotlivými skupinami vzorků mouk, zjištěné rozdíly jsou však dostačující pro úspěšnou diferenciaci a klasifikaci mouk podle zvolených kritérií s využitím metod vícerozměrné statistiky.

Navíc se ukazuje, že uvedené deskriptory antioxidačních vlastností jsou využitelné i na regionální diferenciaci vzorků špaldových mouk.

Výsledky dosažené v oblasti charakterizace různých aspektů špaldových mouk byly pokladem pro vznik několika rukopisů odborných článků zaslaných nebo připravených

k zaslání do zahraničních odborných časopisů. Dále jsou podkladem pro vznik několika odborných studií, abstraktů příspěvků na domácích a zahraničních konferencích, kde byli prezentováni buď ve formě odborných přednášek nebo posterů. Detaily jsou uvedeny v další části dizertační práce a většina z publikovaných výstupů související s projektem HUSK 0901-121-0010 také na webové stránce projektu, <http://www.husk-cbc.webnode.sk>.

6.3 Studium stability ovocných šťáv

Studium stability ovocných šťáv z hlediska jejich antioxidačních vlastností bylo realizováno jako součást komplexního výzkumu zaměřeného na posouzení vlivu změn ve výrobních postupech na vybrané fyzikálně-chemické parametry čerstvých ovocných šťáv, který je realizován v úzké spolupráci s jejich výrobcem (projekt McCarter (ITMS 26220220175) „Zlepšenie výživových a senzorických parametrov ovocných a zeleninových nápojov aplikáciou inertných plynov“) na pracovišti VÚP.

Ve spolupráci s firmou McCarter, a. s. se realizovaly dlouhodobé skladovací pokusy s ananasovými a pomerančovými šťávami, s cílem charakterizovat změny antioxidačních vlastností v průběhu skladování. Antioxidační a radikál-zhášející aktivita šťáv byla testována metodou EPR s využitím radikálů ABTS^{•+} a TEMPOL. Metodou UV/VIS spektroskopie byl stanoven celkový obsah polyfenolů. Výsledky byly vyjádřeny identickým postupem jako v předchozích částech. V rámci řešeného projektu se stabilita uvedených šťáv posuzovala i z hlediska barevných změn (barevné souřadnice v systému CIE L*a*b), koncentrace kyseliny askorbové a HMF, v pomerančových šťávách byl navíc stanovován i obsah hesperidinu, nejvýznamnějšího flavonoidu vyskytujícího se v citrusových šťávách.

6.3.1 Vliv teploty a světelných podmínek na vybrané parametry ovocných šťáv

Prvotní experimenty s ovocnými šťávami byly zaměřeny na posouzení vlivu různých skladovacích teplot (20 °C, 7 °C a 2 °C) a světelných podmínek (světlo/tma) na výše uvedené parametry. Jak u pomerančových šťáv s dužinou, tak i ananasových šťáv s kousky ananasu bylo prokázáno, že obsah polyfenolů a celková antioxidační aktivita se mění v závislosti na teplotních a světelných podmínkách, přičemž je třeba vzít v úvahu i vznik nízkomolekulárních látek vznikajících rozkladem složek šťáv v důsledku skladování, které mohou ovlivňovat selektivitu F-C činidla. Při objektivním posuzování je třeba zohlednit i heterogenitu vzorky, ale i přítomnost některých stopových prvků.

Co se týče dalších sledovaných parametrů, rovněž koncentrace kyseliny askorbové nebo celkové barevné změny se v průběhu skladování mění v závislosti na teplotě, ale i světelných podmínkách. Podle očekávání, k nejvýraznějšímu zhoršení sledovaných parametrů došlo u šťáv skladovaných při světelných podmínkách simulujících denní světlo a při teplotě 20 °C, zatímco rozdíly mezi teplotami skladování 7 °C a 2 °C lze považovat za nevýznamné.

Parciální výsledky pro ananasovou šťávu byly publikovány v časopise *Journal of Food and Nutrition Research* pod názvem *Effect of light conditions on physico-chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces during storage* (viz Příloha 1). Nicméně následující části jsou zaměřeny především na posouzení vlivu změn technologických postupů výroby ananasových a pomerančových šťáv z hlediska jejich antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností.

6.3.2 Vliv modifikovaných výrobních podmínek na vybrané parametry ovocných šťáv

Analyzované šťávy byly připraveny dvěma odlišnými technologiemi. V prvním případě byly vzorky připraveny klasickým výrobním postupem firmy McCarter, a po šetrné pasterizaci a aseptickém plnění, byly láhve uzavřeny klasickým šroubovým uzávěrem (SK38/16; BeriCap, Budenheim, Německo), v dalších částech označena jako *stará (klasická) technologie*. V druhém případě byla ve vybraných fázích výroby (skladovací a míchací tank) aplikována dusíková atmosféra, a láhve byly opatřeny šroubovým uzávěrem na bázi zhášeců

kyslíku (SK38/16-O₂S; BeriCap, Budenheim, Německo), označena jako *nová technologie*. Vybrané parametry byly monitorovány od začátku výroby, tj. včetně vstupní suroviny před pasterizací (100% šťávy z čerstvě lisovaného ovoce, vždy označena jako „0“), následně pak, po obohacení šťávy dužinou (pomerančová šťáva), resp. kousky ovoce (ananasová šťáva) a šetrné pasterizaci, v příslušných časových intervalech. Změny vlastností vzorků ananasové, resp. pomerančové šťávy, popsáné níže, jsou vždy vztahovány na vlastnosti finálního produktu po pasterizaci.

Pozorované změny jednotlivých parametrů v analyzovaných šťávách v průběhu skladování byly popsány kinetickou rovnicí prvního řádu, která na základě vykonané analýzy nejlépe vystihuje dané trendy. Formální rychlostní konstanty byly vypočítány podle rovnice 25, výsledky byly z praktických důvodů vyjádřeny jako reciproký den (den⁻¹).

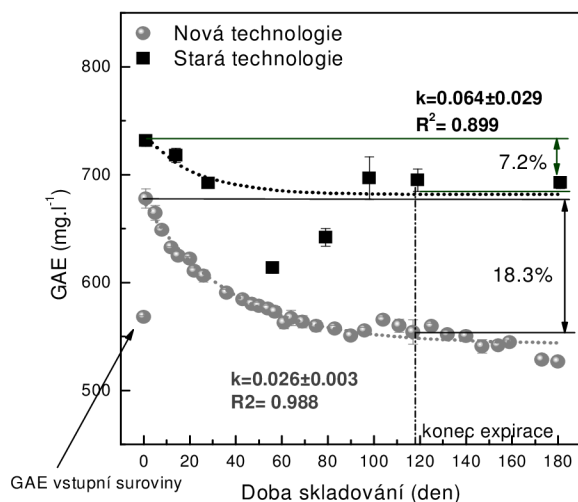
6.3.2.1 Stabilita 100% šťávy z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu

100% šťávy z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu byly analyzovány po dobu 26 týdnů pro oba typy výroby. Deklarovaná doba trvanlivosti je 18 týdnů (resp. 119 dní), přičemž podle požadavků výrobce se vybrané parametry monitorovaly i v následujících 2 měsících po jejím skončení. Výroba obou typů šťáv probíhala s odstupem cca 10 měsíců, vzhledem k tomu, že nová technologie se zaváděla do výroby postupně v průběhu roku 2012. Výsledky získané pro ananasové šťávy při jejichž výrobě byla použita kombinace dusíkové atmosféry a aktivních obalových materiálů jsou porovnávány s výsledky získanými pro ananasovou šťávu z prvotních experimentů, tj. vyrobenou klasickou technologií, která byla skladována ve tmě při 7 °C, neboť výrobce nebyl schopen dodat paralelně ananasovou šťávu vyrobenou klasickou i novou technologií, tak aby se pokrylo celé monitorovací období 26 týdnů. Při měření se vždy analyzovaly vzorky dvou PET láhví ananasové šťávy, aby se posoudil i případný vliv ananasových kousků přidávaných ke šťávě před pasterizací.

Celkový obsah polyfenolů

Změny v obsahu polyfenolů v analyzovaných ananasových šťávách v závislosti na odlišných výrobních postupech jsou zobrazeny na Obr. 54. Vzhledem k tomu, že u první série ananasových šťáv (stará technologie) byly experimenty zaměřeny především na posouzení změn sledovaných parametrů v závislosti na různých teplotních a světelných podmínkách, a výrobcem dodané vzorky šťáv byly analyzovány až po pasterizaci, nebylo možné posoudit vliv pasterizace samotné, stejně tak ani přídatku ananasových kousků ke šťávě, na obsah polyfenolů oproti vstupní surovině. Z Obr. 54 je zřejmé, že v následujících dnech po pasterizaci dochází u obou typů šťáv k postupnému poklesu obsahu polyfenolů, přičemž u klasicky vyrobených šťáv je po 8 týdnech skladování dosaženo minimální koncentrace TPC (613 mg.l⁻¹), a následně dochází k jejich opětovnému nárůstu. Tyto výrazné rozdíly lze vysvětlit tím, že v důsledku skladování dochází k rozkladu šťávy za vzniku nízkomolekulárních polyfenolických látek, které mohou reagovat nebo naopak nereagovat s Folin-Ciocalteuovým činidlem, které není specifické, a tím mohou významně ovlivnit stanovení celkových polyfenolů. Rovněž je třeba vzít v úvahu reaktivitu složek F-C činidla, která je negativně ovlivňována přítomností tiolů, redukujících cukrů nebo vitamínu C [228, 229]. Z výsledků naměřených pro vzorky vyrobené starou technologií a na základě analýzy ANOVA vyplývá, že jak na konci expirační doby, tak v následujících 2 měsících po jejím skončení byl pozorován statisticky významný pokles TPC (P = 0.0187, resp. P = 0.0118) oproti pasterizovanému vzorku (1. den). Pro pozorovaný, v průběhu skladování měnící se

obsah polyfenolů, byla vypočítána rychlostní konstanta $k_{TPC} = 0.064 \pm 0.029 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.899$). Nicméně v tomto případě je objektivní kinetické zhodnocení změn polyfenolů limitováno nejen množstvím naměřených dat, ale především poměrně velkou variabilitou naměřených hodnot, do jisté míry související s heterogenitou analyzovaných vzorků.



Obr. 54: Změny celkového obsahu polyfenolů v 100% šťávách z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu, které byly vyrobeny za použití staré a nové technologie v průběhu 26 týdnů skladování v chladničce při 7 °C. Přerušovanou čarou jsou znázorněny matematicky vypočítané závislosti podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu.

Zatímco u klasicky vyrobených šťáv nebylo možné posoudit vliv přidavku ananasových kousků na obsah polyfenolů, u druhého typu šťáv, při jejichž výrobě byla využita kombinace dusíkové atmosféry a uzávěrů na bázi zhášečů kyslíku, je zřejmý nárůst TPC u vzorku po pasterizaci o cca 13 % v porovnání se vstupní surovinou. Zde se pravděpodobně jedná o výsledek extrakce aktivních složek z ananasových kousků do roztoku šťávy. Na základě toho lze předpokládat, že přídavek a také množství ovocných kousků může mít pozitivní vliv nejen na obsah polyfenolů, ale i celkovou antioxidační aktivitu. Minimální koncentrace (526 mg.l^{-1}) bylo dosaženo na konci monitorovacího období, tedy po 26 týdnech skladování, což představuje přibližně 22% pokles v porovnání s vzorkem po pasterizaci (1. den). Přestože je v tomto případě celkový pokles koncentrace polyfenolů výraznější, na základě hodnoty rychlostní konstanty $k_{TPC} = 0.026 \pm 0.003 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.988$) lze konstatovat, že tento pokles je pomalejší (rovnoměrnější) v porovnání s klasicky vyrobenou ananasovou šťávou, což je zřejmé i z průběhu křivek zobrazených na Obr. 54. Na základě výsledků, resp. poměrně nízkého rozptylu naměřených hodnot, je možné lépe predikovat změny TPC ve vzorcích šťáv vyrobených pomocí nové technologie, ke kterým dochází v průběhu skladování. Nicméně, při objektivním posuzování odlišných technologických postupů je třeba zohlednit i koncentrační rozdíly mezi vzorky obou typů ananasových šťáv, které představují jakýsi handicap nejen kinetického porovnání, vzhledem k tomu, že rychlost reakce přímo závisí na koncentraci vzorku. S ohledem na faktory, které výrobce nedokázal ovlivnit, jako je identická kvalita vstupní suroviny (s ohledem na časový odstup a různý původ vzorků v staré a nové technologii) je prakticky nemožné, v absolutním měřítku, hodnotit jakýmkoliv způsobem vliv zavedené nové technologie na sledovaný parametr.

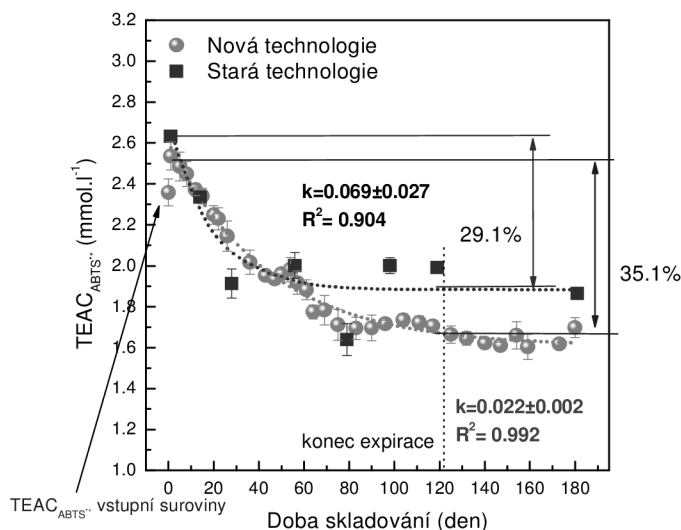
ABTS^{•+} radikál-zhášečící aktivita

Změny ABTS^{•+} radikál-zhášečící aktivity ananasových šťáv s kousky ananasu vyjádřené jako hodnoty TEAC_{ABTS^{•+}} jsou znázorněny na Obr. 55. U obou typů ananasových šťáv dochází v průběhu skladování k postupnému poklesu antioxidační aktivity. Byl pozorován podobný trend jako v případě stanovení celkového obsahu polyfenolů, především u šťáv

vyrobených novou technologií, což potvrzují i vyšší hodnoty korelačních koeficientů mezi TPC a $TEAC_{ABTS^{*+}}$ pro novou technologii ($R = 0.875$) v porovnání s klasickou technologií ($R = 0.668$).

Opět, z důvodů uvedených výše, nebylo možné posoudit vliv přidání kousků ananasu a následné pasterizace na $ABTS^{*+}$ radikál-zhášející aktivitu klasicky vyrobených ananasových šťáv.

Z prezentovaných údajů je zřejmé, že u šťáv vyrobených pomocí staré technologie došlo v 11 týdnů skladování k nejvýraznějšímu, přibližně 38% poklesu $TEAC_{ABTS^{*+}}$ v porovnání s pasterizovaným vzorkem (1. den). U tohoto typu šťáv následně došlo k postupnému nárůstu antioxidační aktivity, výsledky popisují podobné trendy jako v případě stanovení TPC. Na základě samotného průběhu křivky se dá usuzovat, že rychlost poklesu antioxidační aktivity klasicky vyrobených šťáv bude porovnatelná s rychlostí poklesu obsahu polyfenolů u tohoto typu šťáv. Což se i následně potvrdilo, neboť hodnota rychlostní konstanty charakterizující pozorované změny antioxidační aktivity dosáhla hodnoty $k_{ABTS^{*+}} = 0.069 \pm 0.027 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.904$), kde velkou měrou přispívá cca 29% pokles $TEAC_{ABTS^{*+}}$ během prvních 4 týdnů skladování. Nižší hodnota koeficientu determinace je především výsledkem značného rozptylu naměřených hodnot, který se navzdory opakování měření nepodařilo eliminovat.



Obr. 55: Změny $TEAC_{ABTS^{*+}}$ hodnot 100% šťáv z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu, které byly vyrobeny za použití staré a nové technologie v průběhu 26 týdnů skladování v chladničce při 7 °C. Přerušovanou čarou jsou znázorněny matematicky vypočítané závislosti podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu.

V souladu s výsledky stanovení TPC, u šťáv při jejichž výrobě byla využita kombinace dusíkové atmosféry a uzávěrů obsahujících zhášecí kyslíku, vedl přídavek ananasových kousků k přibližně 8% zvýšení antioxidační aktivity oproti vstupní surovině, což opět potvrzuje očekávané zlepšení antioxidačních vlastností ananasových šťáv v důsledku předpokládané extrakce aktivních složek z ovocných kousků do šťávy. U tohoto typu ananasových šťáv poklesla antioxidační aktivita na konci expirační doby o cca 35 % v porovnání s pasterizovaným vzorkem (1. den), přičemž změny $TEAC_{ABTS^{*+}}$ v průběhu skladování jsou rovnoměrnější v porovnání s klasickou technologií. Během následujících 2 měsíců po skončení deklarované doby trvanlivosti byly pozorované jen statisticky nevýznamné změny tohoto parametru. Přestože byl na konci monitorovacího období pozorován výraznější pokles $TEAC_{ABTS^{*+}}$ u ananasových šťáv vyrobených pomocí nové technologie, změny antioxidační aktivity v těchto šťávách byly charakterizovány přibližně 3 krát nižší hodnotou rychlostní konstanty $k_{ABTS^{*+}} = 0.022 \pm 0.002 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.992$) v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami. Nicméně znovu je třeba vzít v úvahu

koncentrační rozdíly (a další faktory ovlivňující kvalitu vstupní suroviny uvedené výše) mezi vzorky ananasových šťáv, a s tím spojené problémy objektivního hodnocení uvedených kinetických modelů.

Co se týče pozorovaného snížení antioxidační aktivity, zejména nejednoznačný trend u šťáv vyrobených klasickou technologií, ale i mírné fluktuace $TEAC_{ABTS^{*+}}$ u nové technologie, tyto rozdíly mohou souviset s obsahem ananasových kousků, vzhledem k tomu, že kousky ananasu jsou k šťávě přidávány před pasterizací a při plnění není možné zaručit, že v každém balení šťávy bude stejné množství kousků. Z námi vykonané analýzy tuhého podílu v reálných vzorcích ovocných šťáv po vysušení vyplývá, že rozdíly mezi jednotlivými PET láhvemi se pohybují v rozmezí 15–60 %.

Antioxidační aktivita může být rovněž ovlivňována přítomností některých stopových prvků, např. Mn, Fe nebo Cu, které se buď přirozeně vyskytují v ovoci, nebo se dostávají do šťávy během zpracování ovoce (řezání, lisování), a které hrají roli v některých pro-oxidačních procesech jako Haber-Weissova nebo Fentonova reakce, čímž mohou ovlivňovat celkovou stabilitu šťáv [230, 231]. V Tab. 15 je uveden průměrný obsah vybraných prvků v analyzovaných ananasových šťávách stanovených metodou AAS a ICP/MS. Z výsledků je zřejmé, že zastoupení jednotlivých prvků se mění i v závislosti zda se jedná o čistou ananasovou šťávu nebo šťávu s kousky ananasu. Uvedené výsledky jsou však pouze screeningové, založené na (opakované) analýze 1 láhve vzorků čisté šťávy a šťávy s kousky ovoce. Při posuzování antioxidační aktivity ovocných šťáv je třeba vzít v úvahu i možné interakce složek ovocných šťáv a obalovými materiály [232, 233]. Další fenomén, který vyplývá ze získaných výsledků, a pro který (mimo získanou reprezentativnost hodnot) v současnosti nemáme uspokojivé vysvětlení, je nižší obsah většiny sledovaných kovů ve vzorcích s kousky ovoce v porovnání s těmi bez kousků.

Tab. 15: Průměrný obsah vybraných prvků v ananasových šťávách s kousky ananasu [$mg \cdot kg^{-1}$].

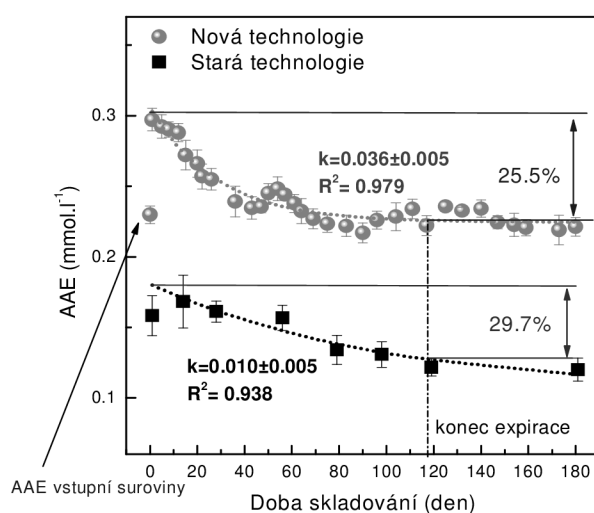
ID	Fe	Ni	Zn	Mn	Cu	Cd	Cr	Mo	Pb
Ananasová šťáva s kousky ananasu	1.220	0.063	2.580	8.240	0.037	$7 \cdot 10^{-4}$	0.016	0.005	0.030
Ananasová šťáva bez kousků ananasu	1.460	0.081	2.980	7.380	0.041	$8 \cdot 10^{-4}$	0.014	0.003	0.036

Radikál-zhášející aktivita oproti radikálu TEMPOL

Schopnost ananasových šťáv terminovat radikál TEMPOL byla vyjádřena jako hodnoty AAE. Přepočet koncentrace TEMPOL (dvojitý integrál EPR spektra v čase 10.5 min po jeho přidání do systému) byl realizován pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardních roztoků kyseliny askorbové v koncentračním rozmezí $0-1.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Změny hodnot AAE, které vyjadřují schopnost šťáv terminovat radikál TEMPOL, jsou znázorněny na Obr. 56. Z prezentovaných údajů je zřejmý jednoznačný rozdíl hodnot AAE obou typů ananasových šťáv, přičemž tyto rozdíly mohou do velké míry souviset jak s koncentračními rozdíly čistých ananasových šťáv (vstupní suroviny), tak i s jejich odlišnou kvalitou, vzhledem k výše uvedeným důvodům.

Jak bylo uvedeno výše, ani v tomto případě nebylo možné posoudit vliv přidání ovocných kousků a pasterizace na schopnost klasicky vyrobených šťáv terminovat radikál TEMPOL. Z výsledků měření vykonaných se vzorky připravenými starou technologií vyplývá, že během prvních 8 týdnů skladování se mění hodnoty AAE jen nevýznamně. K výraznějšímu poklesu dochází až v 11 týdnu skladování, nicméně ani v tomto případě se nejedná o statisticky významný pokles ve srovnání s pasterizovaným vzorkem (1. den skladování, $P = 0.3024$).

Během deklarovaných 18 týdnů doby trvanlivosti, došlo k přibližně 30% poklesu hodnot AAE, přičemž během následujících 2 měsíců po jejím skončení se hodnoty AAE prakticky nezměnily. Nicméně objektivní zhodnocení je limitováno omezeným počtem experimentálních údajů. Rovněž zde není patrná výrazná variabilita dat v porovnání s předchozími testy, což potvrzuje i vyšší hodnota koeficientu determinace zvoleného kinetického modelu popisujícího celkové změny hodnot AAE v průběhu 26 týdnů skladování, které byly charakterizovány rychlostní konstantou $k_{TEMPOL} = 0.010 \pm 0.005 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.938$). U šťáv při jejichž výrobě byla využita kombinace dusíkové atmosféry a aktivních obalových materiálů došlo po přidání kousků a následné pasterizaci k očekávanému, přibližně 23% nárůstu hodnot AAE. Toto je pravděpodobně výsledek extrakce kyseliny askorbové a dalších ovocných kyselin nebo látek s podobným redoxním potenciálem z ananasových kousků do ovocné šťávy, vzhledem k tomu, že podle dostupných literárních zdrojů je průměrná koncentrace kyseliny askorbové v dužině ananasu (0.15 mg.g^{-1} čerstvého ovoce) vyšší než v ananasové šťávě (0.11 mg.g^{-1} čerstvého ovoce) [234].



Obr. 56: Změny AAE hodnot 100% šťáv z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu, které byly vyrobeny za použití staré a nové technologie v průběhu 26 týdnů skladování v chladničce při 7 °C. Přerušovanou čárou jsou znázorněny matematicky vypočítané závislosti podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu.

Ve dnech následujících po pasterizaci dochází k postupnému poklesu AAE, který je nejvýraznější v prvních 2 měsících skladování. Během zbývajících 4 měsíců monitorovaného období dochází pouze k nepatrným změnám AAE, které jsou po zohlednění chyby měření, nevýznamné. Celkový pokles AAE na konci expirační doby představuje u tohoto typu šťáv cca 26 % v porovnání s pasterizovaným vzorkem, který byl analyzován v 1. dni skladování. Pokles schopnosti šťáv terminovat radikál TEMPOL je v tomto případě přibližně 3krát rychlejší v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami. Rychlostní konstanta charakterizující pozorované změny AAE dosáhla hodnoty $k_{TEMPOL} = 0.036 \pm 0.005 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.979$), z čehož vyplývá, že u takto připravených šťáv dochází pravděpodobně k rychlejší degradaci kyseliny askorbové, a tím i rychlejšímu poklesu hodnot AAE v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami. Pozorované rozdíly mezi oběma typy šťáv mohou také souviset s existencí dynamických procesů ve šťávách vedoucí k tvorbě/eliminaci sloučenin s anti- a/nebo prooxidačními vlastnostmi. Nicméně opět platí, že objektivní porovnání kinetických modelů je limitováno koncentračními a kvalitativními rozdíly analyzovaných vzorků, v případě klasicky vyrobených šťáv i nižším počtem experimentálních dat. Při posuzování výsledků je třeba rovněž zohlednit, stejně jako v případě ABTS testu, heterogenitu vzorků, stejně tak i kvalitu vstupní suroviny a ananasových kousků, popřípadě i možné interakce složek ovocných šťáv s obalovými materiály.

Tab. 16: Korelační matice experimentálních charakteristik 100% šťáv z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu.

Stará technologie			Nová technologie				
	TPC	TEAC _{ABTS+}	AAE		TPC	TEAC _{ABTS+}	AAE
TPC	1.000			TPC	1.000		
TEAC _{ABTS+}	0.668	1.000		TEAC _{ABTS+}	0.875	1.000	
AAE	0.177	0.589	1.000	AAE	0.977	0.823	1.000

Z tabulky vzájemných korelací (Tab. 16) jsou zřejmé silné korelace jak s hodnotami TPC, tak i TEAC_{ABTS+} především u šťáv vyrobených novou technologií., zatímco u klasicky vyrobených šťáv byly potvrzeny nízké, resp. průměrné korelace AAE s TPC a TEAC_{ABTS+}, podobně jako tomu bylo u analýzy biovín a konvenčních vín. Na tomto se pravděpodobně ukazuje výrazný vliv odlišných technologických postupů výroby ananasových šťáv na stabilitu jejich antioxidačních vlastností v průběhu skladování, do jisté míry však jsou tyto výsledky ovlivněny i variabilitou (rozptylem) naměřených hodnot.

Celkové zhodnocení 100% šťáv z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu

Z prezentovaných údajů je zřejmé, že sledované parametry antioxidační aktivity 100% šťáv z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu jsou ovlivňovány několika faktory. V první řadě je třeba vzít v úvahu kvalitu vstupních surovin (čistá ananasová šťáva, kousky ananasu), která se může odlišovat v závislosti na původu ovoce, jeho odrůdě, stupni zralosti a případném mechanickém poškození (i když takovéto ovoce by nemělo být při výrobě vůbec zpracováno). Dalším významným faktorem, který může ovlivňovat sledované vlastnosti je heterogenita vzorky, tzn. především obsah kousků přidávaného ovoce. Získané údaje potvrdily, že během plnění není možné zaručit, že v každém balení šťávy bude stejný obsah ananasových kousků, z čehož pak mohou vyplývat výše zmiňované rozdíly mezi sledovanými parametry v průběhu jednotlivých týdnů skladování. Při posuzování antioxidačních vlastností je třeba rovněž zohlednit i přítomnost některých stopových prvků (Fe, Mn, Cu), které se přirozeně se vyskytují v ovoci nebo se dostávají do šťávy během zpracování ovoce (řezání, lisování), a které hrají roli v některých pro-oxidačních procesech.

Na základě výsledků měření lze rovněž předpokládat vliv odlišných technologických postupů výroby na sledované parametry. Z předchozích, ale i v současnosti probíhajících experimentů se potvrdil pozitivní vliv přídavku ovocných kousků ke šťávě, což ve většině případů vedlo k nárůstu celkové antioxidační aktivity ovocných šťáv. Co se týče samotného porovnání klasické výroby ananasových šťáv a výroby, při které byla aplikována kombinace dusíkové atmosféry (skladovací a míchací tank) a aktivních obalových materiálů na bázi zhášeců kyslíku (Tab. 17), ve většině případů byl celkový pokles sledovaných parametrů (Δc) na konci expirační doby (18 týdnů) výraznější u šťáv vyrobených pomocí nové technologie. Avšak vypočítané kinetické parametry charakterizující rychlost poklesu jejich antioxidačních vlastností v průběhu skladování byly ve většině případů nižší v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami, tzn. že by mělo docházet k pozvolnějšímu (rovnoměrnějšímu) poklesu testovaných parametrů antioxidační aktivity ananasových šťáv. Avšak, hodnocení sledovaných změn antioxidační aktivity ananasových šťáv je u klasické technologie, s ohledem na značný rozptyl experimentálních dat, který se i navzdory opakování měření nepodařilo eliminovat, problematické. Jak už bylo několikrát zmíněno, pozorované změny jsou především výsledkem koncentračních rozdílů mezi vzorky, které je musí být vzaty v úvahu při objektivním zhodnocení odlišných technologických postupů. Toto platí i v případě ověření signifikantnosti rozdílů mezi monitorovanými parametry antioxidační aktivity.

Tab. 17: Hodnoty rychlostních konstant charakterizující změny vybraných parametrů ananasových šťáv vypočítaných podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu, spolu s celkovými změnami vybraných parametrů (Δc) antioxidantní aktivity ananasových šťáv na konci expirační doby.

Parametr/Technologie	k (den^{-1})		R^2		Δc (%)	
	Stará	Nová	Stará	Nová	Stará	Nová
TPC	0.064±0.029	0.027±0.003	0.899	0.988	7.2	18.3
TEAC _{ABTS+}	0.069±0.027	0.022±0.002	0.904	0.983	29.1	35.1
AAE	0.010±0.005	0.036±0.005	0.938	0.979	29.7	25.5

Významnost rozdílů mezi jednotlivými parametry antioxidantní aktivity v závislosti na odlišných technologických postupech byla ověřena metodou ANOVA – testem shody regresních přímk, který ověřuje signifikantnost rozdílů regresních konstant, které přímo vyjadřují rozdíly mezi hodnotami TPC, TEAC_{ABTS+} a AAE jednotlivých technologických postupů výroby ananasových šťáv. Z údajů prezentovaných v Tab. 18 je zřejmé, že v případě TPC i AAE byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi klasickou a novou technologií výroby, zatímco v případě TEAC_{ABTS+} se tyto rozdíly ukázaly jako statisticky nevýznamné.

Tab. 18: Statisticky významné rozdíly antioxidantních charakteristik ananasových šťáv v závislosti na odlišných technologiích výroby ($P < 0.05$ statisticky významný rozdíl).

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost ($P < 0.05$)
TPC	Stará t. – Nová t.	103.8135	6.5609	0.0000
TEAC _{ABTS+}	Stará t. – Nová t.	0.0400	0.0487	0.5641
AAE	Nová t. – Stará t.	0.0998	0.0038	0.0000

Na základě těchto výsledků nelze tedy jednoznačně potvrdit, ani vyvrátit, že šťávy vyrobené novou technologií jsou stabilnější, pokud jde o jejich antioxidantní vlastnosti v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami, tj. že jsou tyto vlastnosti lepší. Nicméně, podle průběhu změn jednotlivých parametrů antioxidantní aktivity ananasových šťáv u nové technologie lze lépe predikovat změny jejich antioxidantních vlastností, ke kterým dochází v průběhu skladování. Přestože v průběhu skladování dochází u obou typů šťáv k oxidačním reakcím, v obou případech si ananasové šťávy zachovávají více jak $\frac{3}{4}$ původních antioxidantních vlastností, a to i v období 2 měsíců po skončení expirační doby.

Sledované změny antioxidantních vlastností jsou v dobrém souladu s výsledky stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC, kdy opět nelze potvrdit, že pokles její koncentrace v průběhu skladování je výraznější u klasicky vyrobených šťáv. Stejně tak se nemění ani koncentrace hydroxymetylfurfuralu (HMF), který byl sledován jako parametr „potravinové bezpečnosti“. Rozdíly mezi jednotlivými týdny skladování lze považovat, po zohlednění chyby měření, za nevýznamné, bez ohledu na typ použité technologie. Předpokládaný pozitivní vliv kombinace dusíkové atmosféry a aktivních obalových materiálů se ukázal v případě hodnocení celkových barevných změn. Nicméně i v tomto případě je třeba zohlednit výše uvedené faktory, které ovlivňují antioxidantní vlastnosti ananasových šťáv.

6.3.2.2 Stabilita 100% šťávy z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou

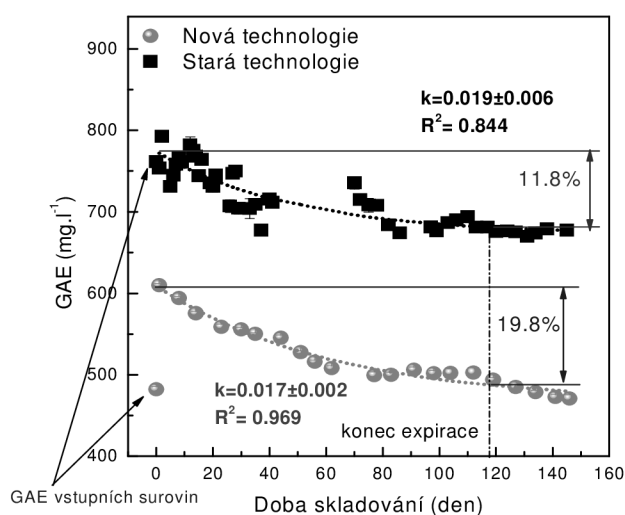
100% šťávy z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou vyrobené za použití staré a nové technologie byly analyzovány v průběhu 22 týdnů skladování. Deklarovaná doba trvanlivosti pomerančové šťávy je 18 týdnů (resp. 119 dní). Změny stability se tedy posuzovaly nejen po

celou dobu expirace, ale i po dobu cca 1 měsíce po jejím skončení, v závislosti na požadavcích výrobce.

Zatímco u klasicky vyrobených ananasových šťáv nebylo možné posoudit vliv přídavku ovocných kousků ke vstupní surovině, tento problém byl u pomerančových šťáv eliminován. Při měření se vždy analyzovaly dvě PET láhve pomerančové šťávy.

Celkový obsah polyfenolů

Změny v obsahu polyfenolů v analyzovaných šťávách v závislosti na odlišných výrobních postupech jsou zobrazeny na Obr. 57. Z prezentovaných údajů je zřejmý jednoznačný, přibližně 40% rozdíl v obsahu polyfenolů ve vstupních surovinách, které byly použity k výrobě šťávy pomocí staré a nové technologie. S tím jsou spojeny i pozorované rozdíly v průběhu skladování, kdy průměrný obsah polyfenolů za použití staré technologie byl přibližně o 25 % vyšší. Nicméně, tento rozdíl lze vysvětlit kvalitativními rozdíly vstupních surovin (odlišné šarže). Vzhledem k tomu, že nová technologie se zaváděla do výroby postupně v průběhu roku 2012, uplynul mezi výrobou uvedených šťáv, stejně jako u ananasových šťáv, téměř jeden rok, a výrobce nebyl z těchto důvodů schopen zajistit identický vzorek vstupní suroviny.



Obr. 57: Změny celkového obsahu polyfenolů v 100% šťávách z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou, které byly vyrobeny za použití staré a nové technologie, během 22 týdnů skladování v chladničce při 7 °C. Přerušovanou čarou jsou znázorněny matematicky vypočítané závislosti podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu.

Po přidání dužiny ke vstupní surovině a šetrné pasterizaci došlo v obou případech k nárůstu obsahu TPC, přičemž při použití staré technologie je tento rozdíl zanedbatelný, což je v souladu s publikovanými studii posuzujícími rozdíly mezi pasterizovanými a nepasterizovanými pomerančovými šťávami [83, 235]. Naproti tomu, v případě nové technologie je rozdíl v obsahu TPC mezi vstupní surovinou a vzorkem po pasterizaci přibližně 22 %. Tento rozdíl může být vysvětlen přidavkem dužiny do pomerančové šťávy před pasterizací. Avšak, vzhledem k tomu, že její přídavek do šťáv vyráběných klasickou technologií vedl jen k nepatrným změnám hodnot TPC, tento výraznější nárůst u nové technologie lze pravděpodobně spojit jak s aplikací dusíkové atmosféry v předpasterizačních fázích výroby, tak i aplikací uzávěrů na bázi zhášečů kyslíku, které byly využity s cílem prodloužit trvanlivost výrobku.

V průběhu skladování dochází k očekávanému poklesu TPC, přičemž u staré technologie je zřejmá vyšší variabilita naměřených hodnot, která může souviset, jak už bylo uvedeno výše, s vznikem nízkomolekulárních polyfenolických látek v důsledku oxidačně-redukčních změn, ale i omezenou selektivitou F-C činidla [228, 229]. U šťáv vyrobených pomocí nové

technologie je tento problém pravděpodobně eliminován aplikací dusíkové atmosféry v kombinaci s aktivními obalovými materiály, které mohou do jisté míry eliminovat procesy vedoucí k změně kvality šťávy balené v tomto typu obalů.

Jak je patrné z Obr. 57, na konci expirace (18. týden) poklesla koncentrace TPC u staré technologie přibližně o 12 %, u nové technologie byl pozorován pokles o cca 20 % v porovnání s pasterizovaným vzorkem (1. den). Zatímco u šťáv vyrobených klasickou technologií nedošlo v následujících 4 týdnech k výrazným změnám TPC, a výsledný pokles po 22 týdnech skladování pomerančové šťávy je srovnatelný s obsahem TPC na konci expirační doby, u šťáv vyrobených novou technologií dochází dále k poklesu až na hodnotu 470 mg.l^{-1} (hodnota porovnatelná se vstupní surovinou před pasterizací, $P = 0.0578$), což představuje přibližně 23% pokles v porovnání s pasterizovaným vzorkem (1. den). Tento výraznější pokles může souviset s kvalitou vstupní suroviny, případně i problémy ve výrobě, vzhledem k tomu, že se jednalo o nově zaváděný výrobní postup.

Pozorované změny obsahu TPC v závislosti na době skladování byly popsány kinetickou rovnicí prvního řádu. Vypočítaná rychlostní konstanta pomerančových šťávách vyrobených klasickou technologií dosáhla mírně vyšší hodnoty $k_{TPC} = 0.019 \pm 0.006 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.844$). Nižší hodnota koeficientu determinace u klasické technologie je výsledkem většího rozptylu naměřených dat v porovnání s novou technologií, kde pozorované změny TPC byly charakterizovány rychlostní konstantou $k_{TPC} = 0.017 \pm 0.002 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.969$). Přestože je mezi příslušnými rychlostními konstantami přibližně 11% rozdíl, ze statistického hlediska je po zohlednění chyby regresního modelu (chyby odhadu hodnoty k) zanedbatelný. Nicméně, při objektivním zhodnocení zvolených kinetických modelů je opět nezbytné vzít v úvahu koncentrační rozdíly mezi vzorky, stejně jako tomu bylo u ananasových šťáv.

Na základě výsledků je tedy možné konstatovat, že obsah TPC v pomerančových šťávách může být ovlivňován zvoleným technologickým postupem výroby, avšak z porovnání rychlostních konstant je zřejmé, že rychlost změn obsahu polyfenolů u výrobků získaných novou technologií je srovnatelná s klasicky vyrobenými šťávami.

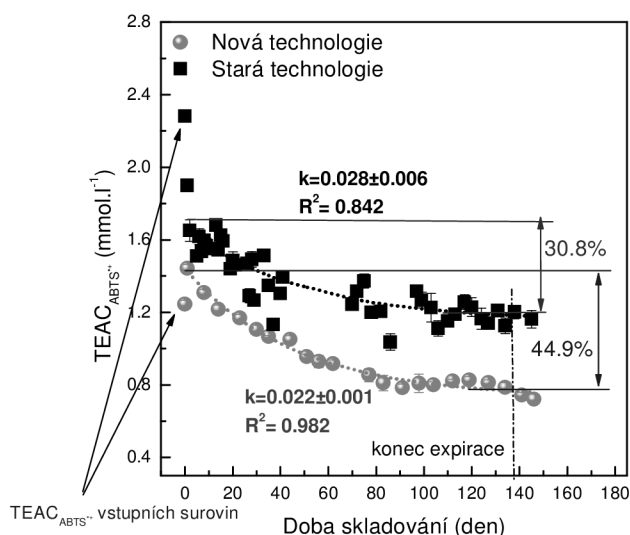
ABTS^{•+} radikál-zhášející aktivita

Výsledky ABTS^{•+} radikál-zhášející aktivity pomerančových šťáv, které byly vyjádřeny jako hodnoty Trolox-ekvivalent, jsou znázorněny na Obr. 58. Je zřejmé, že v průběhu skladování dochází k postupnému poklesu antioxidační kapacity pomerančových šťáv, přičemž tento trend je výraznější u šťáv při jejichž výrobě byla aplikována dusíková atmosféra a uzávěry obsahující zhášeče kyslíku.

Podle očekávání, a v souladu s výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů, je zřejmý jednoznačný rozdíl v hodnotách TEAC_{ABTS^{•+}} vstupních surovin (0 – čistá pomerančová šťáva) určených k výrobě 100% šťáv s čerstvě lisovaných pomerančů pomocí dvou odlišných technologií. Průměrné hodnoty TEAC_{ABTS^{•+}} pomerančových šťáv vyrobených klasickou technologií jsou přibližně o 30 % vyšší než u šťáv připravených novou technologií, přičemž na základě výsledků analýzy ANOVA se jedná o statisticky významný rozdíl ($P = 0.0000$). Tento rozdíl je výsledkem očekávaných koncentračních rozdílů mezi vzorky vstupních surovin, které byly použity při výrobě analyzovaných pomerančových šťáv s dužinou, s tím jsou spojeny i další pozorované rozdíly mezi oběma typy šťáv.

Po smíchání čisté pomerančové šťávy s dužinou a následné pasterizaci, došlo u klasicky vyrobených šťáv k poklesu antioxidační aktivity o cca 22 %. Pokles antioxidační aktivity po pasterizaci pomerančových šťáv byl potvrzen i v publikovaných studiích, nicméně v těchto

případech se rozdíly mezi nepasterizovanými a pasterizovanými pomerančovými šťávami považovaly, po zohlednění chyby měření, za nevýznamné [83]. U druhého typu analyzovaných šťáv došlo po přidavku dužiny a pasterizaci k nárůstu antioxidační aktivity přibližně o 15 % v porovnání s čistou pomerančovou šťávou. V tomto případě se pravděpodobně uplatňuje pozitivní vliv aplikace dusíkové atmosféry v kombinaci s uzávěry na bázi zhášeců kyslíku, s cílem minimalizovat obsah kyslíku ve šťávě, a tím zpomalit barevné změny, pokles koncentrace kyseliny askorbové nebo antioxidační aktivity.



Obr. 58: Změny $TEAC_{ABTS^{+}}$ hodnot 100% šťáv z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou, které byly vyrobeny za použití staré a nové technologie, během 22 týdnů skladování v chladničce při 7 °C. Přerušovanou čarou jsou znázorněny matematicky vypočítané závislosti podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu.

U klasicky vyrobených šťáv poklesla antioxidační aktivita na konci expirační doby o cca 31 % v porovnání s vzorkem analyzovaným 1. den po pasterizaci, přičemž v následujícím měsíci došlo jen k nepatrným změnám. Rychlostní konstanta popisující tento pokles dosáhla hodnoty $k_{ABTS^{+}} = 0.028 \pm 0.006 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.842$). V souladu s výsledky stanovení TPC, i v tomto případě je zřejmá nižší hodnota koeficientu determinace, která je výsledkem pozorované variability naměřených hodnot $TEAC_{ABTS^{+}}$. U šťáv, při jejichž výrobě byla v předpasterizačních fázích použita dusíková atmosféra, a PET láhve byly uzavřeny uzávěry obsahující zhášec kyslíku, došlo během prvních 14 týdnů skladování k nejvýraznějšímu poklesu $TEAC_{ABTS^{+}}$, o cca 45 % oproti pasterizovanému vzorku (1. den skladování), přičemž v následujících 6 týdnech se hodnoty $TEAC_{ABTS^{+}}$ výrazně neměnily, pohybovaly se na úrovni 0.8 mmol.l^{-1} . Rychlostní konstanta charakterizující změny antioxidační aktivity u druhého typu pomerančové šťávy skladované v rozmezí 1–22 týdnů dosáhla nižší hodnoty ve srovnání s předchozím typem pomerančové šťávy, a to $k_{ABTS^{+}} = 0.022 \pm 0.001 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.982$). Nicméně rozdíly mezi uvedenými rychlostními konstantami jsou, po zohlednění chyby odhadu hodnoty k , nevýznamné.

Kromě koncentračních rozdílů, které jsou jedním z hlavních faktorů ovlivňujících změny antioxidační aktivity obou typů pomerančových šťáv v průběhu skladování, pozorované rozdíly v radikál-zhášející aktivitě mohou souviset i s rozdílným obsahem dužiny, vzhledem k tomu, že rozdíl v obsahu dužiny mezi jednotlivými PET láhvemi analyzovaných šťávách se pohyboval v rozmezí 10–40 %. Mění se obsah dužiny také ovlivňuje koncentraci hesperidinu, nejvýznamnějšího flavonoidu vyskytujícího se v dužině citrusových plodů, který výraznou měrou přispívá k celkové antioxidační aktivitě těchto ovocných šťáv [236, 237]. Stejně jako v případě ananasových šťáv je třeba vzít v úvahu i přítomnost stopových prvků ve šťávách (Tab. 19), jejichž zastoupení se mění i v závislosti zda se jedná o čistou

pomerančovou šťávu nebo šťávu s dužinou, nicméně opět se jedná pouze o screeningové stanovení prvků založené na analýze, i když opakované, 1 láhve čisté šťávy a šťávy s dužinou.

Tab. 19: Průměrný obsah vybraných prvků v pomerančových šťávách s dužinou [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$].

ID	Fe	Ni	Zn	Mn	Cu	Cd	Cr	Mo	Pb
Pomerančová šťáva s dužinou	0.986	0.020	1.850	0.379	0.051	1.10^{-4}	0.015	0.003	0.028
Pomerančová šťáva bez dužiny	1.110	0.031	1.710	0.389	0.030	3.10^{-4}	0.011	0.003	0.022

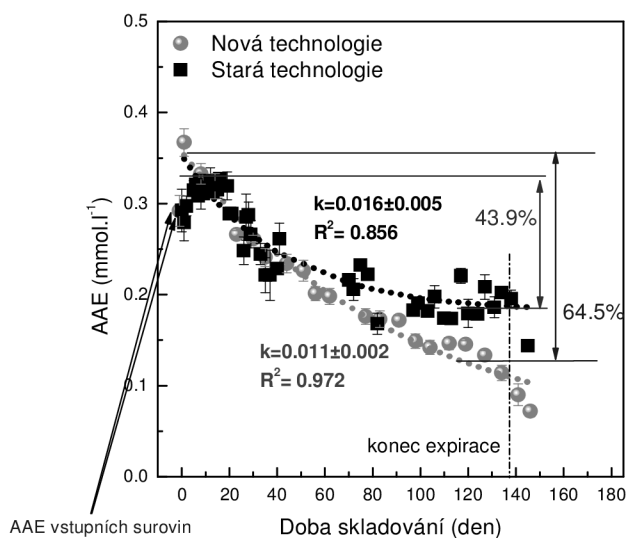
Pozorované změny hodnot $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$ dobře korelují se změnami obsahu celkových polyfenolů (Tab. 20). Opět se potvrdila vyšší korelace hodnot $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$ a TPC u nové technologie ($R = 0.835$) v porovnání s klasickou technologií ($R = 0.798$). U pomerančových šťáv vyrobených pomocí nové technologie se rovněž podařilo eliminovat rozptyl naměřených hodnot, který byl zřejmý u klasicky vyrobených šťáv. Podobně jako tomu bylo v případě ananasových šťáv, na základě průběhu změn jednotlivých parametrů antioxidační aktivity u pomerančových šťáv, při jejichž výrobě byly použita kombinace dusíkové atmosféry v předpasterizačních fázích výroby a aktivní obalové materiály, lze lépe predikovat změny jejich antioxidačních vlastností, ke kterým dochází v průběhu skladování.

Radikál-zhášející aktivita proti radikálu TEMPOL

Změny hodnot AAE pomerančových šťáv v průběhu 22 týdnů skladování, které byly vypočteny pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardních roztoků kyseliny askorbové v koncentračním rozmezí $0-1.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($R^2 = 0.996$) jsou znázorněny na Obr. 59.

Zatímco v případě TPC a $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$ jsou tyto hodnoty pro vstupní surovinu odlišné v závislosti na použité technologii (na základě výsledků analýzy ANOVA lze tyto rozdíly označit za statisticky významné – $P = 0.0000$ pro TPC, resp. $P = 0.0236$ pro $\text{TEAC}_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$), v případě hodnot AAE je tento rozdíl zanedbatelný ($P = 0.6254$).

V souladu s očekáváním a výsledky předchozích experimentů, u klasicky vyrobených šťáv došlo po přidání dužiny a následné pasterizaci k poklesu hodnot AAE, nicméně pozorované rozdíly jsou nevýznamné. Naproti tomu, u šťáv vyrobených pomocí nové technologie došlo k přibližně 20% nárůstu hodnot AAE, čímž se opět potvrdil předpokládaný pozitivní vliv přidání dužiny ve spojení s aplikací dusíkové atmosféry a aktivních obalových materiálů.



Obr. 59: Změny AAE hodnot 100% šťáv z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou, které byly vyrobeny za použití staré a nové technologie, během 22 týdnů skladování v chladničce při 7 °C. Přerušovanou čárou jsou znázorněny matematicky vypočítané závislosti podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu.

V následujících dnech po pasterizaci dochází u obou typů pomerančových šťáv k postupnému poklesu AAE. U klasicky vyrobených šťáv došlo na konci expirační doby k cca 44% poklesu AAE, zatímco u šťáv vyrobených pomocí nové technologie klesla schopnost pomerančových šťáv terminovat radikál TEMPOL téměř o 65 % v porovnání s pasterizovaným vzorkem, který byl analyzován v 1. dni skladování. V souladu s očekáváním, se u klasicky vyrobených šťáv potvrdila zřejmá variabilita naměřených dat, pravděpodobně v důsledku kolísajícího obsahu dužiny v jednotlivých PET láhvích, a s tím spojených rozdíly koncentrace kyseliny askorbové (a dalších složek) ve šťávách. Naproti tomu u šťáv, při jejichž výrobě byly použity dusíková atmosféra v kombinaci s uzávěry na bázi zhášečů kyslíku, se tento problém podařilo výrazně eliminovat.

Pro pozorované změny hodnot AAE byla u klasicky vyrobených šťáv stanovena hodnota rychlostní konstanty zániku TEMPOL $k_{TEMPOL} = 0.016 \pm 0.005 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.856$), v případě šťáv vyrobených novou technologií je pak hodnota k nižší, $k_{TEMPOL} = 0.011 \pm 0.002 \text{ den}^{-1}$ ($R^2 = 0.972$). Přestože je rychlostní konstanta charakterizující změny AAE v průběhu skladování pomerančových šťáv vyrobených pomocí nové technologie přibližně o 30% nižší v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami, nelze tento rozdíl označit za statisticky významný, neboť uvedené rychlostní konstanty lze považovat, po zohlednění chyby odhadu hodnot k , za zanedbatelné. Mimoto, hodnoty rychlostních konstant jsou rovněž ovlivňovány variabilitou naměřených dat, která je staré technologie výroby vyšší. Nicméně, objektivní zhodnocení rozdílů mezi odlišnými technologickými postupy výroby není možné, vzhledem k odlišným koncentracím vstupních surovin, které byly použity k výrobě pomerančových šťáv s dužinou, jak už bylo několikrát uvedeno.

Tab. 20: Korelační matice experimentálních charakteristik 100% šťáv z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou.

Stará technologie			Nová technologie				
	TPC	TEAC _{ABTS^{•+}}	AAE		TPC	TEAC _{ABTS^{•+}}	AAE
TPC	1.000			TPC	1.000		
TEAC _{ABTS^{•+}}	0.798	1.000		TEAC _{ABTS^{•+}}	0.835	1.000	
AAE	0.927	0.744	1.000	AAE	0.835	0.974	1.000

Z Tabulky 20, ve které jsou uvedeny vzájemné korelační koeficienty jednotlivých experimentálních charakteristik pomerančových šťáv, je zřejmá velmi dobrá korelace hodnot AAE jak obsahem polyfenolů, tak i radikál-zhášející aktivitou oproti radikálu ABTS^{•+} pro obě použité technologie. Přičemž, mírně vyšší korelace byly zjištěny pro šťávy při jejichž výrobě byla použita kombinace dusíkové atmosféry a aktivních obalových materiálů, podobně jako tomu bylo u ananasových šťáv.

Celkové zhodnocení 100% šťáv z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou

Na základě prezentovaných údajů lze konstatovat, že sledované parametry antioxidační aktivity 100% šťáv z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou jsou, stejně jako v případě ananasových šťáv, ovlivňovány několika faktory. V první řadě je třeba vzít v úvahu koncentrační rozdíly mezi vstupními surovinami (čistá pomerančová šťáva), přičemž kvalita vstupních surovin se může odlišovat v závislosti na regionálním původu nebo odrůdě, ale i množství dužiny ve šťávě.

Opět se potvrdilo, že rozdíly v obsahu dužiny v jednotlivých baleních šťáv se pohybují v rozmezí 10–40 %, z čehož pak mohou vyplývat pozorované rozdíly sledovaných parametrů v průběhu jednotlivých týdnů skladování. Jak bylo uvedeno výše, rovněž je třeba vzít v úvahu

přítomnost některých stopových prvků (Fe, Mn, Cu), které hrají roli v některých pro-oxidačních procesech.

Z výsledků měření lze také předpokládat vliv odlišných technologických postupů výroby na sledované parametry. V souladu s výsledky získanými pro ananasové šťávy, i v tomto případě dochází u šťáv vyrobených pomocí nové technologie po přidání dužiny a pasterizaci k nárůstu jejich antioxidačních vlastností, zatímco u klasicky vyrobených šťáv není zřejmý jednoznačný trend.

Tab. 21: Hodnoty rychlostních konstant charakterizující změny vybraných parametrů pomerančových šťáv vypočítaných podle kinetické rovnice platné pro reakce 1. řádu, spolu s celkovými změnami vybraných parametrů (Δc) antioxidační aktivity pomerančových šťáv na konci expirační doby.

Parametr/Technologie	k (den^{-1})		R^2		Δc (%)	
	Stará	Nová	Stará	Nová	Stará	Nová
TPC	0.019±0.006	0.017±0.002	0.844	0.969	11.8	19.8
TEAC _{ABTS+•}	0.028±0.006	0.022±0.001	0.842	0.982	30.8	44.9
AAE	0.016±0.005	0.011±0.002	0.856	0.972	43.4	64.5

Co se týče samotného porovnání klasické výroby pomerančových šťáv a výroby, při které byla aplikována dusíková atmosféra v předpasterizačních fázích výrobního postupu (skladovací a míchací tank), a PET láhve byly uzavřeny pomocí aktivních uzávěrů na bázi zhášečů kyslíku, opět se potvrdil výraznější celkový pokles sledovaných parametrů u šťáv vyrobených pomocí nové technologie, v případě hodnot AAE je rozdíl nová t.–stará t. více jak 20 %. Výraznější pokles antioxidačních vlastností pomerančových šťáv při jejichž výrobě byla využita kombinace dusíkové atmosféry a uzávěrů na bázi unášečů kyslíku může do jisté míry souviset i s případnými problémy při výrobě (pasterizace, plnění), vzhledem k tomu, že se jednalo o nově zaváděný postup přímo do výroby.

Nicméně vypočítané kinetické parametry (Tab. 21) charakterizující rychlost poklesu antioxidačních vlastností těchto šťáv v průběhu skladování byly nižší v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami, avšak zjištěné rozdíly mezi rychlostními konstantami jsou, po zohlednění chyby odhadu hodnoty k , nevýznamné.

Stejně jako v případě ananasových šťáv, významnost rozdílů mezi jednotlivými parametry antioxidační aktivity pomerančových šťáv v závislosti na odlišných technologických postupech (Tab. 22) byla ověřena metodou ANOVA – testem shody regresních přímek, který ověřuje signifikantnost rozdílů regresních konstant, které přímo vyjadřují rozdíly mezi hodnotami TPC, TEAC_{ABTS+•} a AAE jednotlivých technologických postupů výroby. Podle očekávání byly u všech parametrů antioxidační aktivity zjištěny statisticky významné rozdíly mezi klasickou a novou technologií výroby, avšak opět je třeba vzít v úvahu koncentrační rozdíly vstupních surovin.

Tab. 22: Statisticky významné rozdíly antioxidačních charakteristik pomerančových šťáv v závislosti na odlišných technologiích výroby ($P < 0.05$ statisticky významný rozdíl).

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost ($P < 0.05$)
TPC	Stará t. – Nová t.	180.0566	3.4037	0.0000
TEAC _{ABTS+•}	Stará t. – Nová t.	0.3634	0.0191	0.0000
AAE	Stará t. – Nová t.	0.0250	0.0043	0.0001

Na základě dosažených výsledků nelze tedy jednoznačně potvrdit, ani vyvrátit, stejně jako tomu bylo u ananasových šťáv, že aplikace dusíkové atmosféry v skladovacím a míchacím

tanku v předpasterizačních fázích výroby, stejně jako využití aktivních obalových materiálů, pomůže zlepšit stabilitu pomerančových šťáv, a tím prodloužit jejich trvanlivost v porovnání s klasicky vyrobenými šťávami. Naopak, pokud bychom měli posuzovat vliv nové technologie výroby pomerančových šťáv na jejich stabilitu, a to pouze na základě změn jednotlivých parametrů antioxidační aktivity na konci expirační doby, z dosažených výsledků je zřejmé, že jako vhodnější se ukazuje klasická technologie výroby.

Sledované změny antioxidačních vlastností jsou v dobrém souladu s výsledky stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC, kdy se potvrdil její výraznější pokles ve šťávách vyrobených pomocí nové technologie. Předpokládaný pozitivní vliv kombinace dusíkové atmosféry a aktivních obalových materiálů se nepotvrdil ani v případě celkových barevných změn pomerančových šťáv, přičemž parametr žluté barvy (+b*) se mění nejvýrazněji v závislosti na odlišných technologiích výroby. Nicméně i v tomto případě je třeba zohlednit výše uvedené faktory, které mohou ovlivňovat antioxidační vlastnosti 100% šťáv z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou, zejména odlišnou kvalitu a původ vstupních surovin..

Na základě výsledků této studie, zaměřené na posouzení vlivu změn ve výrobních postupech na vybrané, v tomto případě antioxidační vlastnosti ananasových a pomerančových šťáv, se prokázaly určité odlišnosti sledovaných parametrů v závislosti na zvoleném výrobním postupu ovocné šťávy.

Ve většině případů se potvrdil pozitivní vliv přídavku ovocných kousků nebo dužiny na sledované antioxidační vlastnosti ovocných šťáv, především u nové technologie, čímž se může výrobek stát více atraktivním pro spotřebitele.

Bez ohledu na použitou technologii výroby, dochází v průběhu skladování k oxidačním reakcím, avšak ani aplikace dusíkové atmosféry v předpasterizačních fázích výroby v kombinaci s uzávěry na bázi zhášeců kyslíku nemusí být schopná jednoznačně tyto oxidační změny eliminovat, avšak u takto vyrobených šťáv lze lépe predikovat změny antioxidačních vlastností v průběhu skladování.

Z výsledků měření vyplývá, že antioxidační aktivita ovocných šťáv se mění v závislosti na podmínkách skladování (teplota, doba skladování), ale i regionálním původu, odrůdě a kvalitě sklizeného ovoce. Pro objektivní zhodnocení vlivu odlišných výrobních postupů na stabilitu ovocných šťáv je rovněž potřebné připravit šťávy z jednoho vzorku vstupní suroviny, čímž by se eliminovaly koncentrační rozdíly, které v našem případě toto objektivní zhodnocení znesnadňují. Toto však výrobce není schopen zajistit.

Výsledky dosažené v oblasti charakterizace vlivu změn technologie výroby, resp. vlivu změn skladovacího režimu (teplota, světelný režim) prezentované v této části práce byly podkladem pro vznik několika odborných článků, odborných studií, abstraktů příspěvků na domácích a zahraničních konferencích, kde byly prezentovány buď ve formě odborných přednášek nebo posterů. Detaily jsou uvedeny v další části dizertační práce.

7. ZÁVĚRY

Pomocí kombinace metod EPR a UV/VIS spektroskopie, podle potřeby s dalšími analytickými metodami (HPLC, AAS, elektroforéza) byly charakterizovány antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti a další parametry vybraných potravin. Tematicky je práce rozdělena do dvou částí. První část se zabývala posouzením vhodnosti využití antioxidačních vlastností a dalších, dominantně spektrálních, charakteristik vybraných potravin získaných ekologickými a konvenčními pěstitelskými a výrobními postupy (vína, špaldová mouka), jako markerů vhodných pro jejich jednoznačnou diferenciaci. V druhé části pak byla posuzována stabilita ananasových a pomerančových šťáv v závislosti na různých technologických postupech výroby, které byly aplikovány s cílem prodloužit trvanlivost výrobku.

Zaměření práce je důsledkem řešení projektů vědy a výzkumu zaměřených na problematiku charakterizace kvality a autentifikaci potravin na pracovišti spektroskopických metod Výzkumného ústavu potravinářského, jejichž výsledky byli podkladem pro vznik této dizertační práce.

Výsledky dizertační práce je možné shrnout následovně:

1. Komplexní studium antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností biovín a konvenčních vín. Studovalo se celkem 15 parametrů – deskriptorů antioxidační aktivity biovín a konvenčních vín, vyprodukovaných v středoslovenské vinohradnické oblasti Modrý Kameň, jako potenciálních markerů pro autentifikaci a jednoznačnou diferenciaci ekologicky a konvenčně produkovaných vín. Kromě slovenských biovín byly analyzovány i komerčně dostupná biovína z České republiky, Rakouska, Maďarska a Itálie s cílem otestovat následně regionální diferenciaci vín na základě jejich spektrálních charakteristik. Na posouzení vlivu produkčních a technologicko-zpracovatelských operací na antioxidační status vín byla všechna experimentální data zpracována metodou ANOVA, a dále metodami vícerozměrné statistiky.

Z výsledků analýz vyplývá, že antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti slovenských vín jsou ovlivňovány jak způsobem produkce (ekologické vs. konvenční), tak i ročníkem a odrůdovou skladbou. Přestože konzumenti často považují biopotraviny, včetně vín, za nutričně hodnotnější, chutnější nebo zdraví prospěšnější, výsledky většiny publikovaných prací jsou v tomto směru často protichůdné a nejednoznačné. I v našem případě, co se týče celkového zhodnocení antioxidačních vlastností studovaných komodit, se ani v případě komparace ekologických a konvenčních vín nepodařilo jednoznačně prokázat, že by vína získaná ekologickými pěstitelskými a výrobními postupy obsahovala vyšší koncentrace polyfenolů, a tedy byla charakterizována vyšší antioxidační aktivitou. Přestože byly pro oba parametry potvrzeny vysoké korelace obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity, ve většině případů mírně vyšší pro biovína, dosažené výsledky hovoří spíše ve prospěch konvenčních vín, u kterých byl na základě statistických analýz potvrzen nejen vyšší obsah polyfenolů, ale i vyšší antioxidační aktivita charakterizována jako metodami EPR, tak i UV/VIS spektroskopie.

I když výsledky jednotlivých spektroskopických analýz odhalily značnou variabilitu a často nejednoznačné rozdíly mezi jednotlivými skupinami vín, zjištěné rozdíly jsou dostačující pro úspěšnou diferenciaci a klasifikaci vín podle způsobu produkce s využitím metod vícerozměrné statistiky. Jako nejvhodnější markery využitelné na diferenciaci biovín od vín konvenčních lze na základě statistické analýzy označit parametry AAE a k_{TEMPOL} , jejichž hodnoty byly vyšší v konvenčních vínech, avšak v biovínech byly vyšší hodnoty %RS.

Bez ohledu na charakter vzorků (typ vína, ročník, odrůda) se podařilo diferencovat oba typy vín na více jak 85 %. Přestože uvedené výsledky jsou velmi slibné, variabilita systému a úspěšnost klasifikace vzorků (klasifikační skóre) jsou ovlivňovány skutečností, že diferenciace byla provedena společně pro bílá a červená ekologická a konvenční vína. Efektivnější se ukázala oddělená diferenciace bílých a červených vín, kdy bylo dosaženo 100%, resp. 95.2 % správně klasifikovaných vzorků.

Navíc se ukazuje, že uvedené deskriptory antioxidačních vlastností jsou využitelné i na regionální diferenciaci vzorků vín, i když s ohledem na limitovaný počet vzorků zahraničních vín jsou tyto závěry jen předběžné a vyžadují si další studium.

Na základě výsledků této studie lze tedy konstatovat, že metodu EPR spektroskopie, resp. charakteristiky antioxidačních vlastností je možné efektivně využít na rozlišování vín podle způsobu produkce buď samostatně, nebo v kombinaci s UV/VIS spektroskopii a jinými analytickými metodami (zejména HPLC, AAS a elektroforézy) s využitím metod multivariační statistické analýzy pro následné zpracování experimentálních dat.

2. Studium antioxidačních a radikál-zhášejících vlastností ekologických a konvenčních špaldových mouk. Posuzoval se vliv extrakčních podmínek (druh použitého extrakčního činidla – 50% etanol/voda (v/v), 50% aceton/voda (v/v) a voda) na antioxidační aktivitu extraktů komerčně dostupných ekologických a konvenčních pšeničných, žitných a špaldových mouk slovenského a maďarského původu s cílem vybrat nejvhodnější extrakční systém pro izolaci tzv. funkčních složek z mouk (dominantně polyfenoly a flavonoidy), které lze potenciálně využít jako přídatné látky v potravinářském průmyslu. Na základě výsledků měření lze konstatovat, že druh extrakčního činidla výrazně ovlivňuje složení extraktů, včetně koncentrace polyfenolů a flavonoidů, a tedy i výslednou antioxidační aktivitu extraktů mouk. Jako nejúčinnější extrahovalo, z hlediska výtěžnosti funkčních složek, lze označit 50% etanol/voda a 50% aceton/voda, jejichž extrakční účinnost je porovnatelná.

Z praktických důvodů, a z důvodu dalšího potenciálního využití izolátů jako přídatných látek v potravinách, byl následně zvolený 50% etanol/voda jako nejvhodnější extrakční systém pro izolaci polyfenolických látek z mouk připravených ze dvou odrůd pšenice špaldy, ÖKO-10 a Lajta, pěstovaných v režimu ekologického a konvenčního zemědělství v letech 2010-2012 na území Slovenska (regiony Sládkovičovo a Lehnice) a Maďarska (regiony Mosonmagyaróvár, Rabcakapi a Sopronkövesd). V tomto případě se posuzoval vliv několika faktorů, včetně sezóny, odrůdové skladby, regionálních rozdílů a odlišných režimů pěstování na sledované parametry špaldových mouk, resp. jejich extraktů.

Na základě uvedených skutečností lze konstatovat, že sledované deskriptory antioxidační aktivity špaldových mouk jsou různou měrou ovlivňovány nejen environmentálními faktory (sezónní rozdíly), ale i původem, odrůdovou skladbou, volbou produkčního systému, ale i způsobem ošetření pšenice špaldy během vegetace, i když tento vliv se na základě získaných údajů jeví jako nevýznamný.

Přestože výsledky jednotlivých spektroskopických analýz odhalily často nejednoznačné rozdíly mezi jednotlivými skupinami vzorků mouk, zjištěné rozdíly jsou dostačující pro jejich úspěšnou diferenciaci a klasifikaci podle zvolených kritérií s využitím metod vícerozměrné statistiky. Bez ohledu na produkční systém, krajinu původu nebo odrůdu, bylo úspěšně klasifikováno téměř 97 % špaldových mouk podle roku produkce. Naproti tomu v případě diferenciace mouk podle jejich příslušnosti k produkčnímu systému, klasifikační skóre dosáhlo přibližně 84 %. Mimoto se ukazuje, že uvedené deskriptory antioxidačních vlastností

jsou využitelné i na regionální diferenciaci vzorků špaldových mouk, kdy správnost klasifikace slovenských a maďarských mouk dosáhla více než 98 %, zatímco při diferenciaci mouk podle jednotlivých regionů (2 slovenské, 3 maďarské regiony) diskriminační skóre kleslo na cca 77 %. Přestože tyto výsledky jsou velmi slibné, úspěšnost klasifikace se ještě zvýší, pokud při diskriminaci mouk podle produkčního systému, krajiny původu, ale i odrůdy nebo regionu zohledníme i produkční rok.

Podobně jako tomu bylo v případě porovnání ekologických a konvenčních vín, ani v případě špaldových mouk nelze na základě jednoduchá komparace potvrdit vyšší antioxidační vlastnosti ekologických mouk. V souladu s výsledky statistické analýzy zaměřené na posouzení signifikantnosti rozdílů jednotlivých parametrů špaldových mouk v závislosti na produkčním systému se lze přiklonit k názoru, že konvenční mouky byly charakterizovány vyšším obsahem polyfenolů, a s tím spojenou vyšší antioxidační aktivitou. Nicméně, tyto analýzy také prokázaly, že sledované deskriptory antioxidačních vlastností špaldových mouk jsou výrazněji ovlivňovány sezónními a regionálními vlivy než volbou produkčního systému.

3. Studium stability ovocných šťáv. Posuzoval se vliv změn ve výrobních postupech (klasická technologie výroby vs. technologie s aplikací dusíkové atmosféry v předpasterizačních fázích výroby v kombinaci s využitím aktivních obalů a uzávěrů na bázi zhášeců kyslíku) na antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti dvou typů ovocných šťáv - 100% šťávy z čerstvě lisovaných ananasů s kousky ananasu a 100% šťávy z čerstvě lisovaných pomerančů s dužinou. V prvotní fázi bylo studium zaměřeno na posouzení vlivu různých teplotních a světelných režimů skladování na dynamiku změn vybraných parametrů ovocných šťáv vyráběných klasickým technologickým postupem. Dále se studium zaměřilo na posouzení dynamiky těchto změn po zavedení inovací ve výrobním postupu – aplikaci inertní atmosféry ve vybraných technologických operacích a využití obalových materiálů na bázi aktivních filtrů a scavengerů kyslíku.

Z výsledků měření vyplývá, že antioxidační aktivita ovocných šťáv se výrazně mění v závislosti na podmínkách skladování (teplota, doba skladování, světelný režim), ale i regionálním původem, odrůdě a kvalitě sklizeného ovoce. Potvrdil se negativní vliv teploty na sledované kvalitativní parametry, přičemž se ukazuje že z technologického a ekonomického hlediska jsou změny vyvolané ve vzorcích skladovaných při 2 °C a 7 °C při stejných světelných podmínkách srovnatelné, a tedy skladovací teplota 7 °C je postačující pro zachování vlastností vzorků po dobu její expirace.

Prokázaly se rovněž určité odlišnosti sledovaných parametrů v závislosti na zvoleném výrobním postupu ovocné šťávy, např. přidavek ovocných kousků nebo dužiny vedl ve většině případů k nárůstu antioxidační aktivity pomerančových i ananasových šťáv, přičemž tento trend byl výraznější u šťáv vyrobených novou technologií.

Nicméně, i když není možné výsledky pro klasický a inovovaný technologický postup srovnat na absolutní bázi z důvodu odlišné kvality vstupní suroviny (důsledek časového odstupu v souvislosti se zaváděním nových technologických prvků), ukazuje se, že samotná aplikace dusíkové atmosféry (pouze) v předpasterizačních fázích výroby v kombinaci s aktivními obalovými materiály nemusí být schopná oxidační změny probíhající ve šťávách eliminovat. Výsledky statistických analýz zaměřených na posouzení signifikantnosti rozdílů jednotlivých parametrů v závislosti na odlišných technologických postupech výroby potvrdily, že jako účelnější se ukazuje aplikace klasické technologie výroby, především u

pomerančových šťáv, zatímco u ananasových šťáv jsou tyto rozdíly nejednoznačné. Přestože byl u šťáv vyrobených novou technologií také potvrzen výraznější pokles jejich antioxidačních vlastností v průběhu skladování, tyto změny byly popsány nižšími hodnotami rychlostních konstant. Mimoto, na základě pozorovaného průběhu změn jednotlivých parametrů a nižšího rozptylu a variability dat, lze u takto vyrobených šťáv lépe predikovat změny antioxidačních vlastností v průběhu skladování a tedy lépe odhadnout optimální skladovací podmínky a dobu expirace.

8. LITERATURA

- [1] Organic Agriculture Worldwide: Key results from the FiBL-IFOAM survey on organic agriculture worldwide 2013. Part 2: Crop data [online], poslední revize 4. dubna 2013 [cit. 20.6.2013]. Dostupné z: <<http://orgprints.org/22349/22/fibl-ifoam-2013-crops-2011.pdf>>.
- [2] Nařízení Rady (ES) č. 834/2007 ze dne 28. června o ekologické produkci a označování ekologických produktů a o zrušení nařízení (EHS) č. 2092/91 Úřední věstník Evropské unie, 2007, No. L189, pp. 1-23.
- [3] Nařízení Komise (ES) č. 889/2008 ze dne 5. září 2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 837/2007 o ekologické produkci a označování ekologických produktů, pokud jde o ekologickou produkci, označování a kontrolu. 2008, No. L 250, pp. 1-84.
- [4] Organic Agricultural Worldwide: Key results from the FiBL-IFOAM survey on organic agriculture worldwide 2013. Part 3: Organic agriculture in the regions 2011 [online], poslední revize 16. června 2013 [cit. 20.6.2013]. Dostupné z: <<http://orgprints.org/22349/34/fibl-ifoam-2013-regions-2011.pdf>>.
- [5] The principles of organic agriculture [online], poslední revize 18. června 2013 [cit. 18.6.2013]. Dostupné z: <<http://infohub.ifoam.org/en/what-organic/principles-organic-agriculture>>.
- [6] Dlouhý, J. - Urban, J.: *Ekologické zemědělství bez mýtů: Fakta o ekologickém zemědělství a biopotravinách pro média*. 1. vyd. Olomouc: Česká technologická platforma pro ekologické zemědělství, 2011, 26 s. ISBN 978-80-87371-13-8.
- [7] Nařízení Komise (EU) č. 271/2010 ze dne 24. března 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 889/2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007, pokud jde o logo Evropské unie pro ekologickou produkci. Úřední věstník Evropské unie, 2010, No. L84, pp. 19-22.
- [8] IFOAM: *The IFOAM basic standards for organic production and processing, version 2005*. 1st ed. Germany: IFOAM, 2006 85 p. ISBN 3-934055-65-6.
- [9] Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: Ekologické zemědělství [online], poslední revize 18. června 2013 [cit. 18. 6. 2013]. Dostupné z: <<http://www.ukzuz.cz/Folders/3928-1-Ekologicke+zemedelstvi.aspx>>.
- [10] Naturalis SK - kontrolná organizácia ekologického poľnohospodárstva [online], poslední revize 18. června 2013 [cit. 18. 6. 2013]. Dostupné z: <<http://www.naturalis.sk/>>.
- [11] Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 203/2012 ze dne 8. března 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 889/2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007, pokud jde o prováděcí pravidla pro ekologickou produkci vína. Úřední věstník Evropské unie, 2012, No. L71, pp. 42-47.
- [12] KEZ O.P.S: Tisková zpráva - ekologické víno [online], poslední revize 21. června 2013 [cit. 21.6.2013]. Dostupné z: <<http://www.kez.cz/node/144>>.
- [13] Nařízení Komise (ES) č. 606/2009 ze dne 10. července 2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o druhy výrobků révy vinné, enologické postupy a omezení, která se na ně používají. Úřední věstník Evropské unie, 2009, No. L193, pp. 1-59.
- [14] Trioli, G. - Hofmann, U.: *Code of good organic viticulture and wine-making - Part of the EU project ORWINE*. Český Těšín: Finidr, s.r.o., 2009, 235 p.
- [15] McGourty, G. T. - Ohmart, J. - Chaney, D.: *Organic winegrowing manual*. Richmond: UCANR Publications, 2011, 192 p. 978-1-60107-563-5.
- [16] Basli, A. - Soulet, S. - Chaher, N. - Mérillon, J.-M. - Chibane, M. - Monti, J.-P. - Richard, T.: Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, vol. 2012, no. pp. 1-14.
- [17] Fernández-Mar, M. I. - Mateos, R. - García-Parrilla, M. C. - Puertas, B. - Cantos-Villar, E.: Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, 2012, vol. 103, no. 4, pp. 797-813.
- [18] Li, F. - Gong, Q. - Dong, H. - Shi, J.: Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 27-33.
- [19] Capuano, E. - Boerrigter-Eenling, R. - van der Veer, G. - van Ruth, S. M.: Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, vol. 93, no. 1, pp. 12-28.
- [20] Callejona, R. M. - Clavijob, A. - Ortigueirac, P. - Troncoso, A. M. - Panequeb, P. - Morales, M. L.: Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Analytica Chimica Acta*, 2010, vol. 660, no. 1-2, pp. 68-75.
- [21] Mulero, J. - Zafrilla, P. - Cayuela, J. M. - Martínez-Cachá, A. - Pardo, F.: Antioxidant activity and phenolic compounds in organic red wine using different winemaking techniques. *Journal of Food Science*, 2011, vol. 76, no. 3, pp. 436-440.
- [22] Bunea, C.-I. - Pop, N. - Babeş, A. C. - Matea, C. - Dulf, F. V. - Bunea, A.: Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal*, 2012, vol. 6, no. pp. 1-19.

- [23] Dani, C. - Oliboni, L. S. - Vanderlinde, R. - Bonatto, D. - Salvador, M. - Henriques, J. A. P.: Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, vol. 45, no. 12, pp. 2574-2580.
- [24] Machado, M. M. - dos Santos Montagner, G. F. F. - Boligon, A. - Athayde, M. L. - da Rocha, M. I. U. M. - Lera, J. P. B. - Belló, C. - da Cruz, I. B. M.: Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*vitis labrusca*) from conventional and organic crops. *Química Nova*, 2011, vol. 34, no. 5, pp. 798-803.
- [25] Mulero, J. - Pardo, F. - Zafrilla, P.: Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 23, no. 6, pp. 569-574.
- [26] Vrček, I. V. - Bojić, M. - Žuntar, I. - Mendaš, G. - Medić-Šarić, M.: Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chemistry*, 2011, vol. 124, no. 1, pp. 354-361.
- [27] Otreba, J. B. - Berghofer, E. - Wendelin, S. - Eder, R.: Polyphenole und anitoxidative Kapazität in österreichischen Weinen aus konventioneller und biologischer Traubenproduktion. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 2006, vol. 56, no. 1-2, pp. 22-32.
- [28] Díaz, C. - Laurie, V. F. - Molina, A. M. - Bücking, M. - Fischer, R.: Characterization of selected organic and mineral components of qvevri wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2013, vol. no. pp. Article in Press.
- [29] Mulero, J. - Pardo, F. - Zafrilla, P.: Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *European Food Research and Technology*, 2009, vol. 229, no. 5, pp. 807-812.
- [30] Yıldırım, H. K. - Akçay, Y. D. - Güvenç, U. - Altındişli, A. - Sözmen, E. Y.: Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. *International Journal of Food Science & Technology*, 2005, vol. 40, no. 2, pp. 133-142.
- [31] Tintunen, S. - Lehtonen, P.: Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of phenolic compounds and spectral data. *European Food Research and Technology*, 2001, vol. 212, no. 3, pp. 390-394.
- [32] Winter, C. K. - Davis, S. F.: Organic foods. *Journal of Food Science*, 2006, vol. 71, no. 9, pp. R117-R124.
- [33] Asami, D. K. - Hong, Y. J. - Barrett, D. M. - A.E., M.: Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no. 5, pp. 1237-1241.
- [34] Tassoni, A. - Tango, N. - Ferri, M.: Comparison of biogenic amine and polyphenol profiles of grape berries and wines obtained following conventional, organic and biodynamic agricultural and oenological practices. *Food Chemistry*, 2013, vol. 139, no. 1-4, pp. 405-413.
- [35] Lante, A. - Crapisi, A. - Lomolino, G. - Spettoli, P.: Chemical parameters, biologically active polyphenols and sensory characteristics of some Italian organic wines. *Journal of Wine Research*, 2004, vol. 15, no. 3, pp. 203-209.
- [36] Corrales, M. - Fernandez, A. - Pinto, M. G. V. - Butz, P. - Franz, C. M. A. P. - Schuele, E. - Tauscher, B.: Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, vol. 48, no. 12, pp. 3471-3476.
- [37] Martin, K. R. - Rasmussen, K. K.: Comparison of sensory qualities of geographically paired organic and conventional red wines from the southwester US wines differing total polyphenol concentration: A randomized pilot study. *Food and Nutrition Science*, 2011, vol. 2, no. 10, pp. 1150-1159.
- [38] Vian, M. A. - Tomao, V. - Coulomb, P. O. - Lacombe, J. M. - Dangles, O.: Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, no. 15, pp. 5230-5235.
- [39] Cozzolino, D. - Holdstock, M. - Damberg, R. G. - Cynkar, W. U. - Smith, P. A.: Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. *Food Chemistry*, 2009, vol. 116, no. 3, pp. 761-765.
- [40] Comuzzo, P. - Rauhut, D. - Werner, M. - Lagazio, C. - Zironi, R.: A survey on wines from organic viticulture from different European countries. *Food Control*, 2013, vol. 34, no. 2, pp. 274-282.
- [41] Koreňovská, M. - Suhaj, M.: Chemometric prediction of wines affiliation with organic and conventional production systems through their elemental profiles. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2012, vol. 51, no. 1, pp. 23-32.
- [42] Provenzano, M. R. - El Bilali, H. - Simeone, V. - Baser, N. - Mondelli, D. - Cesari, G.: Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry*, 2010, vol. 122, no. 4, pp. 1338-1343.

- [43] Turgut, C. - Ornek, H. - Cutright, T. J.: Determination of pesticide residues in Turkey's table grapes: the effect of integrated pest management, organic farming, and conventional farming. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, vol. 173, no. 1-4, pp. 315-323.
- [44] Moeder, M. - Bauer, C. - Popp, P. - van Pinxteren, M. - Reemtsma, T.: Determination of pesticide residues in wine by membrane-assisted solvent extraction and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, vol. 403, no. 6, pp. 1731-1741.
- [45] Henríquez-Aedo, K. - Vega, M. - Prieto-Rodríguez, S. - Aranda, M.: Evaluation of biogenic amines content in Chilean reserve varietal wines. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, vol. 50, no. 8, pp. 2742-2750.
- [46] Soufleros, E. H. - Bouloumpasi, E. - Zotou, A. - Loukou, Z.: Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, 2007, vol. 101, no. 2, pp. 704-716.
- [47] Yildirim, H. K. - Üren, A. - Yücel, U.: Evaluation of Biogenic Amines in Organic and Non-Organic Wines by HPLC OPA Derivatization. *Food Technology and Biotechnology*, 2007, vol. 45, no. 1, pp. 62-68.
- [48] García-Marino, M. - Trigueros, Á. - Eschribano-Bailón, T.: Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 23, no. 5, pp. 455-462.
- [49] Micelli, A. - Negro, C. - Tommasi, L. - De Leo, P.: Polyphenols, resveratrol, antioxidant activity and ochratoxin A contamination in red table wines, controlled denomination of origin (DOC) wines and wines from organic farming. *Journal of Wine Research*, 2003, vol. 14, no. 2-3, pp.
- [50] Remiro, R. - González-Peñas, E. - Lizarraga, E. - de Cerain, A. L.: Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines. *Food Control*, 2012, vol. 27, no. 1, pp. 139-145.
- [51] Konvalina, P. - Moudrý, J. - Kalinová, J. - Capouchová, I. - Stehno, Z.: *Pěstování obilnin a pseudoobilnin v ekologickém zemědělství*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích - Zemědělská fakulta, 2008, 62 s. ISBN 978-80-7394-116-1.
- [52] Konvalina, P. - Capouchová, I. - Stehno, Z. - Káš, M. - Janovská, D. - Škeřková, A. - Moudrý, J.: *Pěstování a využití pšenice špaldy v ekologickém zemědělství - metodiky pro praxi*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2012, 40 p. ISBN 978-80-7427-118-2.
- [53] Smith, J. - Charter, E.: *Functional Food Product Development*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011, 528 p. 978-1-4051-7876-1.
- [54] Konvalina, P. - Capouchová, I. - Stehno, Z. - Moudrý, J. - Moudrý, J.: *Volba druhu a odrůdy pšenice v ekologickém zemědělství (certifikovaná metodika)*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích - Zemědělská fakulta, 2010, 41 s. ISBN 978-80-7394-230-4.
- [55] Escarnot, E. - Jacquemin, J.-M. - Agneessens, R. - Paquot, M.: Comparative study of the content and profiles of macronutrients in spelt and wheat, a review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2012, vol. 16, no. 2, pp. 243-256.
- [56] Ruibal-Mendieta, N. L. - Delacroix, D. L. - Mignolet, E. - Pycke, J.-M. - Marques, C. - Rozenberg, R. - Petitjean, G. - Habib-Jiwan, J.-L. - Meurens, M. - Quetin-Leclercq, J. - Delzenne, N. M. - Larondelle, Y.: Spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no. 7, pp. 2751-2759.
- [57] Troccoli, A. - Codianni, P.: Appropriate seeding rate for einkorn, emmer, and spelt grown under rainfed condition in southern Italy. *European Journal of Agronomy*, 2005, vol. 22, no. 3, pp. 293-300.
- [58] Janovská, D. - Stehno, Z.: Produkce osiv hlavních obilnin v ekologickém zemědělství. *Úroda*, 2010, vol. 58, no. 3, pp. 36-40.
- [59] Directorate General for Health & Consumers: Spelt varieties - Agricultural species [online], poslední revize 27.června 2013 [cit. 27.6.2013]. Dostupné z: <<http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/database/public/index.cfm?event=RunSearch>>.
- [60] Biffi, R. - Munari, M. - Dioguardi, L. - Ballabio, C. - Cattaneo, A. - Galli, C. L. - Restani, P.: Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market, 2001-02. *Food Additives & Contaminants*, 2004, vol. 21, no. 6, pp. 586-591.
- [61] Edwards, S. G.: *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2009, vol. 26, no. 4, pp. 496-506.
- [62] Edwards, S. G.: *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional barley. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2009, vol. 26, no. 8, pp. 1185-1190.
- [63] Juan, C. - Ritieni, A. - Mañes, J.: Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 3, pp. 1747-1755.
- [64] Solarska, E. - Kuzdraliński, A. - Marzec, M.: Toxicogenic fungi and mycotoxins in organic spelt and its products. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. 168-177.

- [65] Suchowilska, E. - Kandler, W. - Sulyok, M. - Wiwart, M. - Krska, R.: Mycotoxin profiles in the grain of *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum* and *Triticum spelta* after head infection with *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, vol. 90, no. 4, pp. 556-565.
- [66] Zorb, C. - Langenkamper, G. - Betsche, T. - Niehaus, K. - Barsch, A.: Metabolite profiling of wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from organic and conventional agriculture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, no. 21, pp. 8301-8306.
- [67] Zorb, C. - Niehaus, K. - Barsch, A. - Langenkamper, G.: Levels of compounds and metabolites in wheat ears and grain in organic and conventional agriculture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, no. 20, pp. 9555-9562.
- [68] Zorb, C. - Betsche, T. - Langenkamper, G.: Search for diagnostic proteins to prove authenticity of organic wheat grains (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, no. 7, pp. 2932-2937.
- [69] Ryan, M. H. - Derrick, J. W. - Dann, P. R.: Grain minerals concentration and yield of wheat grown under organic and conventional management. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, vol. 84, no. 3, pp. 207-216.
- [70] Laursen, K. H. - Schjoerring, J. K. - Olesen, J. E. - Askegaard, M. - Halekoh, U. - Husted, S.: Multielemental fingerprinting as a tool for authentication of organic wheat, barley, faba bean, and potato. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 9, pp. 4385-4396.
- [71] Vrček, V. - Vrček, I. I.: Metals in organic and conventional wheat flours determined by an optimised and validated ICP-MS method. *Journal of Food Science & Technology*, 2012, vol. 47, no. 8, pp. 1777-1783.
- [72] Směrnice Rady 2001/112/ES ze dne 20. prosince 2001 o ovocných šťávách a některých podobných produktech určených k lidské spotřebě. Úřední věstník Evropské unie, No. L10, pp. 471-479.
- [73] Sinha, N. K. - Sidhu, J. S. - Barta, J. - Wu, J. S. B. - Cano, M. P.: *Handbook of fruits and fruit processing*. 1st ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2012, 727 p. ISBN 978-0-8138-0894-9.
- [74] Brody, A. L. - Strupinsky, E. P. - Kline, L. R.: *Active packaging for food applications*. 2nd ed. Oxford: Taylor & Francis, 2010, 236 p. ISBN 978-1-58716-045-5.
- [75] Arvanitoyannis, I. S.: *Modified atmosphere and active packaging technologies*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2012, 806 p. ISBN 978-1-4398-0044-7.
- [76] Han, J. H.: *Innovations in food packaging*. 1st ed. New York: Elsevier, 2005, 536 p. ISBN 978-0-12-311632-1.
- [77] García-Tores, R. - Ponagandla, N. R. - Rouseff, R. L. - Goodrich-Schneider, R. M. - Reyes-De-Corcuera, J. I.: Effects of dissolved oxygen in fruit juices and methods of removal. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, vol. 8, no. 4, pp. 409-423.
- [78] Eissa, A. A.: *Structure and function of food engineering*. 1st ed. Rijeka: InTech, 2012, 414 p. ISBN 978-953-51-0695-1.
- [79] Torres, B. - Tiwari, B. K. - Patras, A. - Cullen, P. J. - Brunton, N. - O'Donnell, C. P.: Stability of anthocyanins and ascorbic acid of high pressure processed blood orange juice during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2011, vol. 12, no. 2, pp. 93-97.
- [80] Ryan, L. - Prescott, S. L.: Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to and *in vitro* digestion. *International Journal of Food Sciences & Technology*, 2010, vol. 45, no. 6, pp. 1191-1197.
- [81] Van Bree, I. - Baetens, J. M. - Samapundo, S. - Cevlieghere, F. - Laleman, R. - Vandekinderen, I. - Nosedá, B. - Xhaferi, R. - De Baets, B. - De Meulenaer, B.: Modelling the degradation kinetics of vitamin C in fruit juice in relation to the initial headspace oxygen concentration. *Food Chemistry*, 2012, vol. 134, no. 1, pp. 207-214.
- [82] Igual, M. - García-Martínez, E. - Camacho, M. M. - Martínez-Navarrete, N.: Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 2010, vol. 118, no. 2, pp. 291-299.
- [83] Velázquez-Estrada, R. M. - Hernández-Herrero, M. M. - Rüfer, C. E. - Guamis-López, B. - Roig-Sagués, A. X.: Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, vol. 18, no. 1, pp. 89-94.
- [84] Bacigulapi, C. - Lemaistre, M. H. - Boutroy, N. - Bunel, C. - Peyron, S. - Guillard, V. - Chalier, P.: Changes in nutrition and sensory properties of orange juice packed in PET bottles: An experimental and modelling approach. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 4, pp. 3827-3836.
- [85] Zerdin, K. - Rooney, M. - Vermuë, J.: The vitamin C content of orange juice packed in and oxygen scavenger material. *Food Chemistry*, 2003, vol. 82, no. 3, pp. 387-395.
- [86] Ros-Chumillas, M. - Belissario, Y. - Iguaz, A. - López, A.: Quality and shelf life of orange juice aseptically packaged in PET bottles. *Journal of Food Engineering*, 2007, vol. 79, no. 1, pp. 234-242.

- [87] Aday, M. S. - Caner, C.: The shelf life extension of fresh strawberries using an oxygen absorber in the biobased package *LWT - Food Science and TEchnology*, 2013, vol. 52, no. 2, pp. 102-109.
- [88] Aday, M. S. - Caner, C. - Rahvali, F.: Effect of oxygen and carbon dioxide absorbers on strawberry quality. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, vol. 62, no. 2, pp. 179-187.
- [89] Anonymous: *Kolektiv autorů. Metody a kritéria pro ověřování autenticity potravin a potravinářských surovin*. 1. vyd. Ostrava: KEY Publishing s. r. o., 2011, 70 s. ISBN 978-80-7418-124-5.
- [90] Weil, J. A. - Bolton, J. R.: *Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and practical applications*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007, 687 p. ISBN 9780471754961.
- [91] Brustolon, M. - Giamello, E.: *Electron paramagnetic resonance: a practitioner's toolkit*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009, 553 p. ISBN 9780470258828.
- [92] Gerson, F. - Huber, W.: *Electron spin resonance spectroscopy of organic radicals*. 1st ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, 464 p. ISBN 3527302751.
- [93] Pelikán, P. - Staško, A.: *EPR spektroskopie. Interní skripta Chemickotechnologické fakulty pro postgraduální studium*. 1. vyd. Bratislava: SVŠT Bratislava, 1989, 89.
- [94] González, P. M. - Aguiar, M. B. - Malanga, G. - Puntarulo, S.: Electronic paramagnetic resonance (EPR) for the study of ascorbyl radical and lipid radicals in marine organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, vol. 165, no. 4, pp. 439-447.
- [95] Eaton, G. R. - Eaton, S. S. - Barr, D. P. - Weber, R. T.: *Quantitative EPR*. Wien: Springer, 2010, 185 p. ISBN 978-3-211-92947-6.
- [96] Berliner, L. J. - Khramtsov, V. - Fujii, H. - Clanton, T. L.: Unique in vivo applications of spin traps. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, vol. 30, no. 5, pp. 489-499.
- [97] Šťavíková, L.: *Charakterizace vlastností extraktů z hroznových bobulí pomocí moderních analytických metod. Dizertační práce*. Brno: VUT, FCH, 2010, 109 s.
- [98] Chatgililoglu, C. - Studer, A.: *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials, Volume 1*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, 2324 p. ISBN 978-0-470-97125-3.
- [99] Wilcox, C. S. - Pearlman, A.: Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacological Reviews*, 2008, vol. 60, no. 4, pp. 418-469.
- [100] Stimson, L. - Dong, L. - Karttunen, M. - Wisniewska, A. - Dutka, M. - Róg, T.: Stearic acid spin labels in lipid bilayers: insight through atomistic simulations. *The Journal of Physical Chemistry*, 2007, vol. 111, no. 43, pp. 12447-12453.
- [101] D Jordanov, N. - Rangelova, K.: Quantitative electron paramagnetic resonance and spectrophotometric determination of the free radical 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2000, vol. 56, no. 2, pp. 373-378.
- [102] Vislisel, J. M. - Schafer, F. Q. - Buettner, G. R.: A simple and sensitive assay for ascorbate using a plate reader. *Analytical Biochemistry*, 2007, vol. 365, no. 1, pp. 31-39.
- [103] Miéville, P. - Ahuja, P. - Sarkar, R. - Jannin, S. - Vasos, P. R. - Gerber-Lemaire, S. - Mishkovsky, M. - Comment, A. - Gruetter, R. - Ouari, O. - Tordo, P. - Bodenhausen, G.: Scavenging free radicals to preserve enhancement and extend relaxation times in NMR using dynamic nuclear polarization. *Angewandte Chemie*, 2010, vol. 122, no. 35, pp. 6318-6321.
- [104] Bourassa, M. G. - Tardif, J.-C.: *Antioxidants and cardiovascular disease*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2006, 459 p. ISBN 387295526.
- [105] Wilcox, C. S.: Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacology & Therapeutics*, 2010, vol. 126, no. 2, pp. 119-145.
- [106] Thaler, S. - Fiedorowicz, M. - Rejdak, R. - Chorągiewicz - Sulejczak, D. - Zarnowski, T. - Zrenner, E. - Grieb, P. - Schuettaut, F.: Neuroprotective effects of tempol on retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model with and without iron load. *Experimental Eye Research*, 2010, vol. 90, no. 2, pp. 254-260.
- [107] Mettler, F. A. - Brenner, D. - Coleman, C. N. - Kaminski, J. M. - Kennedy, A. R. - Wagner, L. K.: Can radiation risks to patients be reduced without reducing radiation exposure? The status of chemical radioprotectants. *American Journal of Roentgenology*, 2011, vol. 196, no. 3, pp. 616-618.
- [108] Kudo, W. - Yamato, M. - Yamada, K.-I. - Kinoshita, Y. - Shiba, T. - Watanabe, T. - Utsumi, H.: Formation of TEMPOL-hydroxylamine during reaction between TEMPOL and hydroxyl radical: HPLC/ECD study. *Free Radical Research*, 2008, vol. 42, no. 5, pp. 505-512.
- [109] Chonpathompikunlert, P. - Han, J. - Toh, K. - Isoda, H. - Nagasaki, Y.: TEMPOL protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell toxicity. *European Journal of Pharmacology*, 2011, vol. 650, no. 2-3, pp. 544-549.
- [110] Abdallah, D. M. - El-Abhar, H. S. - Abdel-Aziz, D. H.: TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion: a key role for superoxide anion. *European Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 603, no. 1-3, pp. 93-97.

- [111] Ramachandran, L. - Nair, C. K. K.: Prevention of γ -radiation induced cellular genotoxicity by tempol: Protection of hematopoietic system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, vol. 34, no. 2, pp. 253-262.
- [112] Brezová, V. - Polovka, M. - Staško, A.: The influence of additives on beer stability investigated by EPR spectroscopy *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2002, vol. 58, no. 6, pp. 1279-1291.
- [113] Simonsen, U. - Christensen, F. H. - Buus, N. H.: The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, vol. 122, no. 2, pp. 109-124.
- [114] Moad, G. - Solomon, D. H.: *The chemistry of radical polymerization*. Oxford: ELSEVIER Ltd., 2006, 639 p. ISBN 978-0-08-044286-0.
- [115] Bartoszek, M. - Polak, J.: An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. *Food Chemistry*, 2012, vol. 132, no. 4, pp. 2089-2093.
- [116] Polak, J. - Bartoszek, M. - Stanimirova, I.: A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 3, pp. 3042-3049.
- [117] Weselucha-Birczyńska, A. - Łabanowska, M. - Kurdziel, M. - Filek, M.: Resonance Raman and EPR spectroscopy studies of untreated spring wheat leaves. *Vibrational Spectroscopy*, 2012, vol. 60, no. 1, pp. 113-117.
- [118] Mishra, K. - Ojha, H. - Chaudhury, N. K.: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 2012, vol. 130, no. 4, pp. 1036-1043.
- [119] Locatelli, M. - Gindro, R. - Travaglia, F. - Coisson, J.-D. - Rinaldi, M. - Arlorio, M.: Study of the DPPH[•]-scavenging activity: Development of a free software the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 2009, vol. 114, no. 3, pp. 889-897.
- [120] Milardović, A. - Ivokovic, D. - Grabarić, B. S.: A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Biochemistry*, 2006, vol. 68, no. 2, pp. 175-180.
- [121] Charles, D. J.: *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. New York: Springer, 2013, 610 p. ISBN 978-1-4614-4309-4.
- [122] Lu, J. - Li, C. - Chai, Y.-F. - Yang, D.-Y. - Sun, C.-R.: The antioxidant effect of imine resveratrol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, vol. 22, no. 17, pp. 5744-5747.
- [123] Floegel, A. - Kim, D. O. - Chung, S.-J. - Koo, S. I. - Chun, O. K.: Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, vol. 24, no. 7, pp. 1043-1048.
- [124] Alam, M. N. - Bristi, N. J. - Rafiquzzaman, M.: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2013, vol. 21, no. 2, pp. 143-152.
- [125] Yordanov, N.: Is our knowledge about the chemical and physical properties of DPPH enough to consider it as a primary standard for quantitative EPR spectrometry? . *Applied Magnetic Resonance*, 1996, vol. 10, no. 1-3, pp. 339-350.
- [126] Noipa, T. - Srijaranai, S. - Tuntulani, T. - Ngeontae, W.: New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no. 3, pp. 798-806.
- [127] Prevc, T. - Šegatin, N. - Ulrih, N. P. - Cigić, B.: DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 2013, vol. 109, no. 1, pp. 13-19.
- [128] Fidler, M. - Kolářová, L.: Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*, 2009, vol. 103, no. 3, pp. 232-235.
- [129] Musa, K. H. - Abdullah, A. - Kuswandi, B. - Hidayat, M. A.: A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 4, pp. 4102-4106.
- [130] Dawidowicz, A. L. - Wianowska, D. - Olszowy, M.: On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 2012, vol. 131, no. 3, pp. 1037-1043.
- [131] Osman, A. M. - Wong, K. K. Y. - Fernyhough, A.: ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, vol. 346, no. 1, pp. 321-329.
- [132] Chen, X. - Challier, L. - Etcheberry, A. - Noël, V. - Perez, H.: The ABTS-HRP system as an alternative method to RRDE for the determination of the selectivity of the oxygen reduction reaction. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012, vol. 7, no. 7, pp. 6247-6264.
- [133] Kadnikova, E. N. - Kostić, N. M.: Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass: Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, vol. 18, no. 1-3, pp. 39-48.
- [134] Brainina, K. Z. - Ivanova, A. V. - Sharafutdinova, E. N. - Lozovskaya, E. L. - Shkarina, E. I.: Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation. *Talanta*, 2007, vol. 71, no. 1, pp. 13-18.

- [135] Jia, S. M. - Liu, X.-F. - Kong, D. M. - Shen, H.-X.: A simple, post-additional antioxidant capacity assay using adenosine triphosphate-stabilized 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation in a G-quadruplex DNAzyme catalyzed ABTS-H₂O₂ system. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, vol. 35, no. 1, pp. 407-412.
- [136] Durmaz, G.: Freeze-dried ABTS^{•+} method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chemistry*, 2012, vol. 4, no. 15, pp. 1658-1663.
- [137] Serpena, A. - Gökmena, V. - Fogliano, V.: Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 2012, vol. 90, no. 1, pp. 60-65.
- [138] Guedes, A. C. - Amaro, H. M. - Gião, M. S. - Malcata, F. X.: Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*, 2013, vol. 138, no. 1, pp. 638-643.
- [139] Zhou, K. - Yin, J.-J. - Yu, L.: ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chemistry*, 2005, vol. 95, no. 3, pp. 446-457.
- [140] Bayoumi, W. A. - Elsayed, M. A.: Synthesis of new phenylcarbamoylbenzoic acid derivatives and evaluation of their in vitro antioxidant activity. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, vol. 21, no. 8, pp. 1633-1640.
- [141] Moreira, F. T. C. - Guerreiro, J. R. L. - Barros, R. - Sales, M. G. F.: The effect of method, standard and sample components on the total antioxidant capacity of commercial waters assessed by optical conventional assays. *Food Chemistry*, 2012, vol. 134, no. 1, pp. 564-571.
- [142] Rosen, G. M. - Britigan, B. E. - Halpern, H. J. - Pou, S.: *Free radicals: biology and detection by spin trapping*. 1st ed. Oxford: Oxford University Press, 1999, 482 p. ISBN 0195095057.
- [143] Faure, A. M. - Andersen, M. L. - Nyström, L.: Ascorbic acid induced degradation of beta-glucan: Hydroxyl radicals as intermediates studied by spin trapping and electron spin resonance spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 2012, vol. 87, no. 3, pp. 2160-2168.
- [144] Nakajima, A. - Matsuda, E. - Masuda, Y. - Sameshima, H. - Ikenoue, T.: Characteristics of the spin-trapping reaction of a free radical derived from AAPH: further development of the ORAC-ESR assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, vol. 403, no. 7, pp. 1961-1970.
- [145] Hougaard, A. B. - Arneborg, N. - Andersen, M. L. - Skibsted, L. H.: ESR spin trapping for characterization of radical formation in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Listeria innocua*. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, vol. 94, no. 3, pp. 205-212.
- [146] Faure, A. M. - Münger, L. H. - Nyström, L.: Potential inhibitors of the ascorbate-induced β -glucan degradation. *Food Chemistry*, 2012, vol. 134, no. 1, pp. 55-63.
- [147] Hawkins, C. L. - Davies, M. J.: Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2013, vol. Article in Press, no. pp.
- [148] Wang, Z. - ma, W. - Chen, C. - Ji, H. - Zhao, J.: Probing paramagnetic species in titania-based heterogeneous photocatalysis by electron spin resonance (ESR) spectroscopy—A mini review. *Chemical Engineering Journal*, 2011, vol. 170, no. 2-3, pp. 353-362.
- [149] Murphy, D. M. - Gilbert, B. C. - Chechik, V.: *Electron paramagnetic resonance: volume 22*. 1st ed. Cambridge: RSC Publishing, 2010, 194 p. ISBN 978-1-84755-061-3
- [150] Abele, D. - Vazquez-Medina, J. P. - Zenteno-Savin, T.: *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011, 548 p. ISBN 978-1-4443-3548-4.
- [151] Pryor, W. A.: *Bio-assays for oxidative stress status (BOSS)*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2001, 296 p. ISBN 0-444-50957-7.
- [152] Han, S. K. - Hwang, T.-M. - Yoon, Y. - Kang, J.-W.: Evidence of singlet oxygen and hydroxyl radical formation in aqueous goethite suspension using spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR). *Chemosphere*, 2011, vol. 84, no. 8, pp. 1095-1101.
- [153] Raaman, N.: *Phytochemical techniques*. 1st ed. New Dehli: New India Publishing, 2006, 318 p. ISBN 8189422308.
- [154] Burtis, C. A. - Ashwood, E. R. - Bruns, D. E. - Tietz, N. W.: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008, 952 p. ISBN 9781437719406.
- [155] Carl A. Burtis - Edward R. Ashwood: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 1998, 1917 p. ISBN 0-7216-5610-2.
- [156] HeiN, H. - Kunze, W.: *Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie: von der Laborgestaltung bis zur Dateninterpretation*. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH &Co, 2004, 302 p. ISBN 352730780X.
- [157] Anderson, R. J. - Bendell, D. J. - Groundwater, P. W.: *Organic spectroscopic analysis: tutorial chemistry texts – volume 22*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004, 176 p. 0854044760.
- [158] Burns, D. A. - Ciuzczak, E. W.: *Handbook of near-infrared analysis*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press INC., 2008, 808 p. ISBN 084937393X.

- [159] 6.1 Waves and electromagnetic radiation, In: General chemistry: principles, patterns, and applications [online], poslední revize 24. března 2013 [cit. 30. 7. 2013]. Dostupné z: <http://2012books.lardbucket.org/books/general-chemistry-principles-patterns-and-applications-v1.0/section_10_01.html>.
- [160] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 8086369072.
- [161] Milata, V. - Ségľa, P.: *Spektrálne metódy v chémii: edícia vysokoškolských učebníc*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2003, 327 s. ISBN 8022720496.
- [162] Rouessac, F. - Rouessac, A.: *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013, 600 p. ISBN 9781118681879.
- [163] Mellon, M. G.: *Analytical absorption spectroscopy*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007, 636 p. ISBN 1406751707.
- [164] Turro, N. J. - Ramamurthy, V. - Scaiano, J. C.: *Principle of molecular photochemistry: an introduction*. 1st ed. New Jersey University Science Books, 2009, 495 p. ISBN 9781891389573.
- [165] Yadav, L. D. S.: *Organic spectroscopy*. 1st ed. New Delhi Kluwer Academic Publishers, 2005, 324 p. ISBN 1402025742.
- [166] Paulová, H. - Bochořáková, H. - Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*, 2004, vol. 98, no. 4, pp. 174-179.
- [167] Wiseman, S. A. - Balentine, D. A. - Frei, B.: Antioxidants in tea. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 1997, vol. 37, no. 8, pp. 705-718.
- [168] Das, A. - Raychaudhuri, U. - Chakraborty, R.: Cereal based functional food of Indian subcontinents: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 49, no. 6, pp. 665-672.
- [169] Niki, E.: Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, vol. 49, no. 4, pp. 503-515.
- [170] Ikawa, M. - Schaper, T. D. - Dollard, C. A. - Sasner, J. J.: Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no. 7, pp. 1811-1815.
- [171] Queiroz, F. R. - Paviani, V. - Coelho, F. R. - Marques, E. - Di Mascio, P. - Augusto, O.: The carbonylation and covalent dimerization of human Superoxide Dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity is inhibited by the radical scavenger tempol. *Biochemical Journal*, 2013, vol. no. pp.
- [172] dos Santos, A. - Siqueira Silva, D. H. - da Silva Bolzani, V. - Santos, L. Á. - Schmidt, T. M. - Baffa, O.: Antioxidant properties of plant extracts: an EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and spin trap DMPO. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2009, vol. 20, no. 8, pp. 1483-1492.
- [173] Amaral, J. H. - Montenegro, M. F. - Pinheiro, L. C. - Ferreira, G. C. - Barroso, R. P. - Costa-Filho, A. J. - Tanus-Santos, J. E.: TEMPOL enhances the antihypertensive effects of sodium nitrite by mechanisms facilitating nitrite-derived gastric nitric oxide formation. *Free Radical Biology & Medicine*, 2013, vol. no. pp.
- [174] Alvarez-Suarez, J. M. - Giampieri, F. - CGonzález-Paramás, A. M. - Damiani, E. - Astolfi, P. - Martinez-Sanchez, G. - Bompadre, S. - Quiles, J. L. - Santos-Buelga, C. - Battino, M.: Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, vol. 50, no. 5, pp. 1506-1516.
- [175] Özyürek, M. - Güçlü, K. - Apak, R.: The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TfAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, vol. 30, no. 4, pp. 652-664.
- [176] Noipa, T. - Srijaranai, S. - Tuntulani, T. - Ngeontae: New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no. 3, pp. 758-806.
- [177] Behgar, M. - Ghasemi, S. - Naserian, A. - Fatollohi, H.: Gamma radiation effects on phenolics, antioxidants activity and *in vitro* digestion of pistachio (*Pistachia vera*) hull. *Radiation Physics and Chemistry*, 2011, vol. 80, no. 9, pp. 963-967.
- [178] Hajaji, H. E. - Lachkar, N. - Alaoui, K. - Cherrah, Y. - Farah, A. - Ennabili, A. - El Bali, B. - Lachkar, M.: Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of Carob tree leaves from Morocco. *Record of Natural Products*, 2010, vol. 4, no. 4, pp. 193-204.
- [179] Bouayed, J. - Hoffman, L. - Bohn, T.: Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 2011, vol. 128, no. 1, pp. 14-21.
- [180] Vongsak, B. - Sithisam, P. - Mandmool, S. - Thongpraditchote, S. - Wongkrajang, Y. - Gritsanapan, W.: Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 44, no. -, pp. 566-571.

- [181] Hossain, M. A. - Rahman, S. M. M.: Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no. 3, pp. 672-676.
- [182] Bonvehí, J. S. - Gutiérrez, A. L.: Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, vol. 88, no. 9, pp. 1387-1395.
- [183] Jiang, P. - Burczynski, F. - Campbell, C. - Pierce, G. - Austria, J. A. - Briggs, C. J.: Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 2007, vol. 40, no. 3, pp. 356-364.
- [184] Francescato, L. N. - Debenedetti, S. L. - Schwanz, T. G. - Bassani, V. L. - Henriques, A. T.: Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification *Talanta*, 2013, vol. 105, no. -, pp. 192-203.
- [185] Wang, Q. - Ao, W. - Tai, W.: Simultaneous Determination of Seven Flavonoids in Aerial Parts of *Artemisia frigida* by HPLC *Chinese Herbal Medicines*, 2012, vol. 4, no. 3, pp. 252-258.
- [186] Engida, A. M. - Kasim, N. S. - Tsigie, Y. A. - Ismadji, S. - Huynh, L. H. - Ju, Y.-H.: Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*) *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 41, no. -, pp. 392-396.
- [187] Bae, H. - Jayaprakasha, G. K. - Jifon, J. - Patil, B. S.: Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers *Food Chemistry*, 2012, vol. 130, no. 3, pp. 751-758.
- [188] Versari, A. - du Toit, W. - Parpinello, G. P.: Oenological tannins: a review. *Australian Journal of Grape and Wine research*, 2013, vol. 19, no. 1, pp. 1-10.
- [189] Khandelwal, S. - Udipi, S. A. - Ghure, P.: Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 2010, vol. 43, no. 2, pp. 526-530.
- [190] Komes, D. - Belščak-Cvitanović, A. - Škrabal, S. - Vojvodić, A. - Bušić, A.: The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. *LWT - Food Science and Technology*, 2013, vol. 53, no. 1, pp. 360-369.
- [191] Gunaratne, A. - Wu, K. - Li, D. - Bentota, A., Corke, H., - Cai, Y.-Z.: Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry*, 2013, vol. 138, no. 2-3, pp. 1153-1161.
- [192] Araritsas, P.: Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 2012, vol. 135, no. 3, pp. 1708-1717.
- [193] Cheok, C. Y. - Chin, N. L. - Yusof, Y. A. - Law, C. L.: Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 50, no. 1, pp. 1-7.
- [194] Golmohamadi, A. - Möllera, G. - Powersb, J. - Nindo, C.: Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, vol. 20, no. 5, pp. 1316-1323.
- [195] Lachman, J. - Hamouz, K. - Orsák, M. - Pivec, V. - Hejtmáková, K. - Pazderů, K. - Dvořák, P. - Čepi, J.: Impact of selected factors – Cultivar, storage, cooking and baking on the content of anthocyanins in coloured-flesh potatoes. *Food Chemistry*, 2012, vol. 133, no. 4, pp. 1107-1116.
- [196] Holasová, M. - Fiedlerova, V.: Porovnání metod stanovení antioxidační aktivity v ovocných a zeleninových šťávách. *Chemické listy*, 2011, vol. 105, no. Laboratorní přístroje a postupy, pp. 766-772.
- [197] Bobinaitė, R. - Viškelis, P. - Venskutonis, P. R.: Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 2012, vol. 132, no. 3, pp. 1495-1501.
- [198] Min, B. - Gu, L. - McClung, A. M. - Bergman, C. J. - Chen, M.-H.: Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chemistry*, 2012, vol. 133, no. 3, pp. 715-722.
- [199] Nour, V. - Stampar, F. - Veberic, R. - Jakopic, J.: Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 2, pp. 961-966.
- [200] Crecente.Campo, J. - Nunes-Damaceno, M. - Romero-Rodríguez, M. A. - Vázquez-Odériz, M. L.: Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch, cv Selva). *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, vol. 28, no. 1, pp. 23-30.
- [201] de Carvalho, L. M. J. - Gomes, P. B. - de Oliveira Godoy, R. L. - Pacheco, S. - do Monte, P. H. F. - de Carvalho, J. L. V. - Nutti, M. R. - Neves, A. C. L. - Vieira, A. C. R. A. - Ramos, S. R. R.: Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 2012, vol. 47, no. 2, pp. 337-340.
- [202] Li, W. - Beta, T.: An evaluation of carotenoid levels and composition of glabrous canaryseed. *Food Chemistry*, 2012, vol. 133, no. 3, pp. 782-786.

- [203] Andersson, S. C. - Rumpunen, K. - Johansson, E. - Olsson, M. E.: Carotenoid content and composition in rose hips (*Rosa* spp.) during ripening, determination of suitable maturity marker and implications for health promoting food products. *Food Chemistry*, 2011, vol. 128, no. 3, pp. 689-696.
- [204] Guiuffrida, D. - Dougo, P. - Torre, G. - Bignardi, C. - Cavazza, A. - Corradini, C. - Dougo, G.: Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry*, 2013, vol. 140, no. 4, pp. 794-802.
- [205] TKao, T. H. - Loh, C. H. - Inbaraj, B. S., Chen, B. H.: Determination of carotenoids in *Taraxacum formosanum* by HPLC-DAD-APCI-MS and preparation by column chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, vol. 66, no. 1, pp. 144-153.
- [206] Chaovanalikit, A. - Wrolstad, R. E.: Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 2004, vol. 69, no. 1, pp. FC67-FC72.
- [207] Zin, Z. M. - Hamid, A. A. - Osman, A. - Saari, N.: Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemistry*, 2006, vol. 94, no. 2, pp. 169-178.
- [208] Chyau, C.-C. - Tsai, S.-Y. - Ko, P.-T. - Mau, J.-L.: Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Chemistry*, 2002, vol. 78, no. 4, pp. 483-488.
- [209] Re, R. - Pellegrini, N. - Proteggente, A. - Pannala, A. - Yang, M. - Rice-Evans, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol. 26, no. 9-10, pp. 1231-1237.
- [210] Arnao, M. B.: Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trend in Food Science & Technology*, 2000, vol. 11, no. 11, pp. 419-421.
- [211] Kedare, S. B. - Singh, R. P.: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 2012, vol. 48, no. 4, pp. 412-422.
- [212] Polovka, M. - Šťavíková, L. - Hohnová, B. - Karásek, P. - Roth, M.: Offline combination of pressurized fluid extraction and electron paramagnetic resonance spectroscopy for antioxidant activity of grape skin extracts assessment. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no. 51, pp. 7990-8000.
- [213] Staško, A. - Polovka, M. - Brezová, V. - Biskupič, S. - Malík, F.: Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study). *Food Chemistry*, 2006, vol. 96, no. 2, pp. 185-196.
- [214] Zalibera, M. - Rapta, P. - Staško, A. - Brindzová, L. - Brezová, V.: Thermal generation of stable SO₄^{•-} spin trap adducts with super-hyperfine structure in their EPR spectra: An alternative EPR spin trapping assay for radical scavenging capacity determination in dimethylsulphoxide. *Free Radical Research*, 2009, vol. 43, no. 5, pp. 459-469.
- [215] Salar, R. K. - Certik, M. - Brezová, V. - Brlejšová, M. - Hanusová, V. - Breierová, E.: Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. *3 Biotech*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 53-60.
- [216] Šťavíková, L. - Polovka, M. - Hohnová, B. - Karásek, P. - Roth, M.: Antioxidant activity of grape skin aqueous extracts from pressurized hot water extraction combined with electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, 2011, vol. 85, no. 4, pp. 2233-2240.
- [217] Kogan, G. - Staško, A. - Bauerová, K. - Polovka, M. - Šoltés, L. - Brezová V. - Navarová, J., Mihalová, D.: Antioxidant properties of yeast (1→3)-β-D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. *Carbohydrate Polymers*, 2005, vol. 61, no. 1, pp. 18-28.
- [218] Sedej, I. - Sakač, M. - Mandić, A. - Mišan, A. - Tumbas, V. - Hadnađev, M.: Assessment of antioxidant activity and rheological properties of wheat and buckwheat milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 2011, vol. 54, no. 3, pp. 347-353.
- [219] Heimler, D. - Vignolini, P. - Isolani, L. - Arfaioli, P. - Ghiselli, L. - Romani, A.: Polyphenol content of modern and old varieties of *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. grains in two years of production. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, no. 12, pp. 7329-7334.
- [220] Konopka, I. - Tańska, M. - Faron, A. - Stępień, A. - Wojtkowiak, K.: Comparison of the phenolic compounds, carotenoids and tocopherols content in wheat grain under organic and mineral fertilization regimes. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 10, pp. 12341-12356.
- [221] Langenkämper, G. - Zörb, C. - Seifert, M. - Mäder, P. - Fretzdorff, B. - Betsche, T.: Nutritional quality of organic and conventional wheat. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2006, vol. 80, no. 2, pp. 150-154.
- [222] Żuchowski, J. - Kapusta, I. - Szajwaj, B. - Jończyk, K. - Oleszek, W.: Phenolic acid content of organic and conventionally grown winter wheat. *Cereal Research Communications*, 2009, vol. 37, no. 2, pp. 189-197.
- [223] Guo, X.-D. - Ma, Y.-J. - Parry, J. - Gao, J.-M. - Yu, L.-L. - Wang, M.: Phenolics content and antioxidant activity of tertiary buckwheat from different locations. *Molecules*, 2011, vol. 16, no. 12, pp. 9850-9867.

- [224] Ismael, D. S. - Timoracká, M. - Vollmannová, A. - Árvay, J.: Influence of variety, locality and soil contamination on total polyphenol content and antioxidant activity of fababean grains. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 2012, vol. 1, no. 2S, pp. 931-941.
- [225] Gasztonyi, M. N. - Farkas, R. T. - Berki, M. - Petróczi, I. M.: Content of phenols in wheat as affected by varietal and agricultural factors. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 24, no. 6, pp. 785-789.
- [226] Dinelli, G. - Maroti, I. - Di Silvestro, R. - Bosi, S. - Bregola, V. - Accorsi, M. - Di Loreto, A. - Benedettelli, S. - Ghiselli, L.: Agronomic, nutritional and nutraceutical aspects of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars under low input agricultural management. *Italian Journal of Agronomy*, 2013, vol. 8, no. 12, pp. 85-93.
- [227] Stracke, B. A. - Eitel, J. - Watzl, B. - Mader, P.: Influence of the production method on physicochemical concentrations in whole wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, no. 21, pp. 10116-10121.
- [228] Everette, J. D. - Bryant, Q. M. - Greem A. M. - Abbey, Y. A.: Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, vol. 58, no. 14, pp. 8139-8144.
- [229] Piljac-Žegarac, J. - Valek, L. - Martinez, S. - Belščak, A.: Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, 2009, vol. 113, no. 2, pp. 394-400.
- [230] Perron, N. - Brumaghim, J. L.: A review of antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2009, vol. 53, no. 2, pp. 75-100.
- [231] Tormen, L. - Torres, D. P. - Dittert, I. M. - Araújo, R. G. O. - Frescura, V. L. A. - Curtius, A. J.: Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, vol. 24, no. 1, pp. 95-102.
- [232] Opara, U. L. - Mditshwa, A.: A review on the role of packaging in securing food system: Adding value to food products and reducing losses and waste. *African Journal of Agricultural Research*, 2013, vol. 8, no. 22, pp. 2621-2630.
- [233] Arvanitoyannis, I. S. - Kotsanopoulos, K. V.: Migration phenomenon in food packaging: Food-package interactions, mechanisms, types of migrants, testing and relative legislation: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, vol. 1, no. 1, pp. 1-16.
- [234] Terry, L.: *Health-promoting properties of fruits and vegetables*. 1st ed. Wallingford: CABI, 2011, 400 p. ISBN 978-1-84593-528-3.
- [235] Plaza, L. - Sánchez-Moreno, C. - De Ancos, B. - Elez-Martínez, P. - Martín-Belloso, O. - Cano, M. P.: Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT - Food Science and TEchnology*, 2011, vol. 44, no. 4, pp. 834-839.
- [236] Karoui, I. J. - Marzouk, B.: Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013, no. 1, pp. 1-12.
- [237] Abad-García, B. - Berrueta, L. A. - Garmón-Lobato, S. - Urkaregi, A. - Gallo, B. - Vicente, F.: Chemometric characterization of fruit juices from Spanish cultivars according to their phenolic compounds contents: I. citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, vol. 60, no. 14, pp. 3635-3644.

9. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

AAPH	2,2'-azinobis(2-aminopropan)dihydrochlorid
AAS	Atomová absorpční spektroskopie
ABTS ⁺	Kation-radikál 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol)-6-sulfonát
ANOVA	Analýza rozptylu
BIO, EKO, ORGANIC	Označení ekologických potravin
BR/BW	Červené/Bílé ekologické víno
CDA	Kanonická diskriminační analýza
CEQ	Katechin ekvivalent
CIE L*a*b	Barevný prostorový model, trichromatické souřadnice
CR/CW	Červené/Bílé konvenční víno
CUPRAC	Metoda založená na redukci Cu ²⁺ komplexů-Cupric ion reducing antioxidant capacity
DAD/PAD	Detektory diodového pole
DDD	Dopručená denní dávka
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrolin-N-oxid
DON	Deoxynivalenol
[•] DPPH	Radikál 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DPPH-H	Difenylpikrylhydrazin
EC ₅₀	Koncentrace substrátu způsobující 50% pokles absorbance
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
ESI	Elektrosprejová ionizace
EZ	Ekologické zemědělství
FiBL	Výzkumný ústav ekologického zemědělství
FID	Plamenoionizační detektor
FRAP/FRP	Metody založené na redukci Fe ³⁺ komplexů
F-C	Folin-Ciocalteuovo činidlo
GAE	Ekvivalent kyseliny gallové
GC(GC-MS)	Plynová chromatografie (Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí)
HMF	Hydroxymethylfurfural
HO ₂ [•] / [•] OH	Hydroperoxylový radikál / Hydroxylový radikál
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
HPLC-DAD	Vysokotlaká kapalinová chromatografie s detekcí v diodovém poli
HPLC-DAD-APCI-MS	Vysokotlaká kapalinová chromatografie spojená s atmosférickou chemickou ionizací a vícenásobnou hmotnostní detekcí
HPLC-MS	Vysokotlaká kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC/MS/MS	Vysokotlaká kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
HPLC-RID	Vysokotlaká kapalinová chromatografie s refraktometrickou detekcí
ICP	Indukčně vázané plazma
IFOAM	Mezinárodní federace hnutí ekologického zemědělství
IR/MIR	Infračervená oblast/ Střední infračervená oblast
k	Formální rychlostní konstanta
LC	Kapalinová chromatografie
LC/ESI-MS-MS	Kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hm. detekcí
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
OTA	Ochratoxin A
PBN	α-fenyl-N-terc-butyl-nitron
PCA	Analýza hlavních komponent
PCF	Faktorová analýza
PET	Polyethylentereftalát
POBN	α-(4-pyridyl-1-oxid)-N-terc-butylnitron
PROXYL	3-karbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-N-oxyl
QE	Kvercetin ekvivalent
RE	Rutin ekvivalent
RO [•] /ROO [•]	Alkoxylový radikál/Peroxylový radikál
TAA/TAC	Celková antioxidační aktivita/Celková antioxidační kapacita
TBARS	Látky reagující s kyselinou tiobarbiturovou
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-N-oxyl
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-N-oxyl
TFC/TPC	Celkový obsah flavonoidů/Celkový obsah polyfenolických látek
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV/VIS-NIR	Spektroskopie v ultrafialové, viditelné a blízké infračervené oblasti
ZEA	Zearalenol

10. SEZNAM PŘÍLOH

1. POLOVKA, M.; KAJDI, F.; TOBOLKOVÁ, B.; SUHAJ, M.; BEDNÁRIKOVÁ, A. Influence of growin conditions and technological processing on properties of flours assessed by spectroscopic methods. *Chemické listy*. 2012, 106S, (2), pp. 225-230.
2. TOBOLKOVÁ, B.; DUREC, J.; BELAJOVÁ, E.; MIHALÍKOVÁ, M.; POLOVKA, M.; SUHAJ, M.; DAŠKO, L.; ŠIMKO, P.. Effect of light conditions on physico-chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces during storage. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2013, 52 (3) pp. 181-190.
3. TOBOLKOVÁ, B.; POLOVKA, M.; SUHAJ, M. Differentiation of Slovak organic and conventional wines and grape musts on the basis of their EPR and UV-VIS-NIR characteristics by means of multivariate statistics. Zasláné do *Food Chemistry*. 2013.
4. TOBOLKOVÁ, B.; POLOVKA, M.; BELAJOVÁ, E.; KOREŇOVSKÁ, M.; SUHAJ, M. Possibilities of organic and conventional wines differentiation on the basis of multivariate analysis of their characteristics (EPR, UV-VIS, HPLC and AAS study. Zasláné do *Journal of Agricultural Schience*. 2013.

11. PŘÍLOHY

Příloha 1. POLOVKA, M.; KAJDI, F.; TOBOLKOVÁ, B.; SUHAJ, M.; BEDNÁRIKOVÁ, A. Influence of growing conditions and technological processing on properties of flours assessed by spectroscopic methods. *Chemické listy*. 2012, 106S, (2), pp. 225-230.

Chem. Listy 106, s225–s230 (2012)

ACP 2012 – Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi

Lectures

INFLUENCE OF GROWING CONDITIONS AND TECHNOLOGICAL PROCESSING ON PROPERTIES OF FLOURS ASSESSED BY SPECTROSCOPIC METHODS

MARTIN POLOVKA^{*a}, FERENC KAJDI^b, BLANKA TOBOLKOVÁ^{a,c}, MILAN SUHAJ^a, and ALENA BEDNÁRIKOVÁ^a

^a VUP Food Research Institute, Department of Chemistry and Food Analysis, Priemysel'ná 4, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic, ^b University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Science, Vár 2, Vár 2, HU-9 200 Mosonmagyaróvár, Hungary, ^c Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic
polovka@yup.sk

Summary

Complex analysis of the influence of growing and technological processing conditions on selected properties of group of commercial samples of Slovak and Hungarian wheat, spelt and rye flours prepared following organically and conventional production practices was performed. Solid flour samples were analyzed to ash and dry matter content as well as to minerals and trace elements content. Extracts of flours in 50% ethanol were treated by EPR and UV-VIS spectroscopy to determine the total polyphenols and flavonoids content as well as some other characteristics of antioxidant properties, including ABTS^{•+} and DPPH tests. Multivariate statistical analysis was subsequently applied on the whole dataset of experimental characteristics in order to assess the influence of way of production (organic vs. conventional) and technological processing (grinding) on sample properties. Besides that, the possibility of flours differentiation according to the previously mentioned characteristics as well as their origin was tested. By means of canonical discrimination analysis, flour samples were with > 95% correctness discriminated according to their country of origin. Taking into account the way of production, organically grown samples were with ~ 92% discrimination score differentiated from that produced by conventional production practices. Classification of samples according to the way of technological processing (grinding) reached ~ 96% and according to varietal composition, 100% correct classification. As the most significant experimental characteristics for the purposes of flour samples differentiation, minerals and trace elements content, as well as flavonoids content and radical-scavenging activity of extracts were recognized. The prediction ability of the statistical models was in all cases > 92%, in case of varietal composition, even 100%.

Introduction

Besides the traditional role of cereals as a source of nutrients, in the recent years, their growing utilization in so called "functional foods" has been noticed, utilizing either whole cereals or some their components. The conventional definition of functional foods is that it is a food where a new ingredient (or more of an existing ingredient) has been added and the new so-prepared product has a new function, frequently related e.g., to health-promotion or disease prevention. Functional foods must have the character of foods and their positive impact will be reflected already in the consumption quantity corresponding to normal food. They are not pills or other form of medication or supplements¹. One type of cereals with high potential in functional foods preparation represents spelt (*Triticum spelta*, L.) – a hexaploid species of wheat, being in the past an important staple in parts of Europe. Nowadays, it has again found a growing importance in market as a health food or a component of health beneficial foods, due to its agronomic, compositional and medical characteristics. This cereal has similar chemical composition as common wheat but its content of nutritionally important compounds is higher. According to some previously published analytical data, it contains about 57.9 % carbohydrates (excluding 9.2 % fibre), 17.0 % protein and 3.0 % fat, as well as dietary minerals and vitamins². Due to its moderate amount of gluten, it is suitable for baking purposes. Spelt is most frequently available in several forms (products) e.g., as coarse pale bread, biscuits, crackers or as spelt pasta. Besides that, grain of spelt is used in brewing industry and/or as feeding³⁻⁵. Comparison of some characteristics of wheat, spelt and rye whole meal flours is presented in Table I (ref.^{6,7}).

For the preparation of functional foods containing cereals or its components, it is necessary to consider several factors. Although the content of the main components in the grain changes within the respective variety only statistically, significant effect on the chemical composition of grain could have soil composition, climatic and agro-technical conditions, and last but not least, the technologi-

Table I
Comparison of selected averaged characteristics of wheat, spelt and rye whole meal flours

Parameter	Wheat ⁶	Spelt ⁷	Rye ⁶
Proteins (g/100g)	11.55	12.8	11.27
Saccharides (g/100g)	71.03	62	71.76
Dietary fiber (g/100g)	9.1	11.4	13.3
Minerals (as ash, g/100g)	1.62	1.8	1.72
Riboflavin (mg/100g)	0.11	0.15	0.14

cal procedures/processes used in subsequent post-harvesting treatment⁸. All these factors can significantly affect the properties of grains/flours and the content of potentially interesting constituents, predetermining thus their use in functional foods production. In this context, procedures for the isolation of individual components of interest from cereal are of great importance, as well. Therefore, it is necessary to deal in details with the problems of the isolation of functional components from flour and aspects of their stability. Besides that, it is also important to deal with the effects of isolation/extraction conditions on the content of functional components (e.g., polyphenols, flavonoids, organic acids).

This contribution, as a part of a complex study, focused on potential of some cereals to serve as functional foods components themselves, or after their additivation / doping by mixing with some other components of natural origin with known antioxidant potential and health beneficial effects (e.g., anthocyanins, flour or medical herbs extracts). As an input information for further processing, the influence of the origin & growing condition (organic vs. conventional farming practices), technological processing (degree of grinding) as well as varietal composition on selected properties of group of 24 commercial wheat, spelt

and rye commercial flour samples of Slovak and Hungarian origin was performed. The basic characteristics of solid samples, i.e., dry matter and ash content, but also minerals and trace elements content was evaluated. Besides that, antioxidant properties of flours extracts were assessed by means of UV-VIS and EPR spectroscopy, involving several assays. Amino acids profile was determined by HPLC-MS system. Results obtained were correlated via simple correlations with total polyphenols and flavonoids content. Besides that, the multivariate statistical analysis was used to evaluate the influence of origin, varietal composition, way of production and technological processing on sample properties. In addition, the possibilities of some flour properties (ash, dry matter content) prediction from spectral characteristics, was tested.

Experimental

Samples

For the purposes of this study, 24 commercial samples of Slovak and Hungarian organic and conventional smooth, semi-smooth, rough and whole meal wheat, spelt and rye flours were selected. Detailed description of samples is given in Table II.

Table II
Basic characteristics of the samples of Slovak and Hungarian organic (O) and conventional (C) flours under study

ID	Sample characterisation	Country of origin*	Way of production**	ID	Sample characterisation	Country of origin*	Way of production**
F1	Wheat, whole meal, smooth	SK	O	F13	Rye, whole meal, smooth	SK	C
F2	Wheat, whole meal	HU	O	F14	Spelt, whole meal, smooth	SK	O
F3	Wheat, whole meal, stone mill	HU	O	F15	Spelt, whole meal	HU	O
F4	Wheat, smooth	HU	O	F16	Spelt, whole meal, stone mill	HU	O
F5	Wheat, whole meal, smooth	SK	C	F17	Spelt, smooth	HU	O
F6	Wheat, semi-smooth	SK	C	F18	Spelt, whole meal, smooth	SK	C
F7	Wheat, rough	SK	C	F19	Spelt, smooth	SK	O
F8	Wheat, smooth	SK	C	F20	Spelt, whole meal, rough	SK	O
F9	Rye, whole meal, smooth	SK	O	F21	Spelt, smooth	HU	O
F10	Rye, whole meal	HU	O	F22	Spelt, whole meal	HU	O
F11	Rye, whole meal, stone mill	HU	O	F23	Spelt, whole meal	HU	O
F12	Rye, smooth	HU	O	F24	Spelt, semi-smooth	HU	O

* HU – Hungary, SK- Slovak Republic;** O – organic, C – conventional

Basic characteristics of solid flours

Solid flour samples were evaluated to dry matter and ash content using the standard AOAC methods^{9,10}. Minerals and trace elements content (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na and Zn) was determined using the atomic absorption spectrometry – AAS. For these purposes, Perkin Elmer 4100 (Perkin Elmer, USA) spectrometer, equipped with a deuterium lamp background-correction system was employed, using an air/acetylene flame and the flame-ionization detector¹¹. Besides that, total nitrogen content was determined using the routine Kjeldahl method¹².

Extracts preparation

For EPR and UV-VIS experiments, exactly 50 ml of 50% ethanol/water solution (v/v) was poured over 2.5 g of respective flour sample and the extraction was performed at ambient temperature. The mixture was shaken on laboratory shaker (Innova 2000, USA) for 1h at 150 rpm. Subsequently, the supernatant was separated from the solid matter using the laboratory ultracentrifuge (SciQuip, UK) at 9200 rpm at ambient temperature during 10 min. The so prepared extracts were stored at ambient temperature in darkness between the experiments. For HPLC analysis, 1 g of flour sample was mixed with 20 ml of acetic acid solution in water (0.1 M) and the aliquot of internal standard d3-Glu (50 µl) was added. The mixture was shaken at 150 rpm for 30 min in laboratory shaker at ambient temperature and centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at the temperature of 0 °C. After the filtration, the supernatant (200 µl) was mixed with 100 µl of isotopically labelled internal standard and 800 µl 0.1% solution of acetic acid (in water, v/v) and used in analysis.

HPLC-MS, UV-VIS and EPR spectral characteristics

Amino acids (AA) profile and their quantification was performed by HPLC-MS-MS with positive electrospray ionization using an Agilent 6410 Triple Quad detector (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to a HPLC system Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) consisting of a binary pump, a vacuum degasser, a autosampler, and a thermostated column compartment. The analytical separation was performed on an a Purospher® STAR RP-8ec (150 mm × 4.6 mm, 3 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) using an isocratic mixture of 100 ml acetonitrile and 500 ml of water solution of perfluorooctanoic acid (PFOA) (0.05 mM) at the flow-rate of 0.5 ml min⁻¹ at temperature of 25 °C. Free individual amino acids was quantified using linear calibration curve established with standard solution using the L-amino acids kit containing the 98% purity standards of 20 amino acids (Sigma – Aldrich). As an internal standards, a lyophilised mixture of isotopically labelled L-amino acids (ChromSystems, München, Germany) and standard of d3-glutamic acid (d3-Glu, 97%, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) were used. Quantification was per-

formed by comparison of the peak area ratio of selected amino acids with relevant internal standard monitored using the MRM transitions. The following instrumental (ion source) parameters were used for amino acids analysis: drying gas (N₂) flow, 8 L min⁻¹; gas temperature, 320 °C; nebulizer pressure 50 psi; capillary voltage, 3.0 kV; fragmentor voltage, 50–100 V (depending on analyte); collision energy, 2–30 eV (depending on analyte); dwell time, 50 ms. All the samples were analysed in two parallel repetitions. The determined concentrations of 21 free amino acids were counted together and the result was presented as total amino acids content.

UV-VIS experiments were carried out with both, extracts and solid samples, using a UV-VIS-NIR spectrophotometer Shimadzu 3600 with accessory. The experiments with solid samples were performed in attenuated reflectance mode using the Large Integrating Sphere Assembly LISR 3100 (Shimadzu, Kyoto, Japan) employing quartz cell enabling reflection measurements from the surface of defined upper layer of flours samples. The reflectance spectrum of the respective flour sample was recorded in triplicates in the spectral range from 200 to 2500 nm and averaged for use in the data analysis. Flours reflectance spectra visualisation and comparison was performed using the spectroscopic data evaluation environment of Panorama 3.1 (Labcognition GmbH & Co. KG) enabling the multivariate transformation of spectra by the method of principal component factoring (PCF). Before the PCF all the spectra were smoothed by the Savitzky-Golay method to remove baseline shifts and superimposed peaks and normalised by data scaling and centering techniques. Radical-scavenging activity of solid samples was characterized by UV-VIS, employing the modified Quencher method¹³. The content of total polyphenols (TPC) expressed as Gallic acid equivalents¹⁴ and of flavonoids (TFC) expressed as Rutine equivalents was determined in the extracts. Besides that, radical-scavenging activities of extracts were evaluated using the solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation-radical (ABTS⁺), respectively¹⁵. All the experiments were performed in duplicates.

The entire EPR experiments were performed in duplicates, using a portable X-band EPR spectrometer e-scan (Bruker Biospin, GmbH, Karlsruhe, Germany) with accessory. The ability of flour extracts to terminate DPPH and ABTS⁺ radicals was evaluated. The ABTS⁺/DPPH radical-scavenging activities were expressed as Trolox equivalents (TEAC_{ABTS⁺/DPPH})¹⁴.

Multivariate statistical methods were used to distinguish the samples according to selected characteristic, i.e., origin, way of production, varietal composition, way of technological processing, employing methods of principal component analysis, principal component factoring, canonical, and kth neighbour discriminant analysis and classification. These calculation were performed by means of Unistat®6.1 (Unistat, London, United Kingdom) statistical software, taking into consideration all the experimental

data obtained from HPLC-MS, AAS, UV-VIS and EPR experiments. The recognizability of discriminant model was determined as the percentage of the correctly classified samples in the training data set. The prediction ability was tested, as the percentage of the samples correctly classified in the leave-multiple-out cross-validation approach¹⁶.

Results and discussion

As the basic parameters of the studied flour samples, ash and dry matter content were determined. Results obtained indicated, that there is not a clear difference between the samples following neither from their origin, way of production, nor varietal composition, as the results within the common groups are statistically distributed.

Regarding the total nitrogen content, it is obvious that samples from Hungary reveal in average its slightly higher contents than the Slovak ones, exception for some case,

where practically either none or only statistically negligible differences were found. There is also not clear relationship between the nitrogen content and the varietal composition of flours, the same for the way of production. For the later mentioned, with respect to presupposed much more intensive fertilization in conventional farming, one could expect at least slightly higher content of nitrogen, but this expectation was not supported by the results. Results presented in Table III also indicate that there exist some relationship between the amino acids content and the way of sample processing (grinding), which is most probably the result of modified extraction ability of amino acids from respective flours in dependence on the degree of grain micronization. Practically the same, unambiguous trends and relationships were obtained also for other evaluated parameters of flours and their extracts, as was also observed for the results of Quencher assay, content of polyphenols or flavonoids.

Table III

Averaged results (mean± SD, $n=2$) of some characteristics of solid flour samples and their extracts in 50% EtOH (v/v)

ID	Ash [%]	Dry matter [%]	Total nitrogen content [%]	Total AA content [mg kg ⁻¹]	Quencher [mg kg ⁻¹]	TPC [mg kg ⁻¹]	TFC [mg kg ⁻¹]
F1	1.9±0.0	89.2±0.0	1.8±0.1	919.3±0.9	11.3±1.0	1433.2±16.6	310.3±43.2
F2	1.6±0.0	89.2±0.0	2.3±0.1	1473.6±5.3	12.7±2.3	1734.7±70.4	163.8±2.5
F3	1.9±0.4	89.4±0.1	2.3±0.1	1448.1±3.5	11.8±1.4	1719.2±55.6	185.8±3.8
F4	0.8±0.0	89.0±0.0	2.3±0.1	989.0±6.5	10.8±2.0	1548.2±51.2	560.9±19.3
F5	1.9±0.0	88.7±0.1	1.9±0.1	1273.1±8.5	14.2±1.7	1580.6±29.5	127.5±1.8
F6	0.6±0.4	88.5±0.1	1.6±0.1	503.0±6.7	8.3±3.1	1492.7±3.7	441.5±9.6
F7	0.4±0.0	89.4±0.0	1.7±0.1	482.4±8.0	8.6±1.7	1273.5±55.2	294.7±15.7
F8	0.5±0.0	88.5±0.0	1.7±0.1	526.9±2.9	10.9±2.4	1330.0±39.4	182.5±6.1
F9	1.6±0.0	89.4±0.1	1.3±0.1	2173.9±1.3	11.0±1.3	1376.3±3.4	432.9±6.6
F10	1.7±0.0	89.5±0.3	1.6±0.1	2488.8±12.8	14.6±0.2	1395.6±15.6	558.5±4.4
F11	1.9±0.0	89.0±0.1	1.2±0.1	1736.2±28.5	12.9±0.9	1677.5±71.2	480.9±15.9
F12	0.7±0.0	88.2±0.8	0.8±0.0	1168.9±7.5	10.2±1.2	833.1±12.9	417.0±4.3
F13	1.6±0.0	89.2±0.0	1.3±0.1	1733.9±3.2	13.2±1.6	1328.3±81.3	770.5±12.1
F14	2.1±0.0	89.7±0.1	2.3±0.1	1495.8±30.7	12.4±2.0	1825.8±221.4	271.8±37.8
F15	2.2±0.0	89.8±0.0	2.6±0.1	1488.1±5.9	13.9±3.1	1964.9±427.5	214.8±25.7
F16	2.1±0.0	89.8±0.0	2.6±0.1	1428.9±18.2	12.0±3.2	1569.8±3.5	182.7±0.6
F17	1.0±0.0	89.3±0.0	2.4±0.1	818.6±2.1	9.5±3.4	1392.3±0.8	114.9±13.4
F18	2.5±0.0	90.3±0.0	2.2±0.1	1521.9±19.4	12.1±3.3	1411.5±74.6	274.9±6.9
F19	1.1±0.0	89.4±0.0	2.3±0.1	1002.2±6.6	13.0±3.2	1390.9±44.4	143.5±14.8
F20	1.4±0.0	89.8±0.0	2.1±0.1	1263.5±38.9	9.6±2.0	1433.0±54.6	129.8±4.5
F21	0.8±0.0	89.7±0.0	2.1±0.1	771.0±6.6	10.8±0.1	1339.3±64.5	187.8±6.7
F22	2.1±0.0	90.1±0.1	2.2±0.1	1379.1±17.3	12.8±1.2	1728.2±28.6	181.2±13.1
F23	1.1±0.0	88.4±0.1	1.5±0.1	810.1±7.9	10.2±1.1	1276.8±26.5	143.5±3.4
F24	1.1±0.0	89.0±0.3	1.3±0.1	722.0±0.2	9.8±0.6	1110.1±57.8	95.0±6.1

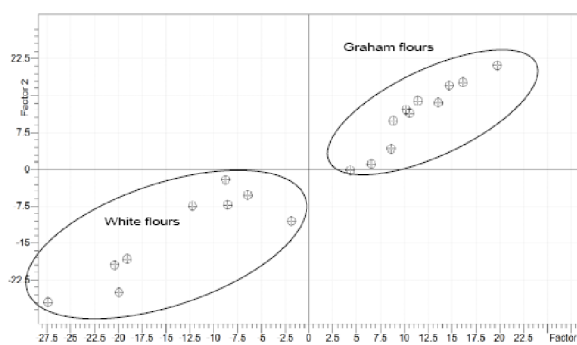


Fig. 1. Wheat, rye and spelt flours spectral reflection data projection by principal component factoring (each point represents a reflection spectrum of sample in VIS spectral region). For the differentiation purposes, flour samples were classified into two sub-groups as graham (whole meal) and white (the rest)

Correlation matrix of all determined characteristics (data not presented) indicates moderate correlations of majority of determined characteristics, revealing R^2 values within the range of $<0.4\text{--}0.6>$; however, in some cases, strong correlations were confirmed e.g. between the total amino acids content and TEAC values evaluated both from UV-VIS and EPR measurements with $\text{ABTS}^{+\cdot}$ and DPPH radicals.

However, considering the results of all methods and assays used, it can be concluded, that any single analytical method or their combination and/or simple mutual correlation do not offer an unambiguous answer on the topics of the similarities/differences between the samples from their origin, way of production, processing or varietal composition points of view. Thus, multivariate statistical analysis was employed to find the similarities and differences within the group of samples of common characteristics and between the individual groups and to perform the differentiation and classification of individual flour samples.

By the method of principal component factoring (PCF), the whole UV-VIS-NIR reflection spectra were

processed, separately for respective spectral regions (UV, Visible and NIR). While the spectra from UV and NIR regions do not offer clear differentiation of samples into subgroups by any of chosen criteria (origin, way of production, varietal composition, way of grinding & processing), this is not the case of VIS-spectra (part of complex reflection spectra recorded in the spectral range 330–780 nm). As is clearly indicated on Fig. 1, from the UV-VIS-NIR reflection measurements of flours the data obtained in the visible spectral range, it is possible to differentiate the wheat flours according to way of grinding. From practical reasons, samples were classified only into two sub-groups – one for whole meal flours (labelled as graham) and the 2nd for the remaining samples (refer to Table II for further details).

Very promising results offered the processing of the entire group of experimental characteristics by the methods of principal component analysis, canonical discrimination analysis and k^{th} nearest neighbour classification. Principle component analysis was able to explain in all studied cases the variability of the dataset by 78 % and 83 % of the variability of the dataset (taking into consideration the cumulative % of variance of first 3 and 4 principal components, respectively). Eigenvalues indicates that in the differentiation by PCA, very important role have the total nitrogen content, content of amino acids and total polyphenols. The other characteristics contributed to principal components construction by various, but usually lower significance.

CDA, in dependence on the selected discrimination criterion, possessed very high recognition scores, reflecting the successfulness of the discrimination of the samples into respective groups on the basis of their experimental characteristics, as clearly indicated in Table IV. The lowest recognition was obtained in classification of samples according the way of production (farming), in which 3 organically and 1 conventionally produced sample were misclassified. As regards the importance of individual characteristics for the discrimination, it should be noted here that it vary with the selected criterion, however, important role of individual minerals and trace elements, followed by TPC/TFC and last but not least, individual

Table IV

Results of canonical discrimination analysis, k^{th} nearest neighbour classification and prediction tests by means of CDA, of flour samples under study and their extracts according to various discrimination parameters. The whole dataset of experimental characteristics was taken for the discrimination and classification. Results are expressed as % of correctly classified samples

Method	Origin [%]	Way of farming [%]	Varietal composition [%]	Technological processing (grinding) [%]
Canonical discrimination	95.8	91.7	100	95.8
K^{th} nearest neighbour	k=1	100	100	100
	k=2	95.8	100	95.8
Prediction ability by CDA	92.9	97.7	100	97.7

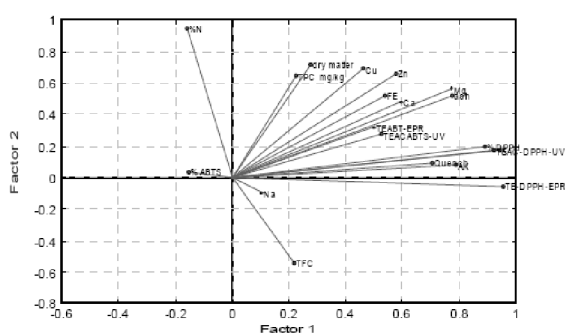


Fig. 2. Plot of factors (Varimax rotation) indicating the importance of individual experimental characteristics of flour samples and their extracts for the purposes of samples differentiation according to chosen criteria

characteristics of antioxidant properties. Similar results give also processing of the data by the principal component factoring in varimax rotation. As follows from the plot of factors depicted on Fig. 2, 4 vectors are lying in different sectors of the plot than those of rest of the group, corresponding to the content of nitrogen, total flavonoid content, as well as sodium content and ABTS^{+} radical-scavenging ability assessed by UV-VIS.

Prediction ability is one of the most important characteristics of the classification model/procedure, reflecting the ability of the statistical model to correctly classify the unknown samples (samples of unknown affiliation), just on the basis of comparison of its characteristics with those of already classified samples. For the purposes of this study, the prediction ability was tested by CDA in leave-multiple-out approach, assigning in turn up to 20 % of the samples as unknown. Percentage of correctly predicted samples reached in each cases high value, as indicated in Table II, the lowest in prediction of sample origin and the highest in the prediction of sample varietal composition.

Conclusion

The spectral characteristics of 24 commercial flour samples and their extracts in 50% EtOH were studied by UV-VIS-NIR, EPR, AAS and HPLC-MS methods, in order to assess the influence of several factors, i.e., origin of sample, growing conditions, varietal composition and technological processing on their properties. As follows from the results, besides the antioxidant properties, the content of minerals and trace elements, but also the total nitrogen and amino acids content is significantly influenced by the above-mentioned conditions. Additional experiments with samples of identical origin but various growing conditions are in progress, in order to specify the most proper conditions for grain production and processing, from functional components content and health-beneficial properties maintenance points of view.

This publication is the result of Project HUSK – 0901/1.2.1/0010 „Utilization of regional sources for functional food production“ implementation, supported by the European Regional Development Fund within the Hungary – Slovakia Cross-border Cooperation 2007-2013 Programme. This contribution is also the result of the project implementation „Centre of Excellence for Contaminants and Microorganisms in Food“ supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.



Building partnership



<http://www.husk-cbc.eu>

REFERENCES

1. Roberfroid M.: in: *Functional Food: Concept to Product (2nd edition)*, Chap. 1, p. 3. Woodhead Publishing, Cambridge 2011.
2. Gabrovská D., Fiedlerová V., Holasová M., Mašková E., Smrčinov H., Rysová J., Winterová R., Michalová A., Hutár M. *Food Nutr. Bull.* 23, 3 (2002).
3. Bonafaccia G., Galli V., Francisci R., Mair V., Skrabanja V., Kreft I.: *Food Chem.* 68, 4 (2000).
4. Kohajdová Z., Karovičová J.: *Potravinárstvo* 1, 2 (2008).
5. Abdel-Aal E.-SM., Rabalski I.: *Food Chem.* 111, 1 (2008).
6. Vojtašáková A., Kováčiková E., Simonová E., Holčíková K., in: *Obiloviny a strukoviny: potravinové tabuľky*. Výskumný ústav potravinársky, Bratislava 1999.
7. Ranhotra G.S., Gelroth J.A., Glaser B.K., Lorenz K. J.: *Food Compos. Anal.* 9, 1 (1996).
8. Pňihoda J., Skřivan P., Hrušková M.: in: *Cereální chemie a technologie I: Cereální chemie, mlynská technologie, technologie výroby těstovin*. VŠCHT Praha, Praha 2006.
9. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). Official Method 923.03: *Determination of Ash in Wheat Flour* (1990).
10. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). Official Method 925.10: *Determination of Dry matter and Moisture in Cereal Products* (1990).
11. Suhaj M., Koreňovská M.: *Food Chem.* 107, 1 (2008).
12. EN ISO 20483: *Cereals and pulses – Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content – Kjeldahl method* (2006).
13. Serpen A., Gökmen V., Pellegrini N., Fogliano V.: *J. Cereal Sci.* 48, 3 (2008).
14. Polovka M., Šťáviková L., Holmová B., Karásek P., Roth M.: *J. Chromatogr., A* 1217, 51 (2010).
15. Suhaj M., Rácová J., Polovka M., Brezová V.: *Food Chem.* 97, 4 (2006).
16. Berrueta L.A., Alonso-Salces R.M., Héberger K.: *Chromatogr., A* 1158, 1 (2007).

Příloha 2. TOBOLKOVÁ, B.; DUREC, J.; BELAJOVÁ, E.; MIHALÍKOVÁ, M.; POLOVKA, M.; SUHAJ, M.; DAŠKO, L.; ŠIMKO, P.. Effect of light conditions on physico-chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces during storage. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2013, 52 (3) pp. 181-190.

Effect of light conditions on physico-chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces during storage

BLANKA TOBOLKOVÁ – JÁN DUREC – ELENA BELAJOVÁ – MÁRIA MIHALÍKOVÁ – MARTIN POLOVKA – MILAN SUHAJ – LUBOMÍR DAŠKO – PETER ŠIMKO

Summary

Antioxidant status, ascorbic acid concentration, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) formation and total colour changes in a pineapple juice with the addition of small pieces of pineapple stored up to 26 weeks at 7 °C at different light conditions (darkness, day light) were characterized. Ascorbic acid losses reached after 26 weeks approximately 23% (day light) and 37% (darkness) of the original concentration. These trends were confirmed also by comparison of kinetic constant values. The impact of light and time on HMF formation was negligible, when maximum concentration of HMF at a level of 2 mg·l⁻¹ was found. Slight decrease of total polyphenolic compounds concentration without respect on storing conditions was noticed, with minimum after 8 weeks of storage. Decomposition of sample components and the formation of low-molecular weight phenolic fractions are supposed. Gradual decrease of antioxidant capacity of the juice was also noticed, more apparent for the samples stored at day light with fluctuations caused by samples heterogeneity and metal ions content. Juice yellowness was most significantly influenced by the processing and storage under given conditions, change of which was the most intensive during 4th week of the storage. Long-term storage for up to 26 weeks resulted in a significantly increased yellowness for both storage variants.

Keywords

pineapple juice with pieces; storage; electron paramagnetic resonance; ultraviolet-visible spectroscopy; ascorbic acid; 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde; polyphenols; colour

Pineapple (*Ananas cosmosus*) belongs to tropical and sub-tropical fruits native to Central and South America, which have, in general, unique flavours, being also excellent sources of vitamins, minerals, phytonutrients and also polyphenols revealing thus also a substantial antioxidant activity. As known, pineapple is one of the lowest-caloric fruits and a valuable source of ascorbic acid. Ripped and matured pineapple flesh contains on average about 85% water, 0.7% citric

acid, and saccharides at a level of approximately 14 °Brix, with pH 3.4. Dominant saccharides are saccharose (6.5–7%), glucose (1.7%) and fructose (2.2%). It is also a rich source of various organic and inorganic acids, such as malic, oxalic and phosphoric acid. Fresh pineapple juice contains suspended solids (112–162 g·kg⁻¹), fructose (17.2–47.5 g·l⁻¹), glucose (12.1–45.2 g·l⁻¹) and saccharose (24.5–97.3 g·l⁻¹), with total acidity (reported as citric acid) 4.6–12.1 g·l⁻¹.

Blanka Tobolková, Department of Chemistry and Food Analysis, VÚP Food Research Institute, Priemysel'ná 4, P. O. Box 25, SK-824 75 Bratislava, Slovakia; Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic.

Ján Durec, McCarter, a.s., Bajkalská 25, SK-821 01 Bratislava, Slovakia. Production premises: Budovateľská 1247/7, SK-929 01 Dunajská Strada, Slovakia.

Elena Belajová, Mária Mihalíková, Martin Polovka, Milan Suhaj, Lubomír Daško, Department of Chemistry and Food Analysis, VÚP Food Research Institute, Priemysel'ná 4, P. O. Box 25, SK-824 75 Bratislava, Slovakia.

Peter Šimko, Department of Chemistry and Food Analysis, VÚP Food Research Institute, Priemysel'ná 4, P. O. Box 25, SK-824 75 Bratislava, Slovakia. Current affiliation: Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, SK-812 37 Bratislava, Slovakia.

Correspondence author:

Martin Polovka, tel.: +421 2 5023 7195, fax: +421 2 5557 1417, e-mail: polovka@vup.sk

As mentioned above, pineapple is a rich source of vitamins, especially of ascorbic acid, content of which may vary between 360 mg·kg⁻¹ and 560 mg·kg⁻¹ of fruit, depending on pineapple variety [1]. Its content may differ even within the same species [2]. Ascorbic acid is the most unstable vitamin, being also extremely heat-sensitive and oxygen-labile nutrient [3], readily oxidized by many non-enzymatic processes. Maintaining its original concentration in fruit juices during their processing or storage is, in general, complicated by many factors contributing to its decomposition (e.g., pH, oxygen presence, metal ions, reducing agents, light conditions, storage temperature, enzyme activity) [4, 5]. In bottled juice, it is mostly decomposed due to the progressive oxidation induced by residual oxygen in the head space, aerobic decomposition, and/or the effect of light [6].

Complex characterization of the properties of fruit juices comprises also the characterization of their antioxidant status, or their changes during the processing and/or storage. Although the information on antioxidant and radical-scavenging properties of many kinds of fruits and vegetables are published, the information on pineapple, or pineapple juice, is limited. Also, the information on composition changes (in polyphenols and/or organic acids) and subsequently, changes in antioxidant activity upon the various treatments, storing conditions or sterilization techniques are practically missing. Only scarce relevant information on antioxidant properties of some fruits and vegetables in shots and their changes upon the storage conditions at different concentrations evaluated either by electron paramagnetic resonance (EPR) or ultraviolet–visible (UV-VIS) spectroscopy are available [7]. In this context, no studies have dealt with the storage quality of thermally pasteurized pineapple juice with small pieces of fruit in terms of their antioxidant activity changes, changes in total polyphenols or colour characteristics induced by storage at different thermal and light conditions, although these changes can be supposed (taking into account quite well described composition of other fruit juices and limited stability of their components) [8–12].

Besides the vitamins and antioxidant content, for the consumer safety it is important to monitor also either the concentration of compounds with potential toxicity, or their formation during the declared shelf life of any food products including fruit juices. One of the most frequently monitored compounds in fruit juice is 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF). In general, it is not naturally present in foodstuffs but it is being formed by the degradation of hexoses undergoing the transfor-

mation to fructose, which is prone to form HMF, in particular in the presence of organic acids. Usually, transformation of fructose into HMF is accelerated by elevated temperature and certain type of acids in the solution. The lower is the p*K*_a value (negative logarithm of the acid dissociation constant) of the present acid and the higher the temperature, the higher is the yield of HMF formed from fructose [13]. By metabolic processes, HMF may be transformed to allylic sulphuric acid esters, which are supposed to be the ultimate metabolite in toxification of the parent compound in vivo, i.e. HMF as non-toxic compound transforms in the presence of specific chemical substances into a toxic compound. Strong mutagenicity of sulphuric acid esters was confirmed [14]. In spite of fact that the toxic effect of HMF on human health has not been confirmed, HMF concentration is already regulated in honey [15] and it is considered also as one of the qualitative parameters for fruit juices [16, 17]; for apple juice, its limit was set to 20 mg·l⁻¹ and for orange juice to 10 mg·l⁻¹ [18].

New trends in pineapple juice market have led to the development of a new type of product, which is based on the addition of fruit pulp/fibres [19] or enrichment of juice by discrete fruit pieces to satisfy current consumer demands. As clearly follows from the above-presented data, the information on stability of flesh pineapple juice and its stability upon different storage conditions are limited. Moreover, there is hardly any information about the changes in physico-chemical parameters of pineapple juices, in particular of those with addition of small pineapple pieces.

Therefore, the aim of this work was to study the changes in ascorbic acid concentration, total polyphenolic compounds concentration, antioxidant activity and related colour changes and the process of HMF formation in the juice with small pieces of fruit during the storage at 7 °C under the different light conditions, i.e. stored in darkness in tight bottles or under the conditions that simulated the day light exposure. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used for HMF determination [17, 20] and also for the study of changes in ascorbic acid concentration. Antioxidant status as well as changes in the concentration of polyphenols or colour changes were monitored by EPR and UV-VIS spectroscopy, respectively. This study is a part of a complex proceeding research focused on the influence of modification of production practices on selected physico-chemical parameters of fresh juices.

MATERIALS AND METHODS

The samples of pineapple juice with small pieces of pineapple fruit were provided by McCarter Company (Dunajská Streda, Slovakia). The company imports both pineapple juice and pineapple pieces (diameter of approx. 3 mm) in frozen state from suppliers operating in Costa Rica. After defrosting, juice and pieces are mixed together and immediately thermally treated by pasteurization up to 95 °C during 20 s. Then, the product is filled aseptically into the polyethylene terephthalate (PET) bottles with the volume of 200 ml. After the production, the samples of the same batch were split into 3 sub-groups, reference samples were delivered immediately into the laboratory and the remaining 2 groups, in a number of bottles corresponding to the chosen experimental setup multiplied by 2 (as due to replications), were stored at 7 °C under the different light conditions. One group was stored in the darkness in a closed box with temperature regulation, while the other was stored under the conditions that simulated the day light exposure. Samples from both these groups were delivered for analyses in regular time intervals during subsequent 26 weeks. Altogether, approx. 200 bottles of pineapple juices underwent the analysis described below. The temperature of 7 °C was chosen in order to simulate the storage conditions recommended by juice producer.

Chemicals

All chemicals used in HPLC experiments were of analytical or HPLC purity. For ascorbic acid determination, ascorbic acid (99% purity, Fluka Chemie, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was used as external standard to generate a calibration curve. Ortho-phosphoric acid (85% purity, Lachema, Brno, Czech Republic) was used for preparation of mobile phase. For the determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF), HMF standard (99% < purity), phosphoric acid, methanol and acetonitrile – all of gradient purity grade (Sigma-Aldrich), were used. In EPR and UV-VIS experiments, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) salt (ABTS, Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA); 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (Tempol), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid of analytical grade purity (Sigma Aldrich); K₂S₂O₈ (Merck, Darmstadt, Germany), and sodium carbonate (Lachema) were used. In all experiments, water of HPLC grade purity freshly prepared in the laboratory (Rodem 6; Ecotest, Zemné, Slovakia) with an average resistance of 18.5 MΩ was utilized.

Ascorbic acid determination

Sample preparation

The samples were prepared immediately prior to analysis in a way avoiding losses of ascorbic acid due to the light and air oxygen exposure. Just before the analysis, juices were diluted tenfold and twenty-fold for two concentration levels, and subsequently filtered through a 0.45 μm syringe filter.

Experimental setup

Ascorbic acid concentration was determined by a HPLC-DAD chromatograph Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with quaternary pump, degasser, column thermostat and autosampler. The analytical column Zorbax SB-C18, 250 mm × 4.6 mm with the sorbent particle size 5 μm, and the precolumn Zorbax SB-C18, 12.5 mm × 4.6 mm with the same particle size (Agilent Technologies) were used. The mobile phase of 0.01 mol·l⁻¹ phosphoric acid in deionized water was pumped at a flow rate of 0.7 ml·min⁻¹. The sample was injected in 50 μl volume. The analysis was performed at ambient temperature. For the detection, diode array detector set at 240 nm was used. The identification was based on the retention time evaluation and on the comparison of UV-spectra (spectral range, 210–360 nm) of the respective sample and pure standard. For the purposes of calibration, the linear regression diagnostics was carried out by the Excel software (Microsoft Office XP, Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Method validation

For the validation of the described method, detection and quantification limit (1.4 mg·l⁻¹ and 1.8 mg·l⁻¹, respectively), linearity range (from 1.80 mg·l⁻¹ to 60 mg·l⁻¹), precision, and accuracy were assessed. The precision was evaluated as intra-day repeatability ($n = 8$) using control standard solution of ascorbic acid (concentration 60 mg·l⁻¹ and 3 mg·l⁻¹). The obtained relative standard deviation (*RSD*) was 2.7% and 36.0%, respectively. Accuracy of the method was confirmed by the addition of a known amount of ascorbic acid to a juice sample that resulted in 84–90% recovery. In general, the accuracy tended to be worsening when the lower concentrations of ascorbic acid in pineapple juice were analysed. The calibration measurements were carried out with standard solutions of ascorbic acid, which covered six points linear range (from 0.725 mg·l⁻¹ to 60.0 mg·l⁻¹), providing the correlation coefficient of $R^2 = 0.99978$.

Tab. 1. HPLC gradient separation conditions (mobile phase composition) used for HMF determination.

Time [min]	Volume of component in mobile phase [%]		
	Methanol	Water (0.01 mol·l ⁻¹ H ₃ PO ₄)	Acetonitrile
0	0	100	0
1.5	2	95	3
2.1	2	95	3
3	8	86	6
11	8	86	6
11.5	94	0	6
20	94	0	6
20.1	2	95	3
30	2	95	3

HMF determination

Sample preparation

Juice sample was filtered through the folded filtration paper (diameter, 185 mm; Whatman Grade 604; Sigma Aldrich) and subsequently utilized.

Experimental setup

The instrument HPLC-PDA Agilent 1200 (Agilent Technologies) equipped with quaternary gradient pump at a flow rate of 0.8 ml·min⁻¹, autosampler and photo-diode detector set to 280 nm was used for separation and quantification of HMF in pineapple juice. Separation was performed on C18 SB column (Agilent Technologies), particle size 5 µm, 250 × 4.6 mm. Triple gradient elution was used, as indicated in Tab. 1.

HMF standard for external calibration was diluted in water and stored at 4 °C. Limit of detection of the applied procedure was 0.4 mg·l⁻¹ and limit of quantification was 1.2 mg·l⁻¹. Uncertainty at a concentration level of 1.61 mg·l⁻¹ reached ± 0.3 mg·l⁻¹ [21].

EPR and UV-VIS measurements

Sample preparation

Immediately prior to the experiments, solid matters of pineapple juices were separated using a laboratory centrifuge (SciQuip, London, United Kingdom) at 10000×g at 5 °C (EPR measurements) or 20 °C (UV-VIS measurements) during 10 min. Supernatants were stored at 7 °C in darkness between the experiments.

The entire EPR experiments were performed in duplicates, using a portable X-band EPR spectrometer e-scan (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) with accessory. The ability of pineapple juice samples to terminate ABTS^{•+} and Tempol

free radicals was examined. The spectra were evaluated and ABTS^{•+} radical-scavenging activities were expressed as 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) equivalents (TEAC_{ABTS^{•+}}) as previously described by POLOVKA et al. [22]. In case of Tempol assay, the results were recalculated to ascorbic acid equivalents (AAE), using the calibration curve of the standard solutions of ascorbic acid, and expressed in millimoles of ascorbic acid per litre.

All the UV-VIS experiments were carried out using UV-VIS-NIR spectrophotometer Shimadzu 3600 (Shimadzu, Tokyo, Japan) with accessory. The measurements were performed in duplicates, using the following setup: spectral range, 380 nm to 780 nm; sampling interval, 2 nm; slit width, 0.1 nm; in the quartz cell 100-QS-Suprasil (Hellma, Sigma Aldrich; optical path, 1 cm) against distilled water as a blank. Total polyphenolic compounds (TPC) concentration was estimated by Folin-Ciocalteu modified method, using a standard solution of gallic acid for calibration curve construction. Results were expressed as gallic acid equivalent (GAE) per litre [22].

Colour changes evaluation

Colour model CIE $L^*a^*b^*$ determined by CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) classifies colour of any object in three dimensions; L^* , indicating lightness from 0 (black) to 100 (white); coordinates a^* and b^* represent greenness ($-a^*$), redness ($+a^*$), blueness ($-b^*$) and yellowness ($+b^*$), respectively. Their calculations were performed directly from the measured UV-VIS spectra by means of ColourLite Panorama Shimadzu software (LabCognition Analytical Software, Köln, Germany) using the D65 day light illuminant and 10° standard observer angle.

CIE $L^*a^*b^*$ values were used to calculate total colour difference according to the formula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

expressing the magnitude of difference between the initial (reference) and stored pineapple juice samples [23]. The obtained colour differences were subsequently classified analytically as not noticeable (0 to 0.5), slightly noticeable (0.5 to 1.5), noticeable (1.5 to 3.0), well visible (3.0 to 6.0), and great (6.0 to 12.0) [24].

Statistical analysis

Measurements were performed in two replications with 2 repetitions each (thus $n = 2$) if not specified otherwise. The data obtained by individual methods/assays were statistically compared

on the basis of means, taking into account the values of standard deviations. Scientist software (MicroMath, St. Louis, Missouri, USA) was utilized for kinetic parameters calculation of ascorbic acid degradation.

RESULTS AND DISCUSSION

Ascorbic acid

In order to evaluate the changes in ascorbic acid concentration resulting from different light conditions of storage at 7 °C, pineapple juice was analysed in approx. two-week time intervals. As expected, the presence or absence of the light represented the principal factor significantly affecting the stability of ascorbic acid. Fig. 1 shows a gradual decrease of ascorbic acid concentration during the monitored time of storage. In accordance with expectations, concentration of ascorbic acid gradually decreased with the time of storage in dependence on light conditions. It is apparent that under the given experimental conditions, juice stored in darkness exhibited lower deviations in ascorbic acid concentration levels within the tested juice batch. Also, the dynamics of its decomposition was lower than that of samples exposed to the day light. Such behaviour was previously observed also for other types of fruit juices [4].

As also follows from the results (taking into account their trend lines), at the end of the monitored period, i.e., after 26 weeks, ascorbic acid concentration fell to 20% (day light) and 25% (darkness) of its original concentration.

It should be noted here, that when the decrease of ascorbic acid concentration at the end of juices shelf life declared by the producer (16 weeks) and at the end of the storage period (26 weeks) were contemplated, the respective differences following from different storage conditions reached approx. 50% and 59% for samples stored at day light and in darkness, respectively.

The observed decrease in ascorbic acid concentrations in juice stored at different light conditions were evaluated also by fitting the experimental data to the model of 1st order kinetic equation in the integral shape

$$c_t = c_{t=0} \exp(-kt) \quad (2)$$

where $c_{t=0}$ and c_t represent an original concentration of ascorbic acid ($t = 0$) and the concentration at chosen time t of storage, respectively. k is the formal 1st-order rate constant of ascorbic acid degradation expressed as reciprocal day.

The calculated values of 1st-order rate

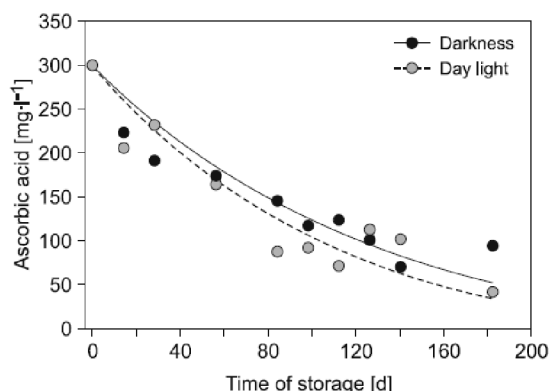


Fig. 1. Effect of storage time on ascorbic acid concentration in pineapple juice stored in darkness and at day light conditions.

Lines represent the fit of experimental values to the model of 1st-order kinetics.

constant of ascorbic acid degradation for juice samples stored in darkness reached $(0.0077 \pm 0.0006) \text{ d}^{-1}$ and for those stored at day light $(0.0091 \pm 0.0009) \text{ d}^{-1}$. When compared on absolute basis, it is apparent that the difference between the respective rate constants achieved approx. 16%.

The findings are in good agreement with some previously published data. SHAW et al. [25] assumed for citrus juice that, if the retention of their initial ascorbic acid concentration decreased to approx. 50%, it might indicate the end of their shelf life. In this context, CHIA et al. [26] proved that, in pineapple juice pasteurized at 80 °C for 10 min and then stored at a temperature of 4 °C for 13 weeks, ascorbic acid concentration fell down to 50% after 8 weeks. As follows from the presented results, the initial concentration of ascorbic acid in pineapple juice before storage, i.e. $(298 \pm 14) \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (100%), decreased to 50% after 10 and 13 weeks of storage at day light and in darkness, respectively.

The effect of juice thermal processing on ascorbic acid concentration is widely known. The rate of its decomposition is also influenced by the form, into which the respective fruit is processed. UCKIAH et al. [27] pointed out that, after thermal processing of three pineapple products (juice, jam and sorbet) and their storage at 8 °C within nine days, the highest decomposition of ascorbic acid was noticed in pineapple juice, with a loss of 38.5% immediately after the processing and with continuous losses of approx. 0.6 mg per day during the storage period.

Tab. 2. Effects of storage and light conditions on the formation of HMF in pineapple juice with small pineapple pieces.

Time of storage [week]		0	2	4	8	12	14	16	18	20	26
HMF concentration [mg·l ⁻¹]	Darkness	0.9	0.6	1.1	1.6*	1.2	1.5	2.1	1.1	2.3	2.0
	Day light	0.9	0.8	1.6*	1.6*	1.3	1.4	1.8	1.1	2.4	1.9

* – uncertainty at a concentration level of 1.61 mg·l⁻¹ was ± 0.3 mg·l⁻¹.**HMF formation**

Concentration of HMF was determined in pineapple juice stored under the described conditions, and its formation was found to be influenced mostly by the presence of hexoses, environmental conditions and the concentration of organic acids and/or final acidity. The determined concentrations of HMF in pineapple juice are presented in Tab. 2.

Very low concentration of HMF in the beginning of experiments confirmed just reasonable pasteurization process, which was also reflected by a very slight increase in the concentration of HMF in juice stored at 7 °C during the long time period of up to 26 weeks. The impact of light at this temperature of storage on HMF formation could be neglected as statistically non-significant ($p = 0.8663$). In view of the high saccharides content of pineapple juice, as well as the above mentioned crucial impact of organic acids on HMF formation, the results confirmed correct technological procedures including pasteurization. Storage temperature could not be underestimated as well, as the elevated temperature could influence transformation of hexoses to fructose or support Maillard reactions progress leading to the generation of acids with lower pK_a values. Taking into account all these factors, the chosen storage temperature of 7 °C and also the exposure of sam-

ples to day light/darkness were safe from the point of view of HMF formation in pineapple juice with small pineapple pieces.

Antioxidant characteristics monitored by EPR and UV-VIS

Results of all experimental characteristics determined by EPR and UV-VIS spectroscopy and their changes in pineapple juice stored at constant temperature and different light conditions are summarized in Tab. 3.

Regarding the changes in TPC concentration, it is obvious that without respect to storage conditions, their concentration in juice slightly decreased during storage until reaching a minimum after 8 weeks in both cases. Subsequently, their concentration increased and reached values almost as high as in the respective reference samples. The changes in TPC concentration were, in accordance with expectations, much more significant for samples stored under day light. Not enough information is available on pineapple juice to properly discuss all the observed phenomena. For orange juice, a gradual decay in TPC concentration of fresh juice resulting from storage, accelerated by the increased temperature, was proposed [28]. On the basis of our results, we can only suppose that, as a result of storage, decomposition occurred, during which the low-molecular-weight

Tab. 3. Antioxidant characteristics of pineapple juice with small pineapple pieces stored at constant temperature ($T = 7$ °C) and different light conditions, determined by UV-VIS and EPR spectroscopy.

Time of storage [week]	TPC [mg·l ⁻¹]		TEAC _{ABTS} ^{•+} [mmol·l ⁻¹]		AAE [mmol·l ⁻¹]	
	Darkness	Day light	Darkness	Day light	Darkness	Day light
0	731.5 ± 5.2	731.5 ± 5.2	2.6 ± 0.0	2.6 ± 0.0	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
2	718.0 ± 6.6	731.4 ± 6.3	2.3 ± 0.0	2.1 ± 0.1	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.01
4	692.1 ± 3.3	655.9 ± 4.0	1.9 ± 0.1	2.2 ± 0.0	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01
8	613.8 ± 5.0	604.1 ± 4.7	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.0	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01
11	641.8 ± 8.1	612.6 ± 0.7	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.0	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
14	696.7 ± 19.8	679.7 ± 11.5	2.0 ± 0.0	2.3 ± 0.1	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.00
26	692.2 ± 5.7	714.9 ± 3.6	1.9 ± 0.0	1.5 ± 0.0	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.00

Values are presented as mean ± standard deviation ($n = 2$).TPC – total polyphenolic compounds, TEAC_{ABTS}^{•+} – Trolox equivalents, AAE – ascorbic acid equivalents.

phenolic compounds were formed. Another aspect that should be taken into account is a known non-specificity of the Folin-Ciocalteu test, as the reactivity of Folin-Ciocalteu reagent components is negatively influenced by the presence of thiols, reducing saccharides and other compounds [29].

Results of ABTS^{•+} tests are depicted on Fig. 2. It is obvious that upon the time of the isothermal storage, a gradual worsening of antioxidant capacity of juice occurred. In accordance with expectations, the decay of TEAC_{ABTS^{•+}} values was much more evident in juice stored under the day light, although some fluctuations in values are obvious, probably caused by juice inhomogeneity resulting from the presence of fruit pieces. The observed decrease of antioxidant capacity of the investigated juice as well as effect of light conditions on the decrease was most probably influenced also by the presence of some trace metals, e.g. Mn, Fe and Cu, determined by microwave plasma-atomic emission spectrometer (data not presented). These metals are either present naturally in fruit juices or their presence results from the processing (cutting, pressurization) and can actively influence the stability of juices via their role in some pro-oxidant processes, e.g. well known Haber-Weiss and Fenton (or Fenton-like) reactions [30, 31]. Even their active role in photo-oxidation processes should not be underestimated.

Tempol assay was selected because of the known sensitive reaction/response of this stable free radical to the presence of, in particular, ascorbic acid and also to other organic acids with a similar redox potential [32–34]. However, in spite of the expectations and losses of ascorbic acid concentration determined by HPLC, the effect of storage conditions on Tempol concentration was quite ambiguous, as in both cases, slight, statistically non-significant decrease upon the time of storage was noticed. Only at the end of the storage period, a significant, 50% and 23% decrease in AAE was confirmed for samples stored under day light conditions and in darkness, respectively. The observed effect can, on the other hand, indicate the existence of dynamic processes in juice, leading to the formation/elimination of compounds/intermediates with anti- and/or pro-oxidant properties. This assumption follows also from the above discussed trends in TPC concentration. As is also already indicated, the homogeneity and composition of the juice could play a key role in changes of the investigated parameters.

Colour characteristics

Colour of fruit and vegetable juices has been traditionally used as an indicator of their physio-

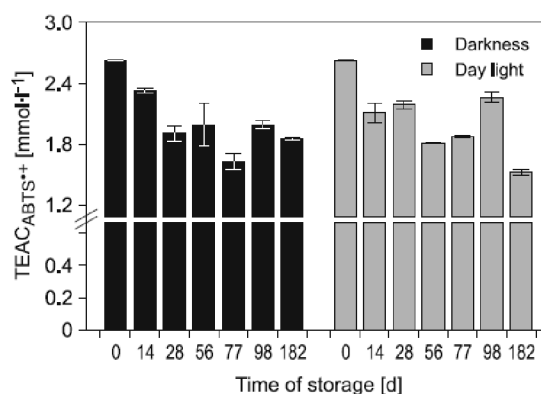


Fig. 2. Average ABTS^{•+} radical-scavenging ability of pineapple juice with pineapple pieces stored at constant temperature ($T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$) and different light conditions characterized by EPR spectroscopy expressed as Trolox-equivalent antioxidant capacity.

Values are presented as mean \pm standard deviation ($n = 2$).

logical state, organoleptic and nutritional quality during the preservation/processing treatment and subsequent storage, as it is connected with the perception of some characteristics that seem to be representative of the quality of processed juices [9]. Some authors suggest that the change in pineapple juice colour is influenced by both non-enzymatic browning and pigment destruction, and the phenomena that occur during heating and storage of pineapple juice can be described by a combined model [35]. As indicated in the experimental part, pineapple juice under study was thermally processed, packaged and stored at different light conditions. All these operations could partially affect colour characteristics of the final product.

In order to quantify the colour changes in pineapple juices caused either by the preparation or their subsequent storage at a temperature of $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ under the different light conditions, total colour difference (ΔE) was evaluated from trichromatic CIE $L^*a^*b^*$ values. The obtained ΔE values as well as trichromatic parameters of pineapple juices are summarized in Tab. 4.

Relatively non-significant changes in L^* values during the storage of pasteurized pineapple juice containing the small pieces of pineapple are apparent from the presented data. In opposite to our findings, the L^* value of thermally pasteurized conventional pineapple or other types of fruit juices decreased significantly upon the storage period [26]. Slight increase of this value was observed in the pasteurized orange juice as a result of partial precipitation of the particles suspended in juice [36]. Juice matrix with addition of small

Tab. 4. Effects of storage of pineapple juice with small pineapple pieces at constant temperature ($T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$) and different light conditions on changes in CIE colour parameters and of colour difference.

Time of storage [week]	Storage conditions								ΔE (darkness–day light)
	Darkness				Day light				
	L^*	a^*	b^*	ΔE	L^*	a^*	b^*	ΔE	
0	97.7 ± 0.05	0.05 ± 0.02	4.78 ± 0.32	–	97.7 ± 0.05	0.05 ± 0.02	4.78 ± 0.34	–	–
2	97.8 ± 0.06	-0.99 ± 0.04	5.39 ± 0.44	1.08	97.8 ± 0.04	-0.49 ± 0.03	4.85 ± 0.37	1.01	-0.07
4	97.7 ± 0.05	-1.98 ± 0.03	4.62 ± 0.37	0.41	97.8 ± 0.06	2.49 ± 0.02	3.48 ± 0.24	1.37	+0.96
8	97.8 ± 0.06	-1.49 ± 0.05	5.57 ± 0.50	1.15	97.7 ± 0.04	-0.49 ± 0.04	6.37 ± 0.41	0.97	-0.18
11	97.7 ± 0.03	-1.14 ± 0.001	6.20 ± 0.28	0.89	97.6 ± 0.02	-0.49 ± 0.02	6.74 ± 0.18	1.56	+0.67
14	97.7 ± 0.04	-0.25 ± 0.02	8.97 ± 0.18	2.54	97.4 ± 0.03	-1.49 ± 0.03	11.6 ± 0.27	5.09	+2.55
16	97.5 ± 0.06	0.49 ± 0.04	10.1 ± 0.25	3.78	97.6 ± 0.05	-0.19 ± 0.02	7.66 ± 0.19	2.01	-1.77
17	97.7 ± 0.04	-0.04 ± 0.02	9.07 ± 0.47	2.60	97.5 ± 0.03	1.34 ± 0.04	10.8 ± 0.22	4.8	+1.58
19	97.8 ± 0.06	-1.39 ± 0.03	8.41 ± 0.33	2.43	97.4 ± 0.04	-1.44 ± 0.001	11.9 ± 0.17	5.27	+1.84
26	97.7 ± 0.05	-0.99 ± 0.04	8.74 ± 0.17	2.91	97.7 ± 0.04	-1.49 ± 0.002	9.57 ± 0.20	4.92	+2.01

Values are presented as mean ± standard deviation ($n = 2$).

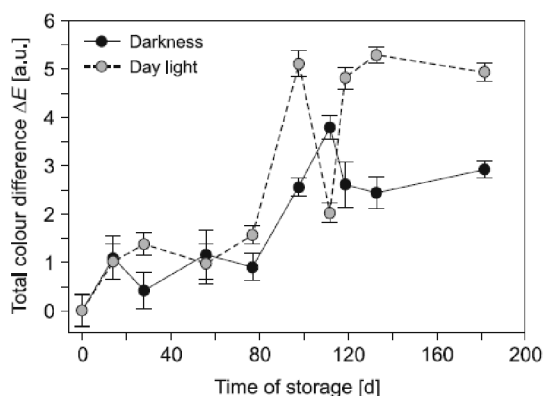
pieces of fruit showed a positive effect in maintaining the lightness of pineapple juices during the storage.

The values of a^* and b^* , or their combined form (parameter chroma [26]), are often reported as criteria for the characterization of colour changes in fruit juices. As follows from the previously published papers, chroma parameter revealed the decreasing tendency for fruit juices treated by thermal treatment or stored at defined conditions [26]. In pineapple juice, a slight decrease of a^* value during the storage was observed compared to the reference sample. Similar shift of a^* value to slightly negative direction was ob-

served by LEE and COATES [24] and CSERHALMI et al. [36] after thermal treatment of orange juice.

Most important changes in colour characteristics of pineapple juice induced by their thermal processing and/or storage were found for the yellowness parameter b^* . In good agreement with observations of CHIA et al. [26], a slight decrease of this value was observed during the 4th week of storage under both light conditions (Tab. 4), but the continuous long-term storage up to 26 weeks after the production led to a significant increase of b^* for both storage conditions. Significantly higher values of yellowness were found for pineapple juice samples stored in the day light conditions in comparison to these stored in darkness. The described changes of b^* significantly affected the values of total colour differences ΔE so that during storage, its gradual increase was found for both storage conditions, although some alterations appeared during the storage interval, as is also obvious from the data depicted on Fig. 3. As expected, the increase in ΔE is more intensive for juices stored under the conditions of day light. Although the approach is not fully appropriate in view of the variability of the evaluated ΔE , calculation of total colour differences using the linear regression data or taking into calculation only the colour characteristics determined for pineapple juice immediately after its preparation and at the end of the storage at chosen temperature, resulted in approx. 60% difference in this parameter between the samples stored in darkness and at day light.

According to classification of colour changes used by CSERHALMI et al. [24], both pasteurization of pineapple juice with small pineap-

**Fig. 3.** Dependence of average total colour difference (ΔE) of pineapple juice with small pieces of pineapple on time of storage at constant temperature ($T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$) and different light conditions.

Values are presented as mean ± standard deviation ($n = 2$).

ple pieces as well as the next short-term storage during 6 weeks caused only slightly noticeable changes ($\Delta E \sim 1.01$). On the other hand, long term storage (up to 26 weeks) induced noticeable colour changes in the juice stored in darkness (ΔE from 0.4 to 3.8), while for the juice stored at day light, well visible differences with ΔE above 6 were observed. These values are practically comparable to those reported previously for orange juice pasteurized and stored for 6 weeks at 2 °C ($\Delta E = 11.35$), canned strawberries after 24 weeks of storage at ambient conditions (ΔE from 13 to 20) or for orange juice gently treated by high-intensity pulsed electric fields technology and stored for 6 weeks at 2 °C ($\Delta E = 9.7$) [10].

CONCLUSION

Complex characterization of pineapple juices with addition of small pieces of pineapple fruit from the point of the losses of ascorbic acid, changes in antioxidant status and colour perception as well as the formation of HMF resulting from the storage at constant temperature and different light conditions upon 26 weeks was performed. This information is rather new as only limited information on the properties of fresh juice was available and information regarding the juice with addition of small fruit pieces was fully missing. Original results obtained clearly show that sample composition, processing but also storage conditions have significant effects on the juice shelf life as well as on its quality and other properties important for decision-making process of their potential consumers.

Acknowledgement

This publication is the result of the project "Improvement of nutritional and sensorial parameters of fruity and vegetable drinks via an inert gases application – ITMS 26220220175" implementation, supported by the Research and Development Operational Programme funded by the European Regional Development Fund. McCarter Ltd. (Dunajská Streda, Slovakia) is gratefully acknowledged for cooperation and samples provision.

REFERENCES

1. Mahdavi, R. – Nikniaz, Z. – Rafrat, M. – Jouyban, A.: Determination and comparison of total polyphenol and vitamin C contents of natural fresh and commercial fruit juices. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9, 2010, pp. 968–972.
2. Po, L. O. – Po, E. C.: Tropical fruit I: banana, mango, and pineapple. In: Sinha, N. K. – Sidhu, J. S. – Bar-
ta, J. – Wu, J. S. B. – Cano, M. P. (Ed.): *Handbook of fruits and fruit processing*. 2nd edition. Oxford: John Wiley and Sons, 2012, pp. 565–589. ISBN 978-8-8138-0894-9.
3. Rickman, J. C. – Barrett, D. M. – Bruhn, C. M.: Review: Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2007, pp. 930–944.
4. Bates, R. P. – Morris, J. R. – Crandall, P. G.: *Principles and practices of small- and medium-scale fruit juice processing*. FAO Agricultural Services Bulletin 146. Rome: Food and Agriculture Organization, 2001. 221 pp. ISBN 92-5-104661-1.
5. Ashurst, P. R.: *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. Oxford: John Wiley and Sons, 2005. 392 pp. ISBN 1-4051-2286-2.
6. Lozano, J. E.: *Fruit manufacturing. Scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance*. New York: Springer, 2006. 244 pp. ISBN 978-0387-30614-8.
7. Tzika, E. D. – Papadimitriou, V. – Sotiroudis, T. G. – Xenakis, A.: Antioxidant properties of fruits and vegetables shots and juices: An electron paramagnetic resonance study. *Food Biophysics*, 3, 2008, pp. 48–53.
8. Laorko, A. – Tongchitpakdee, S. – Youravong, W.: Storage quality of pineapple juice non-thermally pasteurized and clarified by microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 116, 2013, pp. 554–561.
9. Barba, F. J. – Esteve, M. J. – Frígola, A.: High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 2012, pp. 307–322.
10. Cortés, C. – Esteve, M. J. – Frígola, A.: Color of orange juice treated by high intensity pulsed electric fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food Control*, 19, 2008, pp. 151–158.
11. Igual, M. – García-Martínez, E. – Camacho, M. M. – Martínez-Navarrete, N.: Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 118, 2010, pp. 291–299.
12. Ioannou, I. – Hafsa, I. – Hamdi, S. – Charbonnel, C. – Ghoul, M.: Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *Journal of Food Engineering*, 111, 2012, pp. 208–217.
13. de Souza, R. L. – Yue, H. – Rataboul, F. – Essayem, N.: 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) production from hexoses: limits of heterogeneous catalysis in hydrothermal conditions and potential of concentrated aqueous organic acids as reactive solvent system. *Challenges*, 3, 2012, pp. 212–232.
14. Lee, Y. C. – Shlyankevich, M. – Jeong, H. K. – Douglas, J. S. – Surh, Y. J.: Bioactivation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde to an electrophilic and mutagenic allylic sulfuric acid ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209, 1995, pp. 996–1002.

15. Vyhláška č. 41/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky z 26. januára 2012 o mede. Zbierka zákonov SR, 2012, No. 13, pp. 346–349.
16. Moßhammer, M. R. – Stintzing, F. C. – Carle, R.: Evaluation of different methods for the production of juices concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 2006, pp. 275–287.
17. Lo, C. F. – Novelli, V. – Valentini, C. – Ceccon, L.: High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in fruit juices. *Journal of Chromatographic Science*, 35, 1997, pp. 578–583.
18. Code of practice for evaluation of quality and authenticity of fruit and vegetable juices. In: AIJN – European Fruit Juice Association [online]. Rue de la Loi: Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union, sine dato [cit. 6 February 2012]. <<http://www.aijn.org/pages/cop/intro-more.html>>.
19. Horváth-Kerkai, E. – Steger-Máté, M.: Manufacturing fruit beverages and concentrates: In: Sinha, N. K. – Sidhu, J. S. – Barta, J. – Wu, J. S. B. – Cano, M. P. (Ed.): *Handbook of fruits and fruit processing*, 2nd edition, Oxford: John Wiley and Sons, 2012, pp. 215–228. ISBN 978-8-8138-0894-9.
20. Nozal, M. J. – Bernal, J. L. – Toribio, L. – Jiménez, J. J. – Martín, M. T.: High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, 917, 2001, pp. 95–103.
21. Miller, J. C. – Miller, J. N.: *Statistics for analytical chemistry*. 3rd edition. New York: Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1993. 233 pp. ISBN 0-13-030990-7.
22. Polovka, M. – Šťavíková, L. – Hohnová, B. – Karásek, P. – Roth, M.: Offline combination of pressurized fluid extraction and electron paramagnetic resonance spectroscopy for antioxidant activity of grape skin extracts assessment. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2010, pp. 7990–8000.
23. Caminiti, I. M. – Noci, F. – Morgan, D. J. – Cronin, D. A. – Lyng, J. G.: The effect of pulsed electric fields, ultraviolet light or high intensity light pulses in combination with manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 2012, pp. 442–448.
24. Cserhalmi, Z. – Sass-Kiss, Á. – Tóth-Markus, M. – Lechner, N.: Study of pulsed electric field-treated citrus juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 2006, pp. 49–54.
25. Shaw, P. E.: Shelf life and aging of citrus juice, juice drinks and related soft drinks: In: Redd, J. B. – Hendrix, C. M. – Hendrix, D. L. (Ed.): *Quality control manual for citrus processing plants*. Volume 2. Agscience: Auburndale, 1992, p. 290. ISBN 0963139703.
26. Chia, S. L. – Rosnah, S. – Noranizan, M. A. – Wan Ramli, W. D.: The effect of storage on the quality attributes of ultraviolet-irradiated and thermally pasteurised pineapple juices. *International Food Research Journal*, 19, 2012, pp. 1001–1010.
27. Uckiah, A. – Goburdhun, D. – Ruggoo, A.: Vitamin C content during processing and storage of pineapple. *Nutrition and Food Science*, 39, 2009, pp. 398–412.
28. Klimczak, I. – Malecka, M. – Szlachta, M. – Gliszczyńska-Świgło, A.: Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 2007, pp. 313–322.
29. Everette, J. D. – Bryant, Q. M. – Green, A. M. – Abbey, Y. A. – Wangila, G. W. – Walker, R. B.: Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2010, pp. 8139–8144.
30. Franke, S. I. R. – Prá, D. – Guilian, R. – Dias, J. F. – Yoneama, M. L. – da Silva, J. – Erdtmann, B. – Henriques, J. A. P.: Influence of orange juice in the levels and in the genotoxicity of iron and copper. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 2006, pp. 425–435.
31. Tormen, L. – Torres, D. P. – Dittert, I. M. – Araújo, R. G. O. – Frescura, V. L. A. – Curtius, A. J.: Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 2011, pp. 95–102.
32. Brezová, V. – Polovka, M. – Staško, A.: The influence of additives on beer stability investigated by EPR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 58, 2002, pp. 1279–1291.
33. Vislisel, J. M. – Schafer, F. Q. – Buettner, G. R.: A simple and sensitive assay for ascorbate using a plate reader. *Analytical Biochemistry*, 365, 2007, pp. 31–39.
34. Biradar, K. V. – Patil, C. B. – Chivde, B. V. – Shiramane, R. S. – Rao, S. K.: Effect of vitamin C, vitamin E and superoxide dismutase mimetic Tempol on dexamethasone induced experimental weight loss in wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 2, 2011, pp. 740–743.
35. Rattanathanalerk, M. – Chiewchan, N. – Srichumpoung, W.: Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. *Journal of Food Engineering*, 66, 2005, pp. 259–265.
36. Lee, H. S. – Coates, G. A.: Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *LWT - Food Science and Technology*, 36, 2003, pp. 153–156.

Received 18 February 2013; 1st revised 27 March 2013; 2nd revised 6 May 2013; accepted 9 July 2013.

Příloha 3. TOBOLKOVÁ, B.; POLOVKA, M.; SUHAJ, M. Differentiation of Slovak organic and conventional wines and grape musts on the basis of their EPR and UV-VIS-NIR characteristics by means of multivariate statistics. Manuscript zaslaný do *Food Chemistry*. 2013.

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCHEM-D-12-04931R2

Title: Differentiation of Slovak organic and conventional wines and grape musts on the basis of their EPR and UV-VIS characteristics by means of multivariate statistics

Article Type: Analytical Methods Article

Keywords: Organic wines; conventional wines; grape musts; differentiation; EPR spectroscopy; UV-VIS spectroscopy; multivariate statistics

Corresponding Author: Dr. Martin Polovka, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: VUP Food Research Institute

First Author: Blanka Tobolková, MSc.

Order of Authors: Blanka Tobolková, MSc.; Martin Polovka, Ph.D.; Milan Suhaj, Dr.

Abstract: Possibilities of the application of EPR and UV-VIS spectroscopy for the purposes of differentiation and authentication of group of 33 conventional and 25 organic Slovak wines and 12 grape musts were tested utilizing several assays including total phenolic compounds content, thiobarbituric acid reactive substances number, ferric reducing power, ABTS*+ and DPPH*, employed both by UV-VIS and EPR. In the later, also TEMPOL radical assay and *OH-radical generating system was involved in antioxidant activity tests. On the basis of spectral characteristics, successful differentiation of white and red wine samples was achieved according to the way of production by means of canonical discrimination, reaching 97.4% and 94.7% correctness, respectively. The prediction ability proved 97.2 and 90% correctly classified samples, respectively. Also kth nearest neighbor classification of white and red wines according to the way of production possessed very promising results (100% for k=1, 87.2%/84.2% for k=2 and 92.3%/73.7% for k=3). Successful differentiation was also obtained for grape musts, reaching in all assays more than 80% correctness.

Differentiation of Slovak organic and conventional wines and grape musts on the basis of their EPR and UV-VIS-NIR characteristics by means of multivariate statistics

Blanka Tobolková^{a,b}, Martin Polovka^{*a}, Milan Suhaj^a

^aDepartment of Chemistry and Food Analysis, VUP Food Research Institute, PO BOX 25, Priemysel'ná 4, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic

^bBrno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic. E-mail addresses: tobolkova@vup.sk; polovka@vup.sk, suhaj@vup.sk

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +421 2 5023 7195. Fax: +421 2 5557 1417. E-mail: polovka@vup.sk (M. Polovka). Postal address: Department of Chemistry and Food Analysis, VUP Food Research Institute, Priemysel'ná 4, P.O. Box 25, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic

Abstract

Possibilities of the application of EPR and UV-VIS spectroscopy for the purposes of differentiation and authentication of group of 33 conventional and 25 organic Slovak wines and 12 grape musts were tested utilizing several assays including total phenolic compounds content, thiobarbituric acid reactive substances number, ferric reducing power, ABTS^{•+} and DPPH[•], employed both by UV-VIS and EPR. In the later, also TEMPOL radical assay and [•]OH-radical generating system was involved in antioxidant activity tests. On the basis of spectral characteristics, successful differentiation of white and red wine samples was achieved according to the way of production by means of canonical discrimination, reaching 97.4% and 94.7% correctness, respectively. The prediction ability proved 97.2 and 90% correctly classified samples, respectively. Also k^{th} nearest neighbor classification of white and red wines according to the way of production possessed very promising results (100% for $k=1$, 87.2%/84.2% for $k=2$ and 92.3%/73.7% for $k=3$). Successful differentiation was also obtained for grape musts, reaching in all assays more than 80% correctness.

Highlights

- EPR for the first time applied for wines differentiation according to the way of production
- Unique combination of EPR,UV-VIS and multivariate statistics for wine classification
- High classification correctness on the basis of spectral characteristics

Key words

Organic wines; conventional wines; grape musts; differentiation; EPR spectroscopy; UV-VIS spectroscopy; multivariate statistics.

1. Introduction

Organic farming practices are of growing interests of both scientific community and consumers, as the result of consumers' demands on high-quality product from microbiological, nutritional and health-beneficial points of view (Dangour, Dodhia, Hayter, Allen, Lock, & Uauy, 2009; Lairon, 2011; Matt, Rembiałkowska, Luik, Peetsmann, & Pehme, 2011; Stolz, Stolze, Hamm, Janssen, & Ruto, 2011). Quite widely spread sector of organic agriculture represents viticulture, with its primary aim to improve the wine quality including the development of intensive and balanced flavor (Gladstones, 2011; Rombough, 2002).

It is widely accepted that grape berries and wines offer many health benefits and pharmacological effects, at the same time slowing down the progress of some neurological degenerative disorders. These effects have been traditionally attributed especially to the content of polyphenolic compounds (e.g., resveratrol, catechin or anthocyanins), revealing also biological effects including antioxidant activity (Basli, Soulet, Chaher, Mérrillon, Chibane, Monti, et al., 2012; Ebrahimi & Schluesener, 2012; Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2012; Li, Gong, Dong, & Shi, 2012). The quantities and composition of phenolic compounds vary with varietal differences, level of ripening of grape berries, geographical region of origin or growing conditions. Last but not least, the differences in winemaking practices may represent also determining factor in modulation of polyphenols composition (Basli, et al., 2012; Callejona, Clavijob, Ortigueirac, Troncoso, Panequeb, & Morales, 2010; Kontoudakis, Esteruelas, Fort, Canals, & de Freitas, 2011; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2009; Mulero, Zafrilla, Cayuela, Martínez-Cachá, & Pardo, 2011; Pérez-Magariño & González-San José, 2006; Villaño, Fernández-Pachón, Troncoso, & García-Parrilla, 2006).

Although the factors affecting polyphenolic composition of wine have been discussed in numerous papers, there are only few studies focused on how organic cultivation practices influence the phenolics composition and total antioxidant activity of grapes and related products, including wines and musts. Most of the published data confirmed that both organic grapes and wines possessed higher antioxidant activity than their conventional counterparts, and this activity positively correlate with total polyphenols content (Bunea, Pop, Babeş, Matea, Dulf, & Bunea, 2012; Dani, Oliboni, Vanderlinde, Bonatto, Salvador, & Henriques, 2007; Machado, dos Santos Montagner, Boligon, Athayde, da Rocha, Lera, et al., 2011; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2009; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2010; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011; Yıldırım, Akçay, Güvenç, Altındışli, & Sözmen, 2005). On the other hand, also negative correlation between these two parameters was confirmed by Corrales et al. (Corrales, Fernandez, Pinto, Butz, Franz, Schuele, et al., 2010). Some authors pointed that organic grapes and wines were characterized by higher anthocyanins and resveratrol contents (Dani, Oliboni, Vanderlinde, Bonatto, Salvador, & Henriques, 2007; Machado, et al., 2011; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2010; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011), while organic grape juices exhibited the lower caloric and carbohydrates value, but the higher ascorbic acid content as compared to conventional juices (Dani, Oliboni, Vanderlinde, Bonatto, Salvador, &

Henriques, 2007). Ambivalent trend was observed in the chemical composition of wines (i.e., ethanol content, pH value, total acidity or volatile acidity), in relationship to the system (way) of grape's cultivation (Cozzolino, Holdstock, Damberg, Cynkar, & Smith, 2009; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2009; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2010).

Apart from polyphenols, also minerals and essential elements concentration may be affected by the way of grapes cultivation. However, only few studies were focused on the discrimination of organic and conventional wines on the basis of differences in multi-elemental composition. (Koreňovská & Suhaj, 2012; Provenzano, El Bilali, Simeone, Baser, Mondelli, & Cesari, 2010; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011).

Limited number of studies focused on the differences in organic and conventional grapes and wines from residues of pesticides as well as biogenic amines content points of view, reaching an expected result that pesticide residues were detected only in conventional wines, which possessed also the higher concentration of some biogenic amines (Corrales, et al., 2010; Henríquez-Aedo, Vega, Prieto-Rodríguez, & Aranda, 2012; Soufleros, Bouloumpasi, Zotou, & Loukou, 2007; Turgut, Ornek, & Cutright, 2011; Yañez, Saavedra, Martínez, Córdova, & Ganga, 2012; Yildirim, Üren, & Yücel, 2007).

In connection with organic viticulture development, the legitimate demands on quality control and authenticity verification of organic grapes and wines have arisen. Several methods have been introduced to monitor differences between the organically and conventionally produced wines. However, up to the present, none of them has been validated neither as authentication method nor method applicable for differentiation of wines according to the way of production. Therefore, there is an urgent need to find objective markers allowing clear distinction of both types of wines.

Due to a wider scale of methods that are usually involved in the studies aimed on wines characterization and classification from various aspects, the obtained experimental characteristics typically represent a complex matrix of variables. Thus, multivariate statistical analysis is effectively utilized for the purposes of wine identification or classification, mainly in terms of variety and geographical region of origin.

Methods of AAS, ICP and mid-infrared (MIR) spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis were previously successfully applied for the discrimination of organically and conventionally produced wines by several authors (Cozzolino, Holdstock, Damberg, Cynkar, & Smith, 2009; Koreňovská & Suhaj, 2012; Provenzano, El Bilali, Simeone, Baser, Mondelli, & Cesari, 2010; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011).

Quite frequent is the application of different chromatographic systems, based on the screening of the presence and concentrations of individual phenolic compounds and/or their fractions or monitoring of the biogenic amines presence. Most frequently, high performance liquid chromatography (HPLC) is being applied (Bunea, Pop, Babeş, Matea, Dulf, & Bunea, 2012; Corrales, et al., 2010; Dani, Oliboni, Vanderlinde, Bonatto, Salvador, & Henriques, 2007; Henríquez-Aedo, Vega, Prieto-Rodríguez, & Aranda, 2012; Machado, et al., 2011; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2010; Rastija, Srećnik, & Marica-Medić-Šarić, 2009; Soufleros, Bouloumpasi, Zotou, & Loukou, 2007; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011; Yañez, Saavedra, Martínez, Córdova, & Ganga, 2012). Besides that, gas chromatography (GC) was also effectively involved in measurement of pesticide residues in organic wines (Corrales, et al., 2010; Turgut, Ornek, & Cutright, 2011).

The most promising results in terms of wine differentiation were achieved by examining the differences in some chemical compounds content, e.g. minerals or phenolic compounds, using various spectroscopic methods including atomic absorption spectroscopy (AAS), inductively coupled plasma (ICP), infrared (IR) and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), or mass spectrometry (MS) (Cozzolino, Holdstock, Damberg, Cynkar, & Smith, 2009; de Villiers, Alberts, Tredoux, & Nieuwoudt, 2012; Koreňovská & Suhaj, 2012; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011).

In connection with changes in chemical composition, antioxidant properties of wines are often taken as a parameter of classification. For these purposes, UV-VIS are frequently used (Bunea, Pop, Babeş, Matea, Dulf, & Bunea, 2012; Corrales, et al., 2010; Dani, Oliboni, Vanderlinde, Bonatto, Salvador, & Henriques, 2007; Machado, et al., 2011; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2010; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011). Besides the UV-VIS, electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is considered to be one of the most efficient tools in terms of wine's radical-scavenging or antioxidant activity characterization. Although numerous papers have dealt with comparison of antioxidant characteristics of grapes and wines by means of EPR, to the best of our knowledge, no report was found about the discrimination of organic and conventional wines using EPR spectroscopy.

In this study, the differentiation of Slovak organic and conventional red and white wines and grape musts on the basis of assessment their antioxidant characteristics and other spectral parameters was performed. For the first time EPR spectroscopy in combination with UV-VIS was used to possess markers for wines and musts discrimination. The entire dataset of the so-obtained experimental characteristics was subsequently processed by multivariate statistical methods, involving principal component analysis (PCA), principal component factoring (PCF), as well as canonical and k^{th} neighbor discrimination and classification in order to test the possibilities of organic and conventional wines and grape musts differentiation with very promising results.

2. Material and methods

2.1 Samples characterization

Properties of 33 conventional (*C*) and 25 organic (*B*) red (*R*) and white (*W*) wine samples of the Slovak origin from neighboring wine production regions Veľký Krtíš and Modrý Kameň located on the mid-south part of the Slovak territory were evaluated. Wines are of different vintages, from 2002 to 2011 (collected from the cooperating producers in a way to obtain as much representative samples as even possible); for comparison of their properties, samples of the same variety and vintage (here-in referred as pair samples) were used; it should be noted here that wherever possible, also the type of wine was taken into consideration.

Besides that, properties of 12 samples of grape musts (6 conventional, *MC* and 6 organic, *MB*) prepared from the organically and conventionally grown grapes harvested in 2010 and 2011 from the identical producers as in case of wines were assessed. Detailed description of all the samples under study is presented in Table 1 together with their basic characteristics (year of production, type, character). As due to the diverse variety of samples, not only the effect of farming condition, but also effect of year of vintage was evaluated.

2.2 Chemicals

In the experiments, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), freshly distilled before use and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ under argon (Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($^{\bullet}\text{DPPH}$, Fluka, Buchs, Switzerland), 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (Tempol, Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) salt (ABTS, Polysciences, Inc., Warrington, PA), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Merck GmbH, Darmstadt, Germany), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), gallic acid of analytical grade purity (Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), thiobarbituric acid (Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), trichloroacetic acid (Merck, Hohenburn, Germany), potassium hexacyanoferrate(III) p.a. (Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI) ferric chloride p.a. (Merck, Hohenburn, Germany), sodium carbonate (Lachema, Brno, Czech Republic), ascorbic acid of analytical grade purity (Lachema, Brno, Czech Republic), phosphate buffer (prepared by mixing 4 ml of 0.0667M KH_2PO_4 with 6 ml 0.0667M Na_2HPO_4 , pH= 6.98) as well as ethanol of spectroscopic grade purity (AFT, Bratislava, Slovak Republic), and deionized water were used.

2.3 UV-VIS experiments

The entire UV-VIS experiments were performed using UV-VIS-NIR spectrophotometer Shimadzu 3600 with accessory. The experiments were performed in duplicates.

2.3.1 ABTS $^{+\bullet}$ / $^{\bullet}\text{DPPH}$ radical-scavenging assay

Radical-scavenging activities of wine samples were determined using the solutions of stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($^{\bullet}\text{DPPH}$) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) cation radical (ABTS $^{+\bullet}$), respectively, prepared according to the modified method of Re et al. (Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, & Rice-Evans, 1999). Briefly, 900 μl of wine sample was mixed directly in quartz cuvette with exactly 2.1 ml of 0.1 mM solution of $^{\bullet}\text{DPPH}$ in ethanol and 0.1 mM solution of ABTS $^{+\bullet}$, respectively, purged with air to mix the solution properly, and within 3 s after the radical addition, the measurement started, recording the absorbance of the solution at 515 nm ($^{\bullet}\text{DPPH}$) and 730 nm (ABTS $^{+\bullet}$) for 15 min in 1 cm quartz cuvette. As a reference, 12% ethanol aqueous solution and distilled water was used, for wines and grape musts, respectively.

2.3.2 Total phenolic compounds (TPC) content

Total phenolic compounds content was determined applying Folin-Ciocalteu modified method (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004). 200 μl of wine sample diluted by 12% ethanol aqueous solution, 15.8 ml of distilled water and 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent were mixed. After 10 min, 3 ml of 20% sodium carbonate was added and after 60 min, the absorbance of final solution was measured at 765 nm in 1cm quartz cuvette. Standard solutions of Gallic acid were used for calibration curve construction and the results were expressed as gallic acid equivalents (GAE, $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

2.3.3 Thiobarbituric acid number

The formation of oxidative reaction products was monitored according to the modified method of Zin et al. and results obtained were expressed as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) number (Zin, Hamid, Osman, & Saari, 2006). Briefly, 20 % trichloroacetic acid (2 ml) and 0.67% thiobarbituric acid (2 ml) were added to 1 ml of respective wine sample. This mixture was then placed into a water bath heated at temperature $95\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. After cooling to room temperature, the suspension was centrifuged at 3000 rpm for 20 min. Absorbance of supernatant was then measured at 532 nm. As reference, 12% ethanol aqueous solution and distilled water was used, for both wines and grape musts.

2.3.4 Ferric reducing power

The capability of wine samples to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} was determined according to the method of Chyau et al. (Chyau, Tsai, Ko, & Mau, 2002). Respective wine sample (2 ml) was mixed with 2 ml of 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) and 2 ml of 1% potassium hexacyanoferrate(III), and the mixture was incubated at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. Then, 2 ml of 10% trichloroacetic acid was added and the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Upper layer (500 μl) was mixed with 2.5 ml of distilled water and 100 μl of 0.1% ferric chloride (for white wines and grape musts) directly in quartz cuvette. In case of red wines, 100 μl of supernatant, 2.9 ml of distilled water and 20 μl of ferric chloride were mixed. The absorbance at 700 nm was measured after 100 s.

2.4 EPR experiments

All experiments were performed using a portable X-band EPR spectrometer e-scan (Bruker Biospin, GmbH, Karlsruhe, Germany) with accessory. The experiments were performed in duplicates. The experimental EPR spectra processing, evaluation and simulation was carried out using WIN EPR and SimFonia programs (Bruker) as described e.g., in (Polovka & Suhaj, 2010; Polovka, Šťáviková, Hohnová, Karásek, & Roth, 2010). Numerical values obtained were expressed as mean \pm SD (n=2).

2.4.1 Radical-scavenging activity assays

Exactly 300 μl of respective sample was mixed either with 700 μl of $^{\bullet}\text{DPPH}$ solution in ethanol (initial concentration, $c_{0(\bullet\text{DPPH})}=0.1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), or the solution of ABTS $^{+\bullet}$ in water (initial concentration, $c_{0(\text{ABTS}^{+\bullet})}=0.1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). The mixture was purged with 2 ml of air and immediately transferred into the EPR flat cell. EPR measurements started exactly 3 min. after the $^{\bullet}\text{DPPH}$ or ABTS $^{+\bullet}$ addition and a set of 10 EPR spectra was recorded in time domain during 15 min. In case of TEMPOL assay, exactly 700 μl of sample was mixed with 300 μl of TEMPOL solution in water (initial concentration, $c_{0\text{TEMPOL}}=0.1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) and the identical procedure as described above was used. Every EPR spectrum represents an

average of 30 individual scans. The experiments were performed in duplicates. As a reference, 12% ethanol aqueous solution and distilled water was used.

2.4.2 Antioxidant activity assay

To test the antioxidant activity of wine samples, hydroxyl radicals were generated by chemical reaction directly in the experimental system. For these purposes, thermal decomposition of $K_2S_2O_8$ radical initiator was used as previously suggested by Staško et al. (Staško, Brezová, Liptáková, & Šavel, 2000; Staško, Polovka, Brezová, Biskupič, & Malík, 2006). As the so-formed radicals have limited stability to be detected directly, spin trapping method was used, employing 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) as spin trap. Aqueous solutions of 100 μ l DMPO (25 μ l/840 μ l distilled water), 200 μ l 0.1 M sodium phosphate buffer (pH = 7), 250 μ l 0.1 M $K_2S_2O_8$ and 300 μ l of respective wine/grape must sample were mixed together, then purged with 2 ml of air and immediately transferred into the EPR flat cell. The time course of EPR spectra was monitored for 30 min. As reference, 12% ethanol aqueous solution and distilled water was used, for wines and grape musts, respectively.

2.5 Processing of experimental data

To compare the results of different assays, radical-scavenging properties of wine monitored either by UV-VIS or EPR in the presence of \cdot DPPH and ABTS $^{+\cdot}$ radicals were expressed as Trolox-equivalents (TEACs), in the same manners as previously described e.g. by Polovka, et al. (Polovka, Šťavíková, Hohnová, Karásek, & Roth, 2010)

Results of TEMPOL assay are presented as Ascorbic acid equivalents (AAE, $mmol.l^{-1}$). Re-calculation was performed by means of calibration curve constructed from standard solutions of ascorbic acid within the concentration range of $c_{(AA)} = 0 - 8.5 \cdot 10^{-4} mol.l^{-1}$, taking into consideration the intensity of EPR spectrum recorded exactly 10.5 min after mixing the TEMPOL with sample or standard.

It should be noted here, that for the purposes of quantification of the antioxidant and radical-scavenging activity of wines and musts samples in ABTS, DPPH and TEMPOL assay, two approaches were used – in the first, TEACs and AAE values were evaluated as described above, and in the 2nd the observed decrease in respective EPR signal was fitted to the model of first-order kinetics and formal first-order rate constants, $k_{ABTS^{+\cdot}}$, k_{DPPH} , and k_{TEMPOL} were evaluated, reflecting the ability of wine samples/musts to terminate either ABTS $^{+\cdot}$, \cdot DPPH or TEMPOL radicals (Polovka & Suhaj, 2010). These parameters were also used for the purposes of wines and musts differentiation.

In case of \cdot OH radicals generating system, the relative value of radicals scavenged (% RS) was calculated. For these purposes, the intensity of 1st and 15th EPR spectrum recorded exactly 30 min after $K_2S_2O_8$ addition into experimental system was taken into account, using the following equation:

$$\%RS = \left(1 - \frac{I_{sp(15)} - I_{sp(1)}}{I_{ref(15)} - I_{ref(1)}} \right) * 100 \quad (3)$$

where $I_{sp/ref(15)}$ represents an intensity of 15th EPR spectrum of sample or reference;
 $I_{sp/ref(1)}$ represents an intensity of 1st EPR spectrum of sample or reference.

2.6 Multivariate statistical analysis

For the purposes of distinguishing the organic and conventional wines as well as grape musts, discriminant procedure was realized by means of Unistat[®] statistical package (Unistat, London, United Kingdom) using the entire dataset of experimental characteristics determined by EPR and UV-VIS, involving methods of principal component analysis (PCA), principal component factoring (PCF), canonical discrimination analysis (CDA) as well as k^{th} nearest neighbor classification, the last mentioned especially in case when experimental data matrix singularity was barrier for CDA discrimination. The convergence criteria of discriminant analysis were chosen for a standardized proximity matrix with maximum number of iterations, 50. The following stepwise selection criteria were used: tolerance – 0.001, F statistic: F to enter – 3.8416, F to remove – 2.7056. The recognition ability of discriminant model was determined as the percentage of the correctly classified samples in the training data set. In addition, the predictability was tested, as the percentage of the samples correctly classified in the leave-multiple-out cross-validation approach as suggested by Berrueta et al. (Berrueta, Alonso-Salces, & Héberger, 2007).

3. Results and Discussion

3.1 Basic characteristics of wines and grape musts

3.1.1 Wines

With respect to presupposed influence of grapes growing conditions on the content of polyphenolic compounds, as part of the study, the total content of polyphenols in both, wines and grape musts was evaluated and the results were expressed as gallic acid equivalents (GAE). The obtained TPC values are presented in Table 2. As expected, great variability of the values is obvious. In accord with anticipation, clear difference in the content of total polyphenols was confirmed between the red and white wines, dependent also on grape variety.

Comparison of the results for organic and conventional wines without respect on variety showed that generally higher averaged TPC content was confirmed in conventional samples, with exception for Blaufränkisch; for which organic wines possessed slightly higher averaged content of polyphenols. It should be noted that this trend is also influenced by samples collection, i.e., availability and variability of samples of individual varieties; however, the above-described effects of winemaking practices may also influence polyphenols composition and concentration.

Looking on TPC content of corresponding pair samples (samples of identical varietal composition and vintage belonging to different production system), the differences between the organic and conventional samples have not a clear trend, as ambivalent results were obtained.

The effect of different vintage on TPC content is also obvious – e.g., for Pinot Blanc *BW9/CW14* and *BW11/CW19*, and Cabernet Sauvignon *BR21/CR26* and *BR25/CR32*. Of course, these findings should be related to wine composition (especially to residual sugar and alcohol content).

Variability in TPC content is also obvious when wines of the same variety and vintage but of different batches are compared (i.e., *BR21* & *BR23* for Cabernet Sauvignon, *BW7* & *BW9* for Pinot Blanc and *BR20* & *BR22* for Pinot Noir samples). Clear differences in TPC values of wines of different batches confirm an important role of processing and post-processing operations with wines, including fining, stabilization and storage on their properties.

Regarding the TBARS values, again clear difference between the red and white wines is obvious, more evident for samples of organic ones. For white organic wines, typically lower TBARS values (in most cases up to 0.6) were determined, as clearly follows from data present in Table 2, while for red ones values up to 4.0 were found. In addition, in case of conventional white wines, the higher variability in TBARS values was observed, in some cases, the values were even comparable to that belonging to red wines.

Comparison of pair samples indicated that for red organic wines, in majority of cases increased TBARS values were found; while in case of white wines, the difference between the organic and conventional wines either disappeared or the reversed trend was observed. Again, these results are influenced by the samples variability. Obvious is also the effect of different vintage and composition of wine (alcohol and sugar content) on TBARS values.

Clear difference between the red and white wines was also confirmed for the values of ferric reducing power, reflecting the reduction capability of the investigated samples. In view of fact, that the differences between the conventional and organic wines are only minimal or negligible, it can be concluded that this parameter do not allow clear differentiation of samples according to the way of production.

Pair wine samples are characterized either by higher FRP values found for conventional wines (e.g., Pinot Blanc *BW7/CW7* & *BW9/CW14*, Cabernet Sauvignon *BR25/CR32*, Chardonnay *BW18/CW21*, Roter Traminer *BW3/CW3* & *BW17/CW20*), or the differences are only minimal. In some cases, even the reverse trend was observed (e.g., for Blaufränkisch *BR19/CR22* and Cabernet Sauvignon *BR21/CR26*).

The influence of vintage is ambivalent. It should be noted here that identical wine samples of different batches revealed practically identical FRP values, exception for Cabernet Sauvignon samples *BR21/BR23*, for which also the significant difference of TPC content was found as pointed above.

3.1.2 Grape musts

Although the number of must samples is limited, in fact 5 pairs could be taken for comparison from varietal differences, way of production as well as vintage concerns. Comparison of values of TPC as well as TBARS values of musts from organic and conventionally grown grapes (Table 2) indicates that there is obvious tendency, as except for pair samples *MB04/MC04* typically higher TPC content in musts from organically grown grapes was found, the same for TBARS values. FRP values of musts samples revealed higher variability, as in 2 cases either comparable values or higher reducing power of conventional must samples was determined. As is also obvious, musts from the same grape variety, i.e., Cabernet Sauvignon and Pinot Noir exhibited significant differences in all three parameters, in some cases, the differences reached even approx. 100%. Differences in FRP for the same grape variety of different vintage are much higher than the differences between the samples of organic and conventional origin of identical vintage and variety.

The above- presented results fully confirmed important effect of season of production on grapes properties. It could at the same time significantly affect the differentiation of organic and conventional musts and wines on the basis of TPC, TBARS or FRP values, if taken as markers of origin.

3.2 Antioxidant characteristics of grape musts and wines assessed by UV-VIS

It is generally accepted fact that the content of polyphenols in samples directly affects also their antioxidant or radical-scavenging ability (Bunea, Pop, Babeş, Matea, Dulf, & Bunea, 2012; Machado, et al., 2011; Mulero, Pardo, & Zafrilla, 2010; Vrček, Bojić, Žuntar, Mendaš, & Medić-Šarić, 2011).

As already indicated in the experimental part, for the purposes of easier comparison of properties of wine and must samples, their radical-scavenging ability towards \cdot DPPH and \cdot ABTS⁺ radicals was expressed in terms of Trolox-equivalents (TEACs).

3.2.1 Wine samples

As expected, TEAC values evaluated from both, \cdot ABTS⁺ and \cdot DPPH clearly demonstrated the difference between the red and white wines, without respect on whether organic or conventional, revealing better radical-scavenging properties of red wines.

Interesting is the comparison of TEAC values from affiliation of wine to production system point of view. As is obvious from the comparison of data present in Table 2, conventional white wines are characterized in general by slightly higher TEAC_{ABTS⁺} values than the organic ones, whereas for red wines, their values are practically comparable.

Looking on TEAC_{ABTS⁺} values of pair wine samples, the trend discussed above is practically confirmed. While for some pair samples similar TEAC values were found, in majority of cases wines of conventional production revealed the better radical scavengers then their organic counterparts. As is also obvious from the presented data, TEAC_{ABTS⁺} values are significantly dependent on vintage, which is much more evident in case of conventional wines.

In case of \cdot DPPH test performed by UV-VIS, diversity of TEAC values indicates that this parameter alone could not be used as a marker for differentiation of organic and conventional wines. Similarly like in cases of TEAC_{ABTS⁺} described above, pair samples possessed ambiguous trends. For majority of them, either comparable TEAC values were obtained, or the differences were significant, but the trends vary even within the wines of the same variety. Seasoning effect is also obvious from these results.

3.2.2 Grape musts

For majority of grape musts, the ability of organic musts to scavenge the ABTS^{•+} and [•]DPPH radical was just slightly higher than that of conventional ones, exception for *MB02/MC02* and *MB04/MC04* samples for which the reverse trend was observed in both assays. As follows from the data presented in Table 2, significant influence of vintage on radical-scavenging capability of must samples was proved. Generally, musts prepared from grapes harvested in 2011 revealed higher TEAC value compared to those from 2010, exception for TEAC_{DPPH} and TEAC_{ABTS^{•+}} values of *MB01/MB02* and for TEAC_{DPPH} of *MB03/MB04*.

As follows from pair correlations of experimental characteristics in correlation matrix (data not presented), very strong positive correlation between all the characteristics determined by UV-VIS spectroscopy with the content of polyphenols for both musts and wines is obvious, without respect on whether samples are of organic or conventional production. It is apparent, that although the TPC content could not be due to reasons described above used as a discrimination marker, in case of antioxidant characteristics some clear trends described above are obvious. It is also noticeable, that for both, organic wines and musts, slightly higher correlation coefficients were determined for all UV-VIS characteristics, exception for ferric reducing power.

3.3 Antioxidant and radical-scavenging activity of wines and grape musts assessed by EPR

3.3.1 Wine samples

Radical-scavenging and antioxidant activities of selected wines and grape musts were monitored using [•]DPPH, ABTS^{•+} and TEMPOL assays as well as by means of [•]OH radicals generated directly in the experimental system in the presence of DMPO spin trap. Similarly like in case of UV-VIS, radical-scavenging properties of wines and musts in the presence of ABTS^{•+} and [•]DPPH radicals were expressed in terms of TEAC values. This approach enables also the comparison of data obtained by UV-VIS and EPR.

As is also indicated in the previous section, radical-scavenging activity of samples towards TEMPOL free radical was expressed as Ascorbic acid equivalent, as there is not a direct re-calculation formula, or relationship reflecting the reactivity of this radical and Trolox that serves as reference standard for evaluation of TEAC values.

In accord with expectation, all wine and must samples revealed significant radical-scavenging and antioxidant activity, confirming thus their generally accepted behavior as source of antioxidants. General comparison of the data indicates that again, clear difference in all antioxidant characteristics is obvious between the red and white wines – the former are typical of higher TEACs. These results are also consistent with trends in UV-VIS characteristics described above.

When organic and conventional wines are considered, separately red and white ones, in spite of high variability of the results within the individual groups, some trends are also obvious: it can be concluded that red conventional wines are characterized by slightly higher averaged values of both, TEAC_{ABTS^{•+}} and TEAC_{DPPH} than their organic counterparts, without respect on vintage or variety. The same trend was observed also for white wines.

Looking in details on TEAC values of respective 14 pair wine samples, it is obvious that for TEAC_{ABTS^{•+}} and TEAC_{DPPH} in approx. 5 cases, organic wines proved better radical-scavenging properties; while in the remaining cases, the reversed trend was revealed. Regarding the observed differences between the TEAC values of organic and conventional pair samples assessed by both ABTS^{•+} and [•]DPPH assays it should be noted, that for pair samples of Pinot Blanc *BW7/CW7* and Roter Traminer *BW8/CW17* comparable results were obtained, while in the remaining cases, the differences reached from 20% to 100%.

While the effect of wine variety is apparent, results for the samples of the same batch are comparable. Again, significant seasoning effect was noticed - in some cases the differences in TEAC values of the same samples of different vintage reached approx. 50-100%.

As follows from the presented data, good correlation between the results of ABTS^{•+} and [•]DPPH radical-scavenging assays performed by UV-VIS and EPR were obtained. High positive correlations are also obvious from single-pair correlation matrices constructed separately for organic and conventional wines (data not presented). Regarding the differences in radical scavenging ability between these two assays found for both assays, they correspond well with our previous results (Polovka, Šťavíková, Hohnová, Karásek, & Roth, 2010; Staško, Polovka, Brezová, Biskupič, & Malík, 2006). These differences follows from differences in redox potential of both radicals and reflects also their different reaction mechanisms – in case of ABTS^{•+} hydrogen donating ability while in case of [•]DPPH, electron-transfer dominates. Also, different reaction kinetics between phenolic compounds present in the samples and respective radicals contribute to the observed differences in overall radical-scavenging ability (Wiseman, Balentine, & Frei, 1997).

In case of AAE values of wines, the differences between the red and white wines are not so apparent. Anyway, rather than by wine type, AAE values are significantly influenced by the affiliation of wine samples to the respective production system. In general, conventional wines are typical of higher AAE values than the organic ones, exception for pair samples of Pinot Blanc *BW11/CW19* and *BW7/CW7* with practically comparable AAE values; and Roter Traminer *BW17/CW20* for which the reversed was observed. Again, high variability in AAE values between wines of the same variety and of different vintage is obvious, reaching in some cases the difference higher than 100% (e.g., for Blaufränkisch *CR23* & *CR25*, Roter Traminer *CW16* & *CW20*, Table 2).

It should be noted, that values of single-pair correlation coefficients indicates very weak correlations of AAE with all evaluated characteristics; in case of organic wines even negative correlations were found. In addition, in spite of the described variability, on the basis of dissimilarities described above, and weak correlations with the other experimental characteristics, it can be partially concluded that AAE values can be effectively used for the purposes of wines differentiation, as is discussed below.

Typical time evolutions of EPR spectra of selected wine samples in the experimental system in which reactive free radicals were produced directly via the thermal decomposition of K₂S₂O₈ radical initiator in the presence of DMPO spin trap are depicted on Figure 1. The observed dependences, as well as character of EPR spectra are in accord with presupposed

mechanism of radicals formation in the experimental system and is also coherent with already published data (Polovka, Šťavíková, Hohnová, Karásek, & Roth, 2010; Polyakov, Kruppa, Leshina, Konovalova, & Kispert, 2001; Staško, Polovka, Brezová, Biskupič, & Malík, 2006). It is obvious, that the decrease of relative spectral intensity is dependent on wine type (red vs. white). Some differences between the depicted EPR spectra of selected organic and conventional wines are evident as well. To evaluate correctly the antioxidant properties of wine samples, the %RS effective values were calculated as indicated in the previous section.

Results obtained confirmed the observed and expected differences between the red and white wines. Besides that, certain trends were confirmed also for conventional and organic wines. Without respect on wine variety or vintage, averaged %RS values of red conventional wines reached approx. 80%, whereas that of organic wines 86%. For white conventional and organic wines, 42% and 66 % RS were found, respectively. Taking into consideration pair wine samples, the above-mentioned trend was fully confirmed, with an exception for Chardonnay *BW18/CW21* and Pinot Noir *BR24/CR33* pairs, which revealed the reversed trend and similar values, respectively. The variability of the results is again influenced by the vintage. Moderate single-pair correlations were confirmed between the %RS parameters and all the remaining characteristics, exception for AAE values. It is also noticeable that these correlation coefficients calculated are in case of organic wines slightly higher than those calculated for conventional wines.

3.3.2 Grape musts

Some clear trends are obvious from $TEAC_{DPPH/ABTS^{+}}$ values of grape musts summarized in Table 2. For both assays, the differences in TEACs between the red and white grape musts are noticeable, but they are not as distinct as in case of wines. Organic musts are characterized by generally higher averaged $TEAC_{ABTS^{+}}$ values than the conventional ones. This phenomenon is confirmed also for respective pair must samples, with an exception for *MB04/MC04*, for which the reversed trend was observed. For $TEAC_{DPPH}$, three pair samples are characterized by practically identical values, while for the remaining ones, the ambivalent trend is obvious. Although significant seasoning and varietal effects are obvious from the data presented, it is apparent that these parameters do not allow clear differentiation of conventional and organic samples. Practically the same, ambivalent trend between the red and white grape musts as well as between the organic and conventional ones is noticeable also for AAE and %RS values. Regarding the last mentioned, comparison of samples from different seasons indicated that musts prepared from grapes harvested in 2011 possessed higher %RS values comparing to that collected in 2010, exception for Roter Traminer sample *MB01/MB02*.

As also follows from the %RS values, in case of Cabernet Sauvignon samples of 2010 season *MB03* and *MC03* even the negative %RS values were noticed. Although the interpretation of this fact is not a simple task, we do presuppose that the "pro-oxidant" action of the prepared grape musts are influenced by the increased concentration of some transition metal ions, mostly Cu and Fe capable of pro-oxidant action if present in proper oxidation state (e.g., via Fenton reaction). This assumption is also supported by the results of AAS analysis performed on wine and must samples under study (data not presented).

Taking into consideration values of mutual correlation coefficients of individual characteristics of grape musts (data not presented), it can be partially concluded that the correlations between most of them are comparable to these of wine. However, some differences were also found. Organic musts are characterized by lower correlations between the TPC and $TEAC_{ABTS^{+}}$ than either the conventional ones or wine samples. Higher, although still low correlations of AAE of organic musts with all the parameters and, in the contrary, moderate correlations in case of conventional musts are evident, as well. Diversity of values as well as moderate or low mutual correlations of antioxidant characteristics of grape musts indicates that they could be effectively used for the purposes of musts differentiation by multivariate statistics.

3.4 Processing of spectral data by multivariate statistics

From the information given above, it is clear that practically none of the investigated spectral or physico-chemical parameter could alone serve as a marker for the purposes of wines/musts differentiation according to the way of their production. Thus, multivariate statistics represents a method of choice, as the results of various analytical techniques/assays can be effectively used for the discrimination of samples.

The whole dataset of experimental characteristics, all together 12 parameters, were statistically evaluated by multivariate statistics, involving the methods of PCA, PCF and discriminant analysis, using the model suitable for the visualization, classification and prediction of affiliation of samples under study to the respective production system.

3.4.1 Wine samples

First of all, the entire group of wine sample characteristics was processed by PCA, without respect on wine variety, type of wine or its origin, in order to test the grouping tendency of wine samples and to describe the variability of the dataset of experimental characteristics. From the original 12, potentially correlating experimental characteristics, the set of non-correlating principal components were constructed in a way to reflect the maximum of the variability of the system. As follows from the results obtained (data not presented), first 3 principal components cumulatively explain more than 80% of the whole system variability. Table of Eigen values indicates, that for the construction of the 1st principal component, TPC content as well as all TEACs characteristics had the most significant weight, whereas in the 2nd, AAE and k_{TEMPOL} and %RS and in the 3rd one, $k_{ABTS^{+}}$ and k_{DPPH} played the dominant role. From the plot of eigenvectors (data not depicted) it is apparent that 4 groups of vectors corresponding to individual samples are present, corresponding well with the wine type (red vs. white) and origin (organic vs. conventional), laying in different sectors of the graph. Although the groups are not clearly separated, the grouping tendency indicates that used descriptors can be used for the purposes of wine discrimination.

The discrimination of samples according the way of their production by means of CDA using the whole dataset of experimental characteristics as discriminators possessed 84% correctness, as from the group of altogether 25 organic and 33 conventional wines, 3 organic and 6 conventional samples were misclassified, respectively. As regards the influence of

individual experimental characteristics on the discrimination score, TEACs values followed by AAE and %RS values had also the dominant role in discrimination function construction. Results of stepwise discriminant analysis as well as principal component factoring proved the key role of AAE in discrimination, followed by %RS and TEAC_{DPPH} evaluated from EPR measurements. These three parameters revealed the highest Wilkes' Lambda scores.

For the purposes of wines differentiation and classification, also the k^{th} -nearest neighbor method was used in $k=1$, $k=2$ and $k=3$ approach, i.e., comparing the properties (experimental characteristics) of classified object (wines) to these of 1, 2 and 3 nearest neighboring object/s (samples) respectively. Results of all discrimination and classification procedures are summarized in Table 3. As expected, for $k=1$ 100% correct classification was reached. In addition, for both $k=2$ and $k=3$ approaches, approx. 86% correctness with totally 8 incorrectly classified samples was achieved, respectively.

If the classification of the entire group is performed in a manner considering the wine type (red and white, conventional and organic), i.e., samples are classified into four sub-groups (organic-white, conventional-white, organic-red, conventional-red), three discrimination functions must be constructed. In such a case, the dominant role for their construction have the values of FRP, TEAC_{DPPH(UV-VIS)}, AAE and %RS, revealing also the highest Wilkes' Lambdas.

Plot of factors (varimax rotation) indicating the importance of individual descriptors for the purposes of wine classification under above-mentioned conditions are depicted on Figure 2a and the results of canonical discrimination analysis on Figure 2b. In accord with our expectations, four partially divided groups of samples are present. Classification by groups led to approx. 91.4 % correctness, as all the organic white and conventional red wines were classified correctly, while 4 and 1 wine sample was misclassified as organic white and conventional red ones, respectively. Result of k^{th} nearest neighbor classification gives again 100% score for $k=1$ while for $k=2$ and $k=3$, the classification score reached 86%, with 5 incorrectly classified wine samples.

Although the above presented results are quite promising, the classification scores are influenced by the fact, that the classification procedures were performed on the whole group of analyzed wines, i.e., red and white ones were classified altogether. Thus, the next approach was to test the applicability of the proposed classification and discrimination methods separately on groups of red and white wines.

For white wines, it is apparent that lowering the absolute number of considered samples caused relative worsening of the description of the system variability by principal components: results of PCA showed that under these conditions, first three principal components (PC) cumulatively described approx. 65% of the whole system variability, and that to reach the score of cumulative variance described above for the whole dataset, it would be necessary to use 5 principal components. It should be noted here that the decreased % of cumulative variability of the dataset of experimental characteristics of white wines is the result of weak mutual correlations of some of the descriptors. Eigen values indicated that the importance of individual characteristics changed, as in the 1st PC, values of all TEACs, but also FRP and TPC; in the 2nd PC, AAE and k_{TEMPOL} and %RS, and in the 3rd PC, TBARS and k_{DPPH} had the dominant role. However, plot of eigenvectors (data not presented) showed two groups, which are practically differentiated one from each other, although the distribution of individual vectors throughout the graph sectors is higher.

Importance of TEAC values (especially TEAC_{DPPH} from EPR measurements), but also %RS, AAE and FRP revealed also the stepwise analysis. It should be noted here that in the CDA, especially high canonical standardized coefficient of %RS values was calculated, reaching 0.85. Classification by case (white organic vs. white conventional wines) possessed very high classification score of 97.4% as in fact from totally 37 white wine samples under study, only 1 sample, CW20 was classified to the group of organic wines. Results of canonical discriminant analysis of white wines are depicted on Figure 2c. Although not clearly differentiated (due to 2D-projection of 3D vectors), two groups of vectors are obvious, confirming thus the above-presented results. K^{th} nearest neighbor classification (Table 3) revealed expected 100% correct classification of white wines if $k=1$, and in case of $k=2$ and $k=3$, 87.2% and 92.3%, indicating thus slightly higher classification scores comparing to the results of the entire dataset classification, with 5 and 3 non-properly classified samples, respectively.

For red wines differentiation and classification, practically identical conclusions could be done. PCA proved that also red wines could be differentiated, as two clusters of vectors, again not clearly differentiated, are obvious on plot of vector scores. First three and five PC described cumulatively approx. 72% and 89% of the whole system variability, respectively. Identical characteristics as in case of white wines are also dominant in PCs construction for red wines; as the most important, AAE and FRP values were identified. In the construction of discriminant function and subsequent samples discrimination by CDA, UV-VIS characteristics, i.e., TPC, TBARS and FRP as well as %RS revealed the highest discrimination power. From totally 21 red wine samples, 12 conventional wines were absolutely correctly classified, and only 1 organic wine sample BR23 was classified between the conventional ones. Thus, the averaged classification score of approx. 95% was achieved. K^{th} nearest classification scores for $k=1$ (100%), $k=2$ (approx. 84%) and $k=3$ (approx. 74%) indicates slightly worsen classifications than in case of white wines, influenced probably by the variability of individual experimental characteristics of samples, described above.

The prediction ability of the discrimination of red and white wines was tested, as well, using the leave-multiple-out approach, i.e., repeated classification of 25% of samples assigned for this purpose as unknown in 5 turns was performed.

Results obtained indicated that in case of white wines, very high, 97.2% and in case of red wines, promising, 90% correctness was achieved. In details, from totally 37 white wines samples and 21 red wines, 1 and 2 samples were incorrectly classified into respective groups.

3.4.2 Grape musts

Results of PCA analysis of grape musts are depicted on Figure 3. Clear differentiation of eigenvectors into groups according the year of production is obvious, confirming thus above-discussed importance of season on samples characteristics. First 3 PCs cumulatively explain more than 80% of the whole variability of the dataset of experimental characteristic, with dominant role of FRAP, TBARS, AAE and k_{DPPH} values in PCs construction. CDA of musts according the year of production possessed 100% correct classification of samples, considering the musts altogether without respect on

variety or way of production. As the most significant discriminators, values of TBARS, TEAC_{ABTS++} and AAE were identified.

When the way of production is taken as the discrimination criterion, the correctness of classification is approx. 83% (Table 3). Partially successful discrimination probably follows from the above-discussed ambivalent results/trends in individual characteristics of pair samples.

Recognition ability tests performed by k^{th} nearest neighbor classification demonstrated 100% differentiation of musts samples for $k=1$, whereas in case of $k=2$ approx. 92% and $k=3$, approx. 83% classification correctness was achieved, with 1 and 2 incorrectly classified must samples, respectively. Prediction ability tests possessed very high correctness as well. In case of $k=1$, 1 sample of conventional musts, *MC02*, was classified as organic; for $k=2$ and $k=3$, identical classification score of 83% was obtained, indicating 2 classification errors for *MC02* & *MC03* and *MB06* & *MC02*, respectively.

Thus, regarding the discrimination and classification results described above, it can be concluded that the observed differences between the organic and conventional musts of different years of production are lower, than the variability (differences) in individual antioxidant characteristics. These results are also influenced by the limited number of grape must samples determined by their availability. Therefore, 100% correctness of musts differentiation and classification according to the year of production and at the same time, lower but quite promising discrimination and classification of must samples according to their affiliation into respective production system was achieved.

4. Conclusion

Wine and grape musts revealed significant antioxidant and radical-scavenging properties influenced by several factors, beside the others way of their production (organic vs. conventional), season, and/or wine/must variety. Although the results of individual spectroscopic assays revealed high variability and often ambiguous trends, the differences found were sufficient for successful differentiation and classification of wine and must samples according to the way of production by the methods of multivariate statistics.

Acknowledgement

This publication is the result of the project "Centre of Excellence for Contaminants and Microorganisms in Food – ITMS 26240120024" implementation, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF. Wine producers VINO NATURAL DOMIN&KUŠICKÝ and AGRO MOVINO VEĽKÝ KRŤŠ are gratefully acknowledged for their kind cooperation and samples provision.

References

- Basli, A., Soulet, S., Chaher, N., Mérillon, J.-M., Chibane, M., Monti, J.-P., & Richard, T. (2012). Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1-14.
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196-214.
- Bunea, C.-I., Pop, N., Babeş, A. C., Matea, C., Dulf, F. V., & Bunea, A. (2012). Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal*, 6, 1-19.
- Callejona, R. M., Clavijob, A., Ortigueirac, P., Troncosoa, A. M., Panequeb, P., & Morales, M. L. (2010). Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 68-75.
- Corrales, M., Fernandez, A., Pinto, M. G. V., Butz, P., Franz, C. M. A. P., Schuele, E., & Tauscher, B. (2010). Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3471-3476.
- Cozzolino, D., Holdstock, M., Damberg, R. G., Cynkar, W. U., & Smith, P. A. (2009). Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. *Food Chemistry*, 116(3), 761-765.
- Dangour, A. D., Dodhia, S. K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., & Uauy, R. (2009). Nutritional quality of organic foods: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 680-685.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., & Henriques, J. A. P. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12), 2574-2580.
- de Villiers, A., Alberts, P., Tredoux, A. G. J., & Nieuwoudt, H. H. (2012). Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*, 730, 2-23.
- Ebrahimi, A., & Schluesener, H. (2012). Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*, 11(2), 329-345.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, 103(4), 797-813.
- Gladstones, J. (2011). *Wine, Terroir and Climate Change*. Kent Town: Wakefield Press.
- Henríquez-Aedo, K., Vega, M., Prieto-Rodríguez, S., & Aranda, M. (2012). Evaluation of biogenic amine content in Chilean reserve varietal wines. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8), 2742-2750.
- Chaovanalikit, A., & Wrolstad, R. E. (2004). Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 69(1), FC67-FC72.
- Chyau, C.-C., Tsai, S.-Y., Ko, P.-T., & Mau, J.-L. (2002). Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Chemistry*, 78(4), 483-488.

- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & de Freitas, V. (2011). Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry*, *124*(3), 767-774.
- Koreňovská, M., & Suhaj, M. (2012). Chemometric prediction of wines affiliation with organic and conventional production systems through their elemental profiles. *Journal of Food and Nutrition Research*, *51*(1), 23-32.
- Lairon, D. (2011). Nutritional Quality and Safety of Organic Food. In E. Lichtfouse, M. Hamelin, M. Navarrete & P. Debaeke (Eds.), *Sustainable Agriculture*, vol. 2 (pp. 1012). London: Springer.
- Li, F., Gong, Q., Dong, H., & Shi, J. (2012). Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(1), 27-33.
- Machado, M. M., dos Santos Montagner, G. F. F., Boligon, A., Athayde, M. L., da Rocha, M. I. U. M., Lera, J. P. B., Belló, C., & da Cruz, I. B. M. (2011). Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*vitis labrusca*) from conventional and organic crops. *Química Nova*, *34*(5), 798-803.
- Matt, D., Rembiałkowska, E., Luik, A., Peetsmann, E., & Pehme, S. (2011). Quality of Organic vs. Conventional Food and Effects on Health. In, (pp. 104): Estonian University of Life Sciences.
- Mulero, J., Pardo, F., & Zafrilla, P. (2009). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *European Food Research and Technology*, *229*(5), 807-812.
- Mulero, J., Pardo, F., & Zafrilla, P. (2010). Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*(6), 569-574.
- Mulero, J., Zafrilla, P., Cayuela, J. M., Martínez-Cachá, A., & Pardo, F. (2011). Antioxidant activity and phenolic compounds in organic red wine using different winemaking techniques. *Journal of Food Science*, *76*(3), 436-440.
- Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, *96*(2), 197-208.
- Polovka, M., & Suhaj, M. (2010). Detection of caraway and bay leaves irradiation based on their extracts' antioxidant properties evaluation. *Food Chemistry*, *119*(1), 391-401.
- Polovka, M., Šťavíková, L., Hohnová, B., Karásek, P., & Roth, M. (2010). Offline combination of pressurized fluid extraction and electron paramagnetic resonance spectroscopy for antioxidant activity of grape skin extracts assessment. *Journal of Chromatography A*, *1217*(51), 7990-8000.
- Polyakov, N. E., Kruppa, A. I., Leshina, T. V., Konovalova, T. A., & Kispert, L. D. (2001). Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: Antioxidants or pro-oxidants? *Free Radical Biology & Medicine*, *31*(3), 398-404.
- Provenzano, M. R., El Bilali, H., Simeone, V., Baser, N., Mondelli, D., & Cesari, G. (2010). Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry*, *122*(4), 1338-1343.
- Rastija, V., Srećnik, G., & Marica-Medić-Šarić. (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, *115*(1), 54-60.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.
- Rombough, L. (2002). *A Guide to Organic Viticulture*. Vermont Chelsea Green Publishing.
- Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., & Loukou, Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, *101*(2), 704-716.
- Staško, A., Brezová, V., Liptáková, M., & Šavel, J. (2000). Thermally initiated radical reactions of K2S2O8: EPR spin trapping investigations. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *38*(11), 957-962.
- Staško, A., Polovka, M., Brezová, V., Biskupič, S., & Malík, F. (2006). Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study). *Food Chemistry*, *96*(2), 185-196.
- Stolz, H., Stolze, M., Hamm, U., Janssen, M., & Ruto, E. (2011). Consumer attitudes towards organic versus conventional food with specific quality attributes. *NJAS - Wageningen Journal of Life Science*, *58*(3-4), 67-72.
- Turgut, C., Ornek, H., & Cutright, T. J. (2011). Determination of pesticide residues in Turkey's table grapes: the effect of integrated pest management, organic farming, and conventional farming. *Environmental Monitoring and Assessment*, *173*(1-4), 315-323.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2006). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, *95*(3), 394-404.
- Vrček, I. V., Bojić, M., Žuntar, I., Mendaš, G., & Medić-Šarić, M. (2011). Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chemistry*, *124*(1), 354-361.
- Wiseman, S. A., Balentine, D. A., & Frei, B. (1997). Antioxidants in tea. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, *37*, 705-718.
- Yañez, L., Saavedra, J., Martínez, C., Córdova, A., & Ganga, M. A. (2012). Chemometric Analysis for the Detection of Biogenic Amines in Chilean *Cabernet Sauvignon* Wines: A Comparative Study between Organic and Nonorganic Production. *Journal of Food Science*, *77*(8), T143-T150.
- Yıldırım, H. K., Akçay, Y. D., Güvenç, U., Altındaşlı, A., & Sözmen, E. Y. (2005). Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. *International Journal of Food Science & Technology*, *40*(2), 133-142.
- Yıldırım, H. K., Üren, A., & Yücel, U. (2007). Evaluation of Biogenic Amines in Organic and Non-Organic Wines by HPLC OPA Derivatization. *Food Technology and Biotechnology*, *45*(1), 62-68.
- Zin, Z. M., Hamid, A. A., Osman, A., & Saari, N. (2006). Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemistry*, *94*(2), 169-178.

Tables & Figures captions

Table 1. List of conventional and organic wines and grape musts and their basic characteristics.

Table 2. Experimental characteristics of conventional and organic wines and grape musts determined by UV-VIS and EPR spectroscopy.

Table 3. Results of canonical discrimination analysis and k^{th} nearest neighbor classification of wine and grape must samples under study according to the way of production. The whole dataset of experimental characteristics was taken for the discrimination and classification. Results are expressed as % of correctly classified samples.

Figure 1. Time evolution of EPR spectra recorded in system containing 12% ethanol solution (reference) and selected organic (*B*) and conventional (*C*) white and red wines in the presence of DMPO spin trap. Detailed description of samples is given in Table 1.

Figure 2. a) Plot of factors (varimax rotation) indicating the importance of individual descriptors for the purposes of organic and conventional red and white wines differentiation on the basis of correlations of descriptor vectors with individual samples vectors.

b) Canonical discriminant analysis of studied wine samples according to type (white (*W*) vs. red (*R*) wines) and production system (organic (*B*) vs. conventional (*C*)). The entire dataset of experimental characteristics was used for discrimination.

c) Differentiation of Slovak organic and conventional white and red wines on the basis of principal component analysis of 12 descriptors of antioxidant and radical-scavenging activity (*CW/CR* – conventional white/red wines, *BW/BR* – organic white/red wines).

Detailed description of samples is given in Table 1.

Figure 3. Principal component analysis of Slovak organic (*MB*) and conventional (*MC*) grape musts. All experimental data were used as variables for principal components construction. Detailed description of samples is given in Table 1. Dash-dot line separates musts of different vintage.

Table 1. List of conventional and organic wines and grape musts and their basic characteristics

<i>Conventional wines</i>				<i>Organic wines</i>			
ID	Variety	Year	Characteristics	ID	Variety	Year	Characteristics
<i>White wines</i>							
CW1	Chardonnay	2003	Dry, 12.5% alc.	BW1	Chardonnay	2009	Dry, 11.5% alc.
CW2	Chardonnay	2004	Dry, 11.5% alc.	BW2	Chardonnay	2002	Dry, Grapes selection, 13% alc.
CW3	Roter Traminer	2003	Dry, Grapes selection, 11% alc.	BW3	Roter Traminer	2003	Dry, Kabinett, 12.5% alc.
CW4	Welsh Riesling	2003	Dry, 11% alc.	BW4	Welsh Riesling	2002	Semi-dry, Kabinett, 11.5% alc.
CW5	Rhein Riesling	2003	Dry, Grapes selection, 12.5% alc.	BW5	Rhein Riesling	2002	Dry, Last harvest, 12% alc.
CW6	Roter Traminer	2006	Semi-sweet, Berry selection, 12.5% alc.	BW6	Chardonnay	2008	Dry, Last harvest, 13% alc.
CW7	Pinot Blanc	2008	Dry, Last harvest, 12.5% alc.	BW7	Pinot Blanc	2008	Dry, Last harvest, 13% alc.
CW8	Chardonnay	2008	Dry, Last harvest, 9.5% alc.	BW8	Roter Traminer	2008	Dry, Last harvest, 12.5% alc.
CW9	Pinot Blanc	2008	Dry, 11% alc.	BW9	Pinot Blanc	2008	Dry, Last harvest, 13% alc.
CW10	Rhein Riesling	2008	Dry, 11.5% alc.	BW10	Pinot Blanc	2007	Semi-dry, Last harvest, 13.5% alc.
CW11	Pinot Blanc	2009	Dry, Last harvest, 13% alc.	BW11	Pinot Blanc	2009	Dry, Grapes selection, 13.5% alc.
CW12	Chardonnay	2009	Semi-dry, Last harvest, 13.5% alc.	BW12	Chardonnay	2009	Dry, Last harvest, Altar wine, 13% alc.
CW13	Chardonnay	2008	Dry, Last harvest, 11.5% alc.	BW13	Chardonnay	2006	Semi-dry, Grapes selection, 12.5% alc.
CW14	Pinot Blanc	2008	Dry, 13% alc.	BW14	Pinot Blanc	2007	Semi-dry, Grapes selection, 13.5% alc.
CW15	Pinot Blanc	2009	Sweet, Berry selection, 11% alc.	BW15	Cabernet Sauvignon	2007	Dry, Last harvest, Rosé, 12% alc.
CW16	Roter Traminer	2008	Dry, 12% alc.	BW16	Pinot Gris	2010	Dry, Last harvest, 12.7% alc.
CW17	Roter Traminer	2008	Semi-sweet, Grapes selection, 12% alc.	BW17	Roter Traminer	2009	Dry, Grapes selection, 11.5% alc.
CW18	Chardonnay	2009	Dry, Grapes selection, 14.5% alc.	BW18	Chardonnay	2011	Dry, Grapes selection, 14.2% alc.
CW19	Pinot Blanc	2009	Dry, Grapes selection, 13% alc.				
CW20	Roter Traminer	2009	Dry, 12% alc.				
CW21	Chardonnay	2011	Dry, Last harvest, 12% alc.				

Table 1 (cont).. List of conventional and organic wines and grape musts and their basic characteristics

ID	Variety	Year	Characteristics	ID	Variety	Year	Characteristics
<i>Red wines</i>							
CR22	Blaufränkisch	2003	Dry, Grapes selection, 12.5% alc.	BR19	Blaufränkisch	2003	Dry, Last harvest, 12.8% alc.
CR23	Blaufränkisch	2004	Dry, 11% alc.	BR20	Pinot Noir	2007	Dry, Grapes selection, 13% alc.
CR24	Blaufränkisch	2008	Dry, Last harvest, 13% alc.	BR21	Cabernet Sauvignon	2008	Dry, Last harvest, 12.5% alc.
CR25	Blaufränkisch	2008	Dry, 11% alc.	BR22	Pinot Noir	2007	Dry, Grapes selection, 13% alc.
CR26	Cabernet Sauvignon	2008	Dry, Grapes selection, 13% alc.	BR23	Cabernet Sauvignon	2008	Dry, Last harvest, 12.5% alc.
CR27	Blaufränkisch	2008	Dry, Last harvest, 12.5% alc.	BR24	Pinot Noir	2009	Dry, Grapes selection, 11.5% alc.
CR28	Cabernet Sauvignon	2008	Dry, Last harvest, 13% alc.	BR25	Cabernet Sauvignon	2009	Dry, Grapes selection, 14.2% alc.
CR29	Cabernet Sauvignon	2008	Dry, Grapes selection, 12% alc.				
R30	Pinot Noir	2008	Dry, 12% alc.				
CR31	Pinot Noir	2009	Semi-sweet, Berry selection, 13.5% alc.				
CR32	Cabernet Sauvignon	2009	Dry, 12% alc.				
CR33	Pinot Noir	2009	Dry, Quality wine, 11.5% alc.				

<i>Conventional grape musts</i>				<i>Organic grape musts</i>			
ID	Variety	Year	Characteristic	ID	Variety	Year	Characteristics
MC01	Roter Traminer	2010	White	MB01	Roter Traminer;	2010	White
MC02	Chardonnay	2011	White	MB02	Roter Traminer	2011	White
MC03	Cabernet Sauvignon	2010	Red	MB03	Cabernet Sauvignon	2010	Red
MC04	Cabernet Sauvignon	2011	Red	MB04	Cabernet Sauvignon	2011	Red
MC05	Pinot Noir	2010	Red	MB05	Pinot Noir	2010	Red
MC06	Pinot Noir	2011	Red	MB06	Pinot Noir	2011	Red

Table 2. Experimental characteristics of conventional and organic wines and grape musts determined by UV-VIS and EPR spectroscopy.

Conventional wines										Organic wines									
ID	UV-VIS				EPR				% RS	ID	UV-VIS				EPR				
	TPC (GAE, mg.l ⁻¹)	TBARS	FRP	TEAC _{AHTS+} (mmol.l ⁻¹)	TEAC _{OPPH} (mmol.l ⁻¹)	TEAC _{AHTS+} (mmol.l ⁻¹)	TEAC _{OPPH} (mmol.l ⁻¹)	AAE (mmol.l ⁻¹)			TPC (GAE, mg.l ⁻¹)	TBARS	FRP	TEAC _{AHTS+} (mmol.l ⁻¹)	TEAC _{OPPH} (mmol.l ⁻¹)	TEAC _{AHTS+} (mmol.l ⁻¹)	TEAC _{OPPH} (mmol.l ⁻¹)	AAE (mmol.l ⁻¹)	% RS
CW1	279.7±7.8	0.1±0.0	1.1±0.1	1.2±0.1	0.5±0.0	1.6±0.0	1.1±0.1	0.4±0.0	38.7±1.9	BW1	225.0±13.9	0.4±0.0	0.5±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	56.0±2.8
CW2	300.7±10.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.8±0.0	0.3±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	39.1±2.0	BW2	255.8±7.5	0.2±0.0	0.6±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	1.0±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	74.8±3.7
CW3	269.4±8.5	0.1±0.0	1.0±0.0	1.2±0.1	0.3±0.0	1.6±0.1	0.6±0.0	0.7±0.0	48.7±2.4	BW3	183.6±7.5	0.1±0.0	0.6±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	0.5±0.0	63.0±3.2
CW4	271.5±1.6	0.1±0.0	1.1±0.1	1.1±0.1	0.5±0.0	1.4±0.1	1.0±0.1	0.8±0.0	52.0±2.6	BW4	185.7±1.6	0.2±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	61.8±3.1
CW5	242.2±0.5	0.1±0.0	1.0±0.0	0.9±0.0	0.4±0.0	1.2±0.1	0.9±0.0	1.3±0.1	57.7±2.9	BW5	236.3±6.1	0.4±0.0	0.5±0.0	0.8±0.0	0.3±0.0	0.7±0.0	0.4±0.0	0.8±0.0	55.4±2.8
CW6	218.5±2.1	1.7±0.1	0.8±0.1	0.6±0.0	0.6±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	-8.1±0.4	BW6	322.9±1.9	0.1±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	1.0±0.0	0.6±0.0	0.2±0.0	59.9±3.0
CW7	257.1±2.3	0.9±0.0	1.0±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.9±0.0	0.6±0.0	0.2±0.0	12.5±0.6	BW7	225.0±13.9	0.1±0.0	0.6±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	1.0±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	60.9±3.0
CW8	271.1±0.5	0.8±0.2	1.0±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	1.0±0.0	0.7±0.0	1.1±0.1	41.0±2.0	BW8	176.6±0.1	0.1±0.0	0.7±0.0	0.8±0.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	52.0±2.6
CW9	261.3±4.1	0.1±0.0	1.1±0.1	0.8±0.0	0.8±0.0	1.0±0.1	0.6±0.0	0.2±0.0	87.5±4.4	BW9	209.9±1.6	0.2±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	0.9±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	58.2±2.9
CW10	255.5±6.9	0.2±0.0	1.0±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	1.0±0.0	0.6±0.0	0.2±0.0	48.8±2.4	BW10	227.1±9.0	0.6±0.1	1.0±0.0	0.4±0.0	0.8±0.0	1.0±0.0	0.6±0.0	0.1±0.0	56.6±2.8
CW11	333.7±9.7	0.1±0.0	0.8±0.0	1.3±0.0	0.6±0.0	1.7±0.1	0.8±0.0	0.3±0.0	24.5±1.2	BW11	223.6±0.1	0.5±0.0	0.8±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	77.1±1.2
CW12	324.6±1.5	0.5±0.0	0.8±0.0	1.2±0.1	0.5±0.0	1.6±0.1	0.8±0.0	1.0±0.0	35.8±1.8	BW12	301.3±7.4	0.6±0.0	0.9±0.0	0.6±0.0	0.4±0.0	0.8±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	79.2±3.2
CW13	248.2±1.4	1.2±0.1	0.7±0.0	0.6±0.0	0.3±0.0	0.7±0.0	0.4±0.0	1.4±0.1	27.0±1.3	BW13	238.9±1.8	1.8±0.0	0.8±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	74.2±0.6
CW14	335.6±3.5	0.2±0.0	0.9±0.0	1.4±0.1	0.5±0.0	1.8±0.1	0.8±0.0	1.4±0.1	52.3±2.6	BW14	304.5±2.9	0.8±0.0	0.9±0.0	0.6±0.0	0.3±0.0	0.8±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	71.5±0.3
CW15	478.9±4.6	1.6±0.0	0.9±0.0	1.5±0.1	0.5±0.0	1.9±0.1	0.8±0.0	0.2±0.0	8.8±0.4	BW15	335.2±7.6	0.2±0.0	0.9±0.03	0.8±0.0	0.4±0.0	0.9±0.0	0.5±0.0	0.2±0.0	74.9±2.3
CW16	260.1±7.9	0.2±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	0.5±0.0	1.3±0.1	0.8±0.0	0.3±0.0	10.8±0.5	BW16	265.2±6.0	0.1±0.0	0.7±0.0	0.6±0.0	0.3±0.0	0.8±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	80.3±0.5
CW17	255.8±11.3	2.1±0.1	0.8±0.0	0.7±0.0	0.4±0.0	0.9±0.0	0.4±0.0	1.0±0.1	9.3±0.5	BW17	247.4±1.7	0.4±0.0	0.9±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	68.4±1.0
CW18	429.7±2.7	0.3±0.1	1.0±0.0	1.4±0.1	0.4±0.0	1.9±0.1	0.6±0.0	0.3±0.0	78.1±1.8	BW18	288.7±2.2	0.5±0.0	0.8±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	64.9±6.6
CW19	439.6±0.2	0.3±0.0	1.0±0.1	1.1±0.1	0.7±0.0	1.5±0.1	1.0±0.1	0.2±0.0	75.1±1.2	BR19	1588.1±32.2	2.0±0.0	9.3±0.1	4.4±0.2	2.1±0.1	5.8±0.3	5.2±0.3	0.5±0.0	91.3±4.6
CW20	351.9±0.7	0.1±0.0	1.0±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	1.0±0.0	0.5±0.0	0.1±0.0	67.6±3.6	BR20	2041.4±25.0	1.3±0.0	5.5±0.3	6.9±0.3	4.4±0.2	9.1±0.5	4.3±0.2	0.1±0.0	85.0±4.2
CW21	661.4±0.5	0.3±0.0	1.3±0.0	1.7±0.1	0.8±0.0	2.3±0.0	1.0±0.1	0.8±0.0	84.5±0.5	BR21	2254.7±3.5	4.0±0.1	7.2±0.6	7.5±0.4	4.9±0.2	10.3±0.5	5.0±0.3	0.1±0.0	88.8±4.4
CR22	1560.4±23.6	1.7±0.0	6.4±0.0	6.1±0.3	2.7±0.1	8.0±0.4	4.2±0.2	0.9±0.0	89.7±4.5	BR22	1393.7±29.7	1.1±0.1	5.5±0.0	6.5±0.3	3.4±0.2	8.4±0.4	2.6±0.1	0.2±0.0	74.1±3.7
CR23	1552.6±16.9	1.9±0.0	6.3±0.2	6.9±0.3	3.1±0.2	9.2±0.4	5.9±0.3	1.7±0.1	84.5±4.2	BR23	1626.2±30.1	3.3±0.0	5.1±0.4	7.6±0.4	4.1±0.2	9.9±0.5	6.5±0.3	0.2±0.0	76.1±3.8
CR24	1078.0±5.9	2.3±0.0	4.5±1.6	4.9±0.2	3.7±0.2	6.1±0.3	3.3±0.2	0.3±0.0	65.1±3.3	BR24	1763.3±10.3	2.0±0.1	4.3±0.0	5.2±0.3	2.9±0.1	7.5±0.4	4.2±0.2	0.1±0.0	91.2±0.0
CR25	1577.5±6.3	3.6±0.0	5.9±0.3	7.7±0.4	6.2±0.3	10.1±0.5	5.9±0.3	0.7±0.0	81.2±4.1	BR25	3187.4±52.2	4.0±0.1	4.4±0.3	10.6±0.5	8.7±0.4	14.1±0.7	10.3±0.5	0.2±0.0	94.5±0.4
CR26	1161.0±16.3	2.4±0.0	5.4±0.4	5.6±0.3	4.8±0.2	7.1±0.4	4.2±0.2	0.7±0.0	65.0±3.2										
CR27	1939.2±47.2	2.9±0.0	5.0±0.1	7.8±0.4	3.8±0.2	10.4±0.5	6.1±0.3	0.5±0.0	79.2±4.0										
CR28	1932.1±24.9	3.6±0.1	5.1±0.1	8.0±0.4	3.8±0.2	10.4±0.5	6.2±0.3	0.6±0.0	73.8±3.7										
CR29	2948.9±58.3	4.0±0.0	5.4±0.2	14.6±0.7	4.6±0.2	18.8±1.0	7.0±0.4	1.3±0.1	83.7±4.2										
CR30	2601.0±31.0	2.2±0.1	5.3±0.0	14.7±0.7	5.4±0.3	19.4±1.0	7.1±0.4	1.0±0.1	74.7±3.7										
CR31	3430.3±1.8	4.5±0.1	5.7±0.1	15.2±0.8	7.9±0.4	19.8±1.0	13.4±0.7	0.4±0.0	87.6±4.4										
CR32	2241.0±22.1	3.1±0.0	4.9±0.0	6.2±0.3	3.8±0.2	8.1±0.4	5.9±0.3	0.7±0.0	92.0±1.6										
CR33	2786.0±1.1	1.7±0.1	4.5±0.0	7.7±0.4	4.5±0.2	9.6±0.5	6.9±0.3	0.4±0.0	91.9±1.1										

Table 2 (cont). Experimental characteristics of conventional and organic wines and grape musts determined by UV-VIS and EPR spectroscopy.

Conventional grape musts										Organic grape musts											
ID	UV-VIS					EPR				% RS	ID	UV-VIS					EPR				% RS
	TPC (GAE, mg l ⁻¹)	TBARS	FRP	TEAC _{AHTS^{•+}} (mmol l ⁻¹)	TEAC _{DPPH} (mmol l ⁻¹)	TEAC _{AHTS^{•+}} (mmol l ⁻¹)	TEAC _{DPPH} (mmol l ⁻¹)	AAE (mmol l ⁻¹)	TEAC _{AHTS^{•+}} (mmol l ⁻¹)			TEAC _{DPPH} (mmol l ⁻¹)	TPC (GAE, mg l ⁻¹)	TBARS	FRP	TEAC _{AHTS^{•+}} (mmol l ⁻¹)	TEAC _{DPPH} (mmol l ⁻¹)	TEAC _{AHTS^{•+}} (mmol l ⁻¹)	TEAC _{DPPH} (mmol l ⁻¹)	AAE (mmol l ⁻¹)	
MC01	259.3±8.7	1.3±0.0	1.1±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	0.5±0.0	1.1±0.0	0.0±0.0	9.4±0.5	MB01	531.2±10.7	1.6±0.1	1.8±0.0	1.2±0.1	0.7±0.0	1.7±0.1	1.1±0.1	0.1±0.0	81.0±4.0		
MC02	997.8±6.4	2.6±0.0	1.9±0.1	1.6±0.1	0.9±0.0	1.2±0.0	2.4±0.0	0.1±0.0	57.2±2.4	MB02	546.8±16.5	2.5±0.0	1.8±0.0	0.8±0.0	0.4±0.0	0.7±0.0	1.3±0.1	0.1±0.0	56.3±3.6		
MC03	448.5±5.2	1.8±0.0	1.4±0.0	1.3±0.1	0.7±0.0	1.6±0.1	1.1±0.1	0.1±0.0	-35.6±1.8	MB03	686.4±15.4	2.1±0.2	1.6±0.0	1.6±0.1	1.6±0.1	2.0±0.1	1.1±0.1	0.0±0.0	28.5±1.4		
MC04	1509.7±1.1	3.4±0.1	2.0±0.0	5.6±0.3	2.1±0.1	2.2±0.2	11.1±0.3	0.1±0.0	56.9±1.2	MB04	988.0±10.2	2.7±0.0	1.8±0.0	2.8±0.1	1.2±0.1	1.8±0.0	4.0±0.3	0.1±0.0	54.0±6.0		
MC05	381.5±10.0	1.8±0.2	1.3±0.0	0.7±0.0	0.4±0.0	0.9±0.1	1.9±0.0	0.1±0.0	55.0±2.7	MB05	1111.0±5.5	2.6±0.1	2.1±0.0	3.9±0.2	1.1±0.1	5.2±0.3	1.9±0.1	0.1±0.0	75.9±3.8		
MC06	1684.5±5.6	2.7±0.1	2.0±0.1	7.9±0.4	2.2±0.1	2.9±0.0	11.4±0.1	0.1±0.0	67.6±0.7	MB06	2844.7±11.4	3.9±0.1	2.1±0.2	8.6±0.4	3.4±0.2	4.7±0.2	13.8±0.2	0.1±0.0	88.4±1.2		

Table 3. Results of canonical discrimination analysis and k^{th} nearest neighbor classification of wine and grape must samples under study according to the way of production. The whole dataset of experimental characteristics was taken for the discrimination and classification. Results are expressed as % of correctly classified samples.

Method	All wines (%) [*]	Wine samples				Grape musts All musts (%)
		All wines (4 groups - BW vs. CW vs. BR vs. CR) (%)	White wines (%)	Red wines (%)		
Canonical discrimination	84.5	91.4	97.4	94.7	83.2	
K^{th} nearest neighbour $k=1$	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
$k=2$	86.2	86.2	87.2	84.2	91.7	
$k=3$	86.2	86.2	92.3	73.7	83.3	

* The entire dataset was used for classification, without assignation of the wine origin, vintage, variety or type. Classification criterion was the way of wine production (O/C).

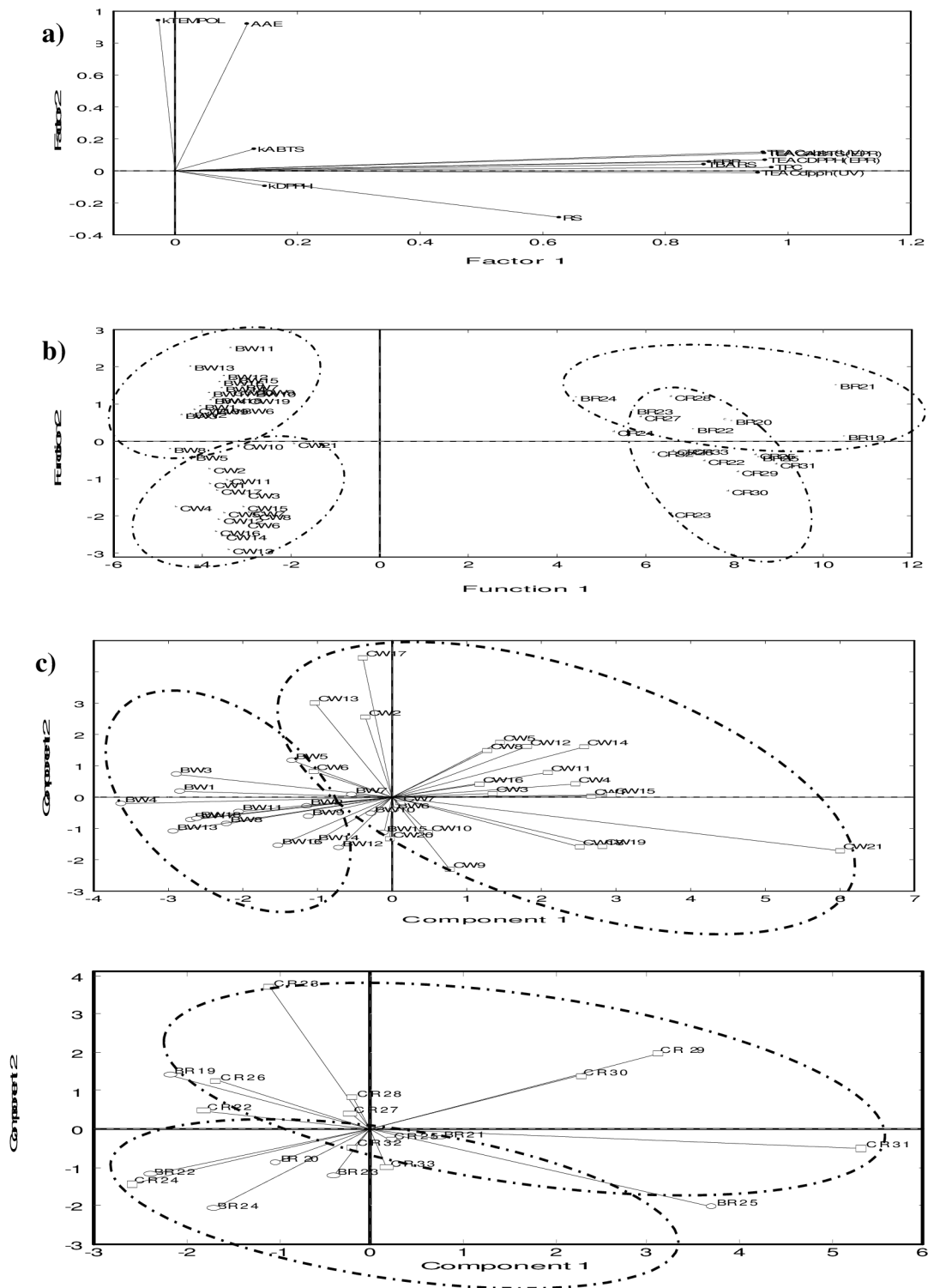


Figure 2. a) Plot of factors (varimax rotation) indicating the importance of individual descriptors for the purposes of organic and conventional red and white wines differentiation on the basis of correlations of descriptor vectors with individual samples vectors.

b) Canonical discriminant analysis of studied wine samples according to type (white (W) vs. red (R) wines) and production system (organic (B) vs. conventional (C)). The entire dataset of experimental characteristics was used for discrimination.

c) Differentiation of Slovak organic and conventional white and red wines on the basis of principal component analysis of 12 descriptors of antioxidant and radical-scavenging activity (CW/CR – conventional white/red wines, BW/BR – organic white/red wines).

Detailed description of samples is given in Table 1.

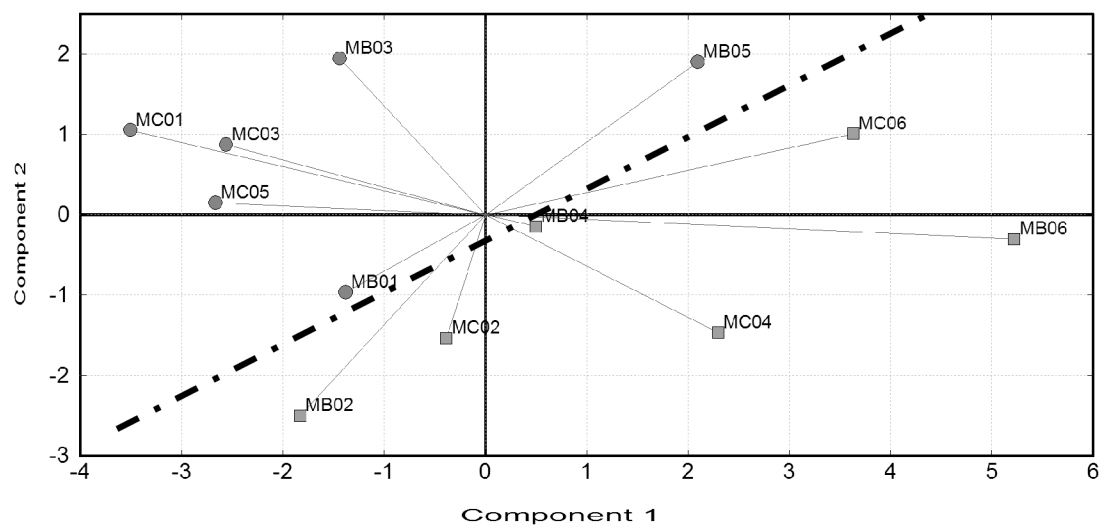


Figure 3. Principal component analysis of Slovak organic (*MB*) and conventional (*MC*) grape musts. All experimental data were used as variables for principal components construction. Detailed description of samples is given in Table 1. Dash-dot line separates musts of different vintage.

Příloha 4. TOBOLKOVÁ, B.; POLOVKA, M.; BELAJOVÁ, E.; KOREŇOVSKÁ, M.; SUHAJ, M. Possibilities of organic and conventional wines differentiation on the basis of multivariate analysis of their characteristics (EPR, UV-VIS, HPLC and AAS study). Zasláné do *Journal of Agricultural Science*. 2013.

ScholarOne Manuscripts http://mc.manuscriptcentral.com/jagricsci



THE JOURNAL OF
AGRICULTURAL SCIENCE

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)



SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged in as Martin Polovka

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Agricultural Science*.

Manuscript ID: AGS-2013-00486

Title: Possibilities of organic and conventional wines differentiation on the basis of multivariate analysis of their spectral characteristics (EPR, UV-VIS, HPLC and AAS study)

Authors: Tobolková, Blanka
Polovka, Martin
Belajová, Elena
Koreňovská, Mária
Suhaj, Milan

Date Submitted: 26-Sep-2013

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.13 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 [Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

1 z 1 26. 9. 2013 9:46

Possibilities of organic and conventional wines differentiation on the basis of multivariate analysis of their characteristics (EPR, UV-VIS, HPLC and AAS study)

Blanka Tobolková^{a,b}, Martin Polovka^{*a}, Elena Belajová^a, Mária Koreňovská^a, Milan Suhaj^a

^aDepartment of Chemistry and Food Analysis, VUP Food Research Institute, PO BOX 25, Priemyselná 4, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic

^bBrno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic

E-mail addresses: tobolkova@vup.sk; polovka@vup.sk, belajova@vup.sk, korenovska@vup.sk, suhaj@vup.sk

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +421 2 5023 7195. Fax: +421 2 5557 1417. E-mail: polovka@vup.sk (M. Polovka). Postal address: Department of Chemistry and Food Analysis, VUP Food Research Institute, Priemyselná 4, P.O. Box 25, SK-824 75 Bratislava, Slovak Republic

Abstract

Proving of affiliation of wine sample to either organic or conventional production system and of its geographical origin although important both for consumer safety and food control authorities is still problematic. Characteristics of Slovak and some European wines obtained by spectroscopic methods including AAS, EPR and UV-VIS in combination with HPLC and isotachopheresis processed subsequently by multivariate statistics were successfully used to differentiate Slovak organic and conventional wines according to their affiliation to production system and, at the same time, to differentiate the Slovak organic and conventional wine samples from those, produced in other European countries. From totally 74 determined experimental characteristics, Fe, Cu, FRP, TEAC_{DPPH(EPR)}, AAE, %RS, citric acid, catechin, epicatechin, color values a^* and chromaticity were identified by ANOVA Tukey-HSD multiple comparison and stepwise discrimination tests as the most promising characteristics for white wines differentiation, whereas Fe content and AAE for the differentiation of red wines. Recognition and prediction ability tests of the Slovak white organic and conventional wines reached 100%, whereas in case of red wines, correctness of recognition reached 90.5% and of the prediction ability, 90%. High correctness of differentiation of organic and conventional samples according to the origin of wine was obtained, reaching 95.8% for white wines and 80.7% for red wines, with 2 Slovak wines misclassified as wines of Czech origin.

Key words: organic wine, conventional wine, regional differentiation, ANOVA, canonical discrimination, spectroscopic methods

Introduction

In the recent years, several new organic farming techniques have been developed in order to improve the quality of plant and animal products but also to meet the safety standards and requirements of consumers and to reduce an impact on environment (Rosen 2010). However, still some controversy remains regarding the dilemma whether or not organic foods have a nutritional and/or sensory advantages in comparison to their conventionally produced counterparts (Vrček et al. 2011; Tassoni et al. 2013). In the last decade, research has demonstrated the effect of organic production system on several aspects of foods, including compositional changes which could serve subsequently as corresponding markers of production system (Capuano et al. 2013).

Organic viticulture is one of the most intensively developing sectors of organic agriculture. By the end of 2011 more than 260 000 hectares of vineyards (approx. 3.7 % of the entire vineyards area in the Europe) were managed organically. Countries as Spain, Italy and France were recognized as the biggest organic wines producers (Willer & Lernoud 2013). To the best of knowledge, in the Slovak republic, nowadays only one organic wines producer is registered and certified, offering grapes and wines of different varieties, e.g., Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Pinot blanc, Pinot noir, Riesling or Traminer, all on the area of approx. 40 ha in the south-central part of Slovakia.

Regarding the comparison of organic and conventional wines, the diverse information can be found in the literature, focusing also on various economic or qualitative aspects. Some most-frequently reported compositional differences between the organic and conventional wines are summarized in Table 1. A majority of the published data confirmed that both organic grapes and wines possessed higher antioxidant activity than their conventional counterparts, and this activity positively correlates with total polyphenols content (Yıldırım et al. 2005; Dani et al. 2007; Mulero et al. 2009; Mulero et al. 2010; Machado et al. 2011; Vrček et al. 2011; Bunea et al. 2012).

In the light of current knowledge, it is apparent, that the authentication of organic products can not be attained by the measurement of a single marker. Utilization of elemental data and multivariate statistical processing for wine identification or classification, mainly in terms of their variety, geographical and environmental origin has noticed increasing attention in the recent years. Analytical approaches based on the measurement of multiple markers and/or complex chemical or physical

profiles/fingerprints supported by subsequent multivariate statistical analysis of the obtained characteristics seem to be more promising in this respect (Capuano et al. 2013).

Multi-elemental composition of wines reflects not only the geochemistry of provenance soil, but also other factors such as environmental contamination, agricultural practices, climatic changes and vinification processes which can significantly affect the composition of wine (Pohl 2007; Vrček et al. 2011).

Some strategies for characterization and differentiation of wines using their compositional profiles (e.g., contents of low molecular organic acids, volatile species, polyphenols, amino acids, biogenic amines, color and inorganic species, etc.) in combination with chemometrics were previously summarized by Saurina (Saurina 2010).

Chemometric multivariate methods were used previously to discriminate organic and conventional wines. Based on selected enological parameters, Tintunen & Lehtonen tested without success the application of principal components analysis (PCA). Other discriminant models were based on MIR spectra and were developed using the PCA, discriminant partial least squares (DPLS) regression and linear discriminant analysis (LDA) (Cozzolino et al. 2009). As they proved, LDA models based on the PCA scores correctly classified more than 75% while the DPLS models more than 85% of the wine samples according to their affiliation to organic or conventional production system.

The present study is focused on comparison and chemometric differentiation of group of selected commercial Slovak conventional and organic white and red wines originating from two neighboring wine making regions on the basis of spectroscopic data obtained by EPR, UV-VIS and AAS in combination with isotachopheresis and HPLC utilized for quantification of selected polyphenols. In addition, to test the proposed chemometric models, regional differentiation was performed between the Slovak and European (Czech, Austrian, Italian, Hungarian) organic and conventional wine samples.

Materials and methods

Wine samples

Twenty seven Slovak certified organic varietal dry wines (18 white and 9 red) and thirty five conventional wines (23 white and 12 red) with alcohol concentration range of 11–13% (vol.) were sourced from three white wine varieties (Chardonnay, Pinot blanc, Traminer red, Rhein Riesling, Welsch Riesling and Pinot Grey) and two red wine varieties (Pinot noir, Cabernet Sauvignon and Blaufränkisch). All the samples originated from sub-region Modrý Kameň located in the Central-South Slovak wine-producing region. Majority of the Slovak wines under study have gained the protected designation of origin (PDO) label and were collected during the vintage periods 2007–2011 in cooperation with two producers, one for organic wines and the other for conventional ones. Organic vineyards and products were under certified organic management for more than 6 years controlled by the respective state authority according to the Council Regulation (EC) No 834/2007 and the Slovak Regulation No. 189/2009 on organic production (Commission 2007; Ministry of Agriculture of the Slovak Republic 2009). Vineyards of both producers are located in very close neighborhood, thus the distance between them varied within a radius of few kilometers. In such setup, the effects of differences in climate and soil composition on wines quality should be minimal.

For the purposes of regional differentiation 1 Italian (Chardonnay, organic), 6 Czech (Pinot Blanc, Pinot Noir, Roter Traminer, Cabernet Sauvignon, of which 4 were organic and 2 conventional), 2 Austrian (Grüner Veltliner, 1 organic and 1 conventional) and 2 Hungarian (Chardonnay, Cabernet Sauvignon, both conventional) were examined. Bottles were stored in darkness in storing chamber at the temperature of $10 \pm 1^\circ\text{C}$. After opening, the air was removed from the sample by purging with nitrogen, tightly bunged up with a cork cap and sealed with the teflon tape to avoid the oxidation.

Chemicals

The following chemicals of analytical grade purity were used: nitric acid (HNO_3 , Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), orthophosphoric acid (H_3PO_4 , Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) salt (ABTS, Polysciences, Inc., Warrington, PA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl stable free radical (DPPH, Fluka, Buchs, Switzerland), 1-oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine (TEMPOL, Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Merck GmbH, Darmstadt, Germany), ferric chloride (FeCl_3 , Merck, Hohenburn, Germany), sodium carbonate (Na_2CO_3 , Lachema, Brno, Czech Republic), phosphate buffer (prepared by mixing 4 ml of 66.7 mmol/l KH_2PO_4 with 6 ml 66.7 mol/l Na_2HPO_4 , pH = 6.98, Merck, Hohenburn, Germany, both), potassium hexacyanoferrate(III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI), trichloroacetic acid (CCl_3COOH , Merck, Hohenburn, Germany). Besides, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO, Sigma Aldrich Ltd, Milwaukee, WI) freshly distilled before use and stored at -18°C under argon was used in spin trapping experiments. Deionized water was used as solvent if it is not specified otherwise. Ethanol and methanol (AFT, Bratislava, Slovak Republic, both) of spectroscopic grade purity were also utilized.

Experimental procedures

Elemental composition study by AAS

Wine samples were analyzed to the concentration of Ag, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, K, Na, Pb, Rb, Sr and Zn, which were selected as potential markers on the basis of their increased variability in soils of Slovak vineyard regions indicated by geochemical composition atlas (Čurlík & Šefčík 1999). Sample of respective wine (2 ml) was mixed with 1 ml HNO_3 (1 mol/l) and the mixture was diluted in deionized water to get the final volume of 10 ml. A Perkin Elmer 4100 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) equipped with a deuterium lamp background-correction system and HGA 700 graphite tube atomizer with pyrolytically coated graphite tubes and flame was used for metal determination. Metals Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn and Cu were determined from atomic absorption spectrometry using an air/acetylene flame. Sr was determined using an acetylene/nitrous oxide flame. Metals Ag, Ba, Cd, Pb and Rb were measured on graphite tube atomizer. For the determination of mercury, atomic absorption spectrometer AMA 254 (Altech, Prague, Czech Republic) was used. The accuracy of the results was verified by the standard addition method. Recovery of the method was assessed by analysis of fortified samples at two concentration levels using standard solution of selected elements. Fortification of samples was performed before the microwave digestion. The mean recoveries of elements were 93–108%.

HPLC analysis

HPLC analysis was used to quantify selected wine phenolic constituents (+) catechin, (-)-epicatechin, hesperidin, rutin, quercetin and *trans*-resveratrol. The separation was performed using a Agilent Technologies 1100 Series LC instrument, equipped with a diode array detector (DAD), quaternary pump, degasser, column thermostat and autosampler (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Chromatographic separations were performed on a Purospher STAR RP-18e column (250x4.6 mm; i.d., 5 µm (Merck)) at 30 °C. The following linear gradient programme was used: 100% B, 0–1 min; 80% B, 1–5 min; 75% B, 5–10 min; 65% B, 10–12 min; 50% B, 12–18 min; 50% B, 18–26 min; 100% B, 26–28 min. Solvent A was 100% methanol and solvent B was the mixture of 0.01 mol/l orthophosphoric acid with methanol (volume ratio: 95:5, v+v, respectively). The flow rate of the mobile phase was set to 1.3 ml/min and the volume of wine sample injected in one run was 20 µl. Wine samples were analyzed without any previous preparation except of microfiltration.

Detection of flavonoids was carried out by DAD detector simultaneously at 256, 280, and 305 nm. The method was partly validated for white and red wines, with the following characteristics: detection limit, 0.016–0.80 mg/l; quantification limit, 0.02–1.34 mg/l; linearity - coefficient of determination, $r^2 > 0.999$; precision - maximum coefficient of variation, 5.69%; accuracy (recovery rate), 77–110%.

UV-VIS and EPR measurements

The entire UV-VIS experiments were performed using UV-VIS-NIR spectrophotometer Shimadzu 3600 with accessory. The experiments were performed in duplicates.

ABTS^{•+} radical-scavenging assay: Cation radical of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) was prepared as previously suggested by Re et al. (Re et al. 1999). To test the radical-scavenging ability, 900 µl of wine sample was mixed directly in quartz cuvette with exactly 2.1 ml of 0.1 mmol/l ABTS^{•+} solution, purged with air to mix the solution properly, and within 3 s after the radical addition, the measurement started, recording the absorbance of the solution at 730 nm for 15 min. As a reference, 12% ethanol aqueous solution was used.

Ferric reducing power: The capability of samples to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ was determined according to the method of Chyau et al. (Chyau et al. 2002). Respective wine sample (2 ml) was mixed with 2 ml of 0.2 mol/l sodium phosphate buffer (pH = 6.6) and 2 ml of 1% potassium hexacyanoferrate(III), and the mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Then, 2 ml of 10% trichloroacetic acid was added and the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Upper layer (500 µl) was mixed with 2.5 ml of deionized water and 100 µl of 0.1% ferric chloride (for white wines) directly in quartz cuvette. In case of red wines, 100 µl of supernatant, 2.9 ml of distilled water and 20 µl of ferric chloride were mixed. The absorbance at 700 nm was measured after 100 s.

All EPR measurements were performed using portable X-band EPR spectrometer e-scan (Bruker Biospin, GmbH, Karlsruhe, Germany) with accessory. The experiments were performed in duplicates.

'DPPH an ABTS^{•+} Radical-scavenging activity assays: Exactly 300 µl of respective sample of wine was mixed either with the solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ('DPPH) in ethanol (initial concentration, $c_{0(\text{DPPH})}=0.1$ mmol/l), or the solution of ABTS^{•+} in water (initial concentration, $c_{0(\text{ABTS}^{•+})}=0.1$ mmol/l). The mixture was purged with 2 ml of air and immediately transferred into the EPR flat cell. EPR measurements started exactly 3 min. after the 'DPPH or ABTS^{•+} addition and a set of 10 EPR spectra was recorded in time domain during 15 min. In case of 1-oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine (TEMPOL) assay, exactly 700 µl of sample was mixed with 300 µl of TEMPOL solution in water (initial concentration, $c_{0(\text{TEMPOL})}=0.1$ mmol/l) and the identical procedure as described above was used. Every EPR spectrum represents an average of 30 individual scans. As a reference, 12% ethanol aqueous solution was used.

Antioxidant activity assay: Antioxidant activity of wine samples was tested as their capability to terminate the hydroxyl radicals (•OH) generated by chemical reaction directly in the experimental system via thermal decomposition of K₂S₂O₈ radical initiator in the presence of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) as spin trap (Staško et al. 2000; Staško et al. 2006). The reaction mixture was prepared by mixing 100 µl DMPO aq. solution (25 µl DMPO/840 µl deionized water), 200 µl 0.1 mol/l sodium phosphate buffer (pH = 7), 250 µl 0.1 mol/l K₂S₂O₈ and 300 µl of respective wine sample, purged with 2 ml of air and immediately transferred into the EPR flat cell. The time course of EPR spectra was monitored for 30 min. As reference, 12% ethanol aqueous solution was used.

Processing of experimental data: The experimental EPR spectra processing, evaluation and simulation was carried out using WIN EPR and SimFonia programs (Bruker) as described previously by Polovka et al. (Polovka & Suhaj 2010). Numerical values obtained were expressed as mean ± SD (n = 2).

Radical scavenging ability of samples in the presence of 'DPPH/ABTS^{•+} both for UV-VIS and EPR experiments was evaluated as previously described by Polovka et al., i.e., by evaluation the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) equivalent antioxidant capacity (TEAC) taking into consideration the absorbance/spectrum intensity exactly at time t = 10.5 min after the wine sample addition into the experimental system (Polovka et al. 2010). In case of TEMPOL assay, the results were recalculated to ascorbic acid equivalents (AAE) as previously described by Tobolková et al. (Tobolková et al. 2013).

In case of •OH radicals generating system, the relative value of radicals scavenged (%RS) was calculated by modified procedure of Staško et al. (Staško et al. 2000). For these purposes, the intensity of 1st and 15th EPR spectrum recorded exactly 30 min after K₂S₂O₈ addition into experimental system was taken into account, using the following equation:

$$\%RS = \left(1 - \frac{I_{sp(15)} - I_{sp(1)}}{I_{ref(15)} - I_{ref(1)}} \right) * 100 \quad (1)$$

where $I_{sp/ref(15)}$ represents an intensity of 15th EPR spectrum of sample or reference; $I_{sp/ref(1)}$ represents an intensity of 1st EPR spectrum of sample or reference.

Organic acids determination by capillary isotachopheresis

Capillary isotachopheretic determination of organic acids was performed following the procedure developed by Sádecká et al. by means of EA 202M electrophoretic analyser (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovakia) equipped with ITP Pro 32 (v. 1.0.5) software package for data processing (Sádecká et al. 2008). The separation was performed on pre-separation capillary, 80 mm x 0.8 mm i.d. and analytical capillary, 160 mm x 0.3 mm i.d., both made from fluorinated ethylene-propylene copolymer. As the leading electrolyte, 5 mmol/l HCl with addition of 0.1% (v/v) methyl-hydroxyethylcellulose adjusted to pH = 3.5 with β -alanine was used; as the terminating electrolyte served 5mmol/l caproic acid solution in water. The following separation conditions were used: sample injection volume, 30 μ l; driving current in pre-separation capillary, 200 μ A; current in analytical capillary, 20 μ A. Conductometric detection was employed. Analyses were performed in duplicates. Quantification of organic and inorganic anions was carried out by using an external standard calibration method. Calibration curves for individual anions were performed in the linear range of concentrations from 0.5 to 10 mg/l. From the calibration data, limit of detection and limit of quantification were determined. The method was validated also through the participation in FAPAS inter-laboratory testing.

Color evaluation

Calculation of CIE L*a*b* color parameters were performed directly from the measured UV-VIS spectra by means of ColourLite Panorama Shimadzu software (LabCognition Analytical Software GmbH, Germany) using the D65 day light illuminant and 10° standard observer angle. All the UV-VIS measurements for colour analysis were carried out using a UV-VIS-NIR spectrophotometer Shimadzu 3600 with accessory. The measurements were performed in duplicates, in the quartz cell (100-QS-Suprasil, Hellma, thickness, 1cm) against deionized water as a blank using the following setup: spectral range, 380 nm to 780 nm; sampling interval, 2 nm; slit width, 0.1 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the statistical package Unistat v. 6.0 (Unistat, London, United Kingdom). ANOVA and multivariate statistics were used to perform complex evaluation of the dataset of the obtained experimental characteristics. Multiple comparisons was performed by ANOVA Tukey-HSD test at the level of significance of $P \leq 0.05$ and the differences in means of individual compared characteristics were recognized as highly significant at $P < 0.001$. Stepwise discriminant analysis was used for selection of the best subset of markers to run a discriminant analysis and classification. From multidimensional pattern recognition techniques, the principal component analysis (PCA) and canonical discriminant analysis (CDA) were used in order to define the most appropriate wine biomarkers and to interpret and visualize the differences between the compared wines. In order to find possible tendencies in the samples and the discriminant power of individual variables, principal component factoring (PCF) with varimax rotation was applied. Using the CDA the recognition ability was calculated as the percentage of correctly classified samples in the original data set in which all the samples were of known properties for the classification model. In addition, the prediction ability was tested, as the percentage of the samples correctly classified in the k-fold cross-validation (jack-knife method) approach as suggested by Berrueta et al. (Berrueta et al. 2007).

Results and discussion

As indicated in the previous parts, for the purposes of wines differentiation, a complex matrix of 74 variables – individual experimental characteristics of totally 62 wine samples was obtained, comprising 14 micro- and macroelements concentrations, 14 antioxidant descriptors, 20 amino acids, 7 organic acids, 10 phenolic compounds content, 3 saccharides and glycerol content and, last but not least, 5 descriptors of color characteristics. Statistical significance of individual markers from the point of their difference/similarity for organic and conventional wines was tested using the ANOVA Tukey-HSD multiple comparison, separately for red and white wines. As clearly follows from Table 2, in case of white wine samples, statistically significant differences (significance level, $P < 0.05$) in the mean values of 11 biomarkers (Cu, Fe, FRP, TEAC, AAE, %RS, citric acid, b*, chromaticity, catechin and epicatechin), while for red wines in the values of 2 characteristics (Fe and AAE) were assigned as significant for the differentiation.

To test the relevance of individual markers for the purposes of organic and conventional wines differentiation, the dataset of experimental characteristics was processed also by the stepwise discriminant analysis, results of which are presented in Table 3. For red wines, only two markers, Fe and AAE, were identified as relevant, in good accordance with the results of ANOVA analysis, whereas for white wines, the number of relevant variables was reduced to the content of Fe, TEAC_{DPPH(EPR)}, FRP and %RS.

From the results of summary statistics presented in Table 4 and reporting the variation and comparison of biomarkers in examined wines, it is apparent that organic wines exhibited typically significantly ($P < 0.05$) higher content of lactic acid, color values b* (blue-yellow color coordinate in CIE L*a*b color system), chromaticity and radical-scavenging activity (expressed in terms of %RS). On the other hand, for red organic wines, the lowered content of Fe and AAE compared to conventional counterparts was confirmed. For the latter higher content of Fe, Cu, FRP, TEAC_{DPPH(EPR)}, AAE, citric acid, catechin and epicatechin was found.

The entire group of biomarkers identified as relevant for wines differentiation, i.e., Fe, Cu, FRP, TEAC_{DPPH(EPR)}, AAE, %RS, citric acid, catechin, epicatechin, color values a* and chromaticity, were subsequently used to discriminate and classify wines according to system of production (organic vs. conventional) using the pattern recognition multivariate statistical techniques.

Further statistical analysis was performed separately for white and red wines, respecting the above-presented results of ANOVA analysis in markers selection.

White wines

First of all, method of PCA was applied in order to reduce the dimensionality of the data set of experimental characteristics, to study main sources of its variability and to detect the differences/similarities and clustering tendency among the wine samples without respect on affiliation to either organic or conventional production system.

When applying PCA to the marker matrix of white wines, four principal components (PC) with eigenvalues > 1 were extracted explaining 77.8% of the cumulative variance of data set of 11 original biomarkers. The separation of white wine samples into two main clusters corresponding to organic and conventional way of their production can be clearly identified from plot of principal components, depicted on Figure 1a. As clearly follows from the eigenvalues table (data not presented), biomarkers catechin and chromaticity revealed their dominant role in the 1st PC construction, thus it can be concluded that these two parameters describes the maximum of the dataset variability. The 2nd principal component is influenced mostly by Cu and %RS variables. Principle component factoring with varimax rotation resulted in a plot of factors which was very similar to PCA data projection with the same significance of catechin, epicatechin, Cu and %RS in the factor loadings.

Multiple discriminant analysis using the stepwise procedure showed, in ascending order, that the Fe ions concentration, TEAC_{DPPH(EPR)}, FRP and %RS variables are the most discriminating biomarkers ($P < 0.05$; Wilks' Lambda 0.37–0.14) for distinguishing the white organic wines from their conventional counterparts.

Canonical discriminant analysis with one discriminant function (Eigenvalue 8.81; Wilks' Lambda 0.10; $P < 0.05$; correlation 0.9477) identified b* color value, Fe and FRP as the most discriminating biomarkers. CDA in recognition ability tests resulted in the correct classification of 100% of samples into the groups of organic and conventional wines. Cross-validation (Jack-knife method) in prediction ability tests (with 20% of anonymous white wine samples) resulted also in 100% of correctly classified wines according to their affiliation to compared winemaking procedures.

Red wines

As depicted on Figure 1b, PCA based on two most significant biomarkers (Fe content and AAE) selected for organic and conventional red wines differentiation by ANOVA analysis resulted in grouping of all the red wine samples under study according to their affiliation to production system, exception for two conventional samples displayed in the cluster of organic wines in the left quadrants of PCA plot. The first principal component explained cumulatively 78.5% of the total variance of the dataset and the second one, 21.5% of the remaining variability.

When CDA is applied on dataset of experimental characteristics of red wines to perform the classification according to their affiliation to organic or conventional enological procedures, 90.5% correct categorization of the samples in recognition ability test was reached. Jack-knife prediction ability test labeling in turns 20% of wine samples as being unknown for the classification model resulted in 90% correctness of wines classification. In fact, only one sample from the collection was misclassified.

Recognition of wines according to the way of production and country of origin

Applying the identical approach as described above, experimental characteristics of a group of Slovak and group of commercially available European organic and conventional wines were compared by multivariate statistics, again separately for white and red wines.

Plot of principal components depicted on Figure 2a shows partial differentiation of white organic and conventional wines originated from Slovakia, Austria, Italy, Czech and Hungary. However, although some grouping tendencies of eigenvectors (samples) according to the country of wine origin is obvious, wines are more-likely differentiate according to their affiliation to the respective production system, but separation of wines seems to be more successful according to their geographical origin, as generally, the vectors could be separated into two individual regions in dependence on whether the wine is of organic or conventional type. Table of Eigenvalues indicated that first three PCs explained cumulatively more than 76% of the variability of whole dataset of experimental characteristics, maximum of which is in 1st PC explained by catechin content and TEAC. In the 2nd and 3rd PC, the dominant role in variability explanation (PC construction) played Cu content with %RS values and chromacity with AAE parameter, respectively.

Stepwise discrimination analysis of white wines clearly indicated that for segregation of wines according to the type and geographical origin, Fe content and FRP values could be effectively used, while for canonical discrimination analysis b* and chroma values were identified as the best recognition markers. CDA correctly classified all white wine samples according to country of origin.

Results of classification procedure of white wines according to their origin and affiliation to the production system performed by CDA clearly indicated that all the organic and conventional white wines were correctly classified by their type and country of origin, exception for two misclassified Slovak conventional wines which were misclassified between the Austrian conventional wines. For this reason, recognition ability altogether resulted in 95.8% of correctly classified white wine samples.

As regards red wines classification, canonical discrimination according to type of production and country of origin led to only 80.8% of correctly recognized samples. Results are depicted on Figure 2b. This score is the result of fact, that from all red wine samples, totally 5 Slovak ones were misclassified and were consider as being of Czech origin, either of organic or conventional type. For the purposes of red wines discrimination, Fe content was identified as the best discriminating biomarker.

However, it could be noted here, that both white and red wines of the foreign production were classified absolutely correctly according to their origin as well as affiliation to production system.

Conclusions

The results obtained demonstrate high potential to use multicompositional data obtained by various experimental methods and chemometrics for differentiation and classification of wines according to their affiliation to organic and conventional production system and, at the same time, enable their differentiation according to wines geographical origin. ANOVA and stepwise discrimination procedure represent effective tool to select from the whole dataset of originally 74

variables 11 and 2 the most discriminating experimental characteristic (biomarker) for the purposes of white and red wines differentiation. High classification scores in recognition and prediction ability evaluation of indicate that there exist some significant differences between the organically and conventionally produced wines, which can be effectively used for their differentiation both according to the way of their production and region of origin. As is obvious, these characteristics are rather influenced by wine production system, wine type and/or locality of production than its variety. Further studies are desirable to test the prediction and classification power of experimental characteristics on larger data set of both domestic and foreign organic and conventional wine samples.

Acknowledgement

This publication is the result of the project "Centre of Excellence for Contaminants and Microorganisms in Food – ITMS 26240120024" implementation, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF. Wine producers Vino Natural Domin & Kušický and Agro Movino Veľký Krtíš are gratefully acknowledged for their kind cooperation and samples provision.

References

- BERRUETA, L. A. ALFONSO-SALCES, R. M. & HÉBERGER, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A* **1158**(1-2), 196-214.
- BUNEA, C.-I. POP, N. BABEŞ, A. C. MATEA, C. DULF, F. V. & BUNEA, A. (2012). Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal* **6**(1), 66-75.
- CAPUANO, E. BOERRIGTER-EENLING, R. VEER, G. & RUTH, S. M. (2013). Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of Science in Food and Agriculture* **93**(1), 12-28.
- COMMISSION, E. (2007). Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. p. 23. Luxembourg.
- COZZOLINO, D. HOLDSTOCK, M. DAMBERGS, R. G. CYNKAR, W. U. & SMITH, P. A. (2009). Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. *Food Chemistry* **116**(3), 761-765.
- ČURLÍK, J. & ŠEFCÍK, P. (1999). *Geochemical Atlas of the Slovak Republic, Part V: Soils*. Bratislava, Slovak Republic: Ministry of the Environment of the Slovak Republic.
- DANI, C. OLIBONI, L. S. VANDERLINDE, R. BONATTO, D. SALVADOR, M. & HENRIQUES, J. A. P. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food and Chemical Toxicology* **45**(12), 2574-2580.
- CHYAU, C.-C. TSAI, S.-Y. KO, P.-T. & MAU, J.-L. (2002). Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Chemistry* **78**(4), 483-488.
- LANTE, A. CRAPISI, A. LOMOLINO, G. & SPETTOLI, P. (2004). Chemical parameters, biologically active polyphenols a sensory characteristics of some Italian organic wines. *Journal of Wine Research* (15), 203-209.
- MACHADO, M. M. DOS SANTOS MONTAGNER, G. F. F. BOLIGON, A. ATHAYDE, M. L. DA ROCHA, M. I. U. M. LERA, J. P. B. BELLÓ, C. & DA CRUZ, I. B. M. (2011). Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*vitis labrusca*) from conventional and organic crops. *Química Nova* **34**(5), 798-803.
- MALUSA, E. LAURENTI, E. GHIBAUDI, E. & ROLLE, L. (2004). Influence of organic a conventional management on yield a composition of grape cv 'Grignolino. *Acta Horticulturae* (640), 135-141.
- MICELLI A. NEGRO, C. TOMMASI, L. & DE LEO, P. (2003). Polyphenols, resveratrol, antioxidant activity a ochratoxin and contamination in red table wines, controlled denomination of origin (DOC) wines and wines obtained from organic farming. *Journal of Wine Research* **14**(2-3), 115-120.
- MINISTRY OF AGRICULTURE OF THE SLOVAK REPUBLIC (2009). Slovak Regulation No. 189/2009 on organic agricultural production. p. 4. Bratislava, Slovak Republic.
- MULERO, J. PARDO, F. & ZAFRILLA, P. (2009). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *European Food Research and Technology* **229**(5), 807-812.
- MULERO, J. PARDO, F. & ZAFRILLA, P. (2010). Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**(6), 569-574.
- NÚÑEZ-DELICADO, E. SÁNCHEZ-FERRER, A. GARCÍA-CARMONA, F. F. & LÓPEZ- NICOLÁS, J. M. (2005). Organic Grapes Contain Higher Levels of Latent Polyphenol Oxidase than Conventionally Grown Wine Grapes. *Journal of Food Science* **70**(1), C74-C78.
- OTREBA, J. B. BERGHOFER, E. WENDELIN, S. & EDER, R. (2006). Polyphenols anti-oxidative capacity in Austrian wines from conventional a organic grape production. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung* **56**(1-2), 22-32.
- POHL, P. (2007). What do metals tell us about wine? . *Trends in Analytical Chemistry* **26**, 843-950.
- POLOVKA, M. & SUHAJ, M. (2010). Detection of caraway and bay leaves irradiation based on their extracts' antioxidant properties evaluation. *Food Chemistry* **119**(1), 391-401.
- POLOVKA, M. ŠTAVÍKOVÁ, L. HOHNOVÁ, B. KARÁSEK, P. & ROTH, M. (2010). Offline combination of pressurized fluid extraction and electron paramagnetic resonance spectroscopy for antioxidant activity of grape skin extracts assessment. *Journal of Chromatography A* **1217**(51), 7990-8000.
- RE, R. PELLEGRINI, N. PROTEGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. & RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**(9-10), 1231-1237.
- ROSEN, J. D. (2010). A review of the nutrition claims made by proponents of organic food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**, 270-277.

- SÁDECKÁ, J. MÁJEK, P. & TÓTHOVÁ, J. (2008). CE profiling of organic acids in distilled alcohol beverages using pattern recognition analysis. *Chromatographia* **67**(Suppl. 1), S69-S74.
- SAURINA, J. (2010). Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. *Trends in Analytical Chemistry* **29**, 234-245.
- STAŠKO, A. BREZOVÁ, V. LIPTÁKOVÁ, M. & ŠAVEL, J. (2000). Thermally initiated radical reactions of K₂S₂O₈: EPR spin trapping investigations. *Magnetic Resonance in Chemistry* **38**(11), 957-962.
- STAŠKO, A. POLOVKA, M. BREZOVÁ, V. BISKUPIČ, S. & MALÍK, F. (2006). Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study). *Food Chemistry* **96**(2), 185-196.
- TASSONI, A. TANGO, N. & FERRI, M. (2013). Comparison of biogenic amine and polyphenol profiles of grape berries and wines obtained following conventional, organic and biodynamic agricultural and oenological practices. *Food Chemistry* **139**(1-4), 405-413.
- TOBOLKOVÁ, B. DUREC, J. BELAJOVÁ, E. MIHALÍKOVÁ, M. POLOVKA, M. SUHAJ, M. DAŠKO, L. & ŠIMKO, P. (2013). Effect of light conditions on physico-chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces during storage. *Journal of Food and Nutrition Research* **52**(3), 181-190.
- VIAN, M. A. TOMAO, V. COULOMB, P. O. LACOMBE, J. M. & DANGLES, O. (2006). Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *Journal of Agricultural Food a Chemistry* **54**, 5230-5235.
- VRČEK, I. V. BOJIĆ, M. ŽUNTAR, I. MENDAŠ, G. & MEDIĆ-ŠARIĆ, M. (2011). Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chemistry* **124**(1), 354-361.
- WILLER, H. & LERNOUD, J. (2013). *Organic Agriculture Worldwide: Key results from the FiBL-IFOAM survey on organic agriculture worldwide 2013. Part 2: Crop data*. Frick: Research Institute of Organic Agriculture (FiBL).
- YILDIRIM, H. K. AKÇAY, Y. D. GÜVENÇ, U. ALTINDIŞLI, A. & SÖZMEN, E. Y. (2004). Protection capacity against low-density lipoprotein oxidation a antioxidant potential of some organic a non-organic wines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **55**, 351-362.
- YILDIRIM, H. K. AKÇAY, Y. D. GÜVENÇ, U. ALTINDIŞLI, A. & SÖZMEN, E. Y. (2005). Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. *International Journal of Food Science & Technology* **40**(2), 133-142.
- YILDIRIM, H. K. AKÇAY, Y. D. GÜVENÇ, U. & SÖZMEN, E. Y. (2004). Protection capacity against low-density lipoprotein oxidation a antioxidant potential of some organic a non-organic wines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **55**, 351-362.
- YILDIRIM, H. K. ÜREN, A. & YÜCEL, U. (2007). Evaluation of Biogenic Amines in Organic and Non-Organic Wines by HPLC OPA Derivatization. *Food Technology and Biotechnology* **45**(1), 62-68.

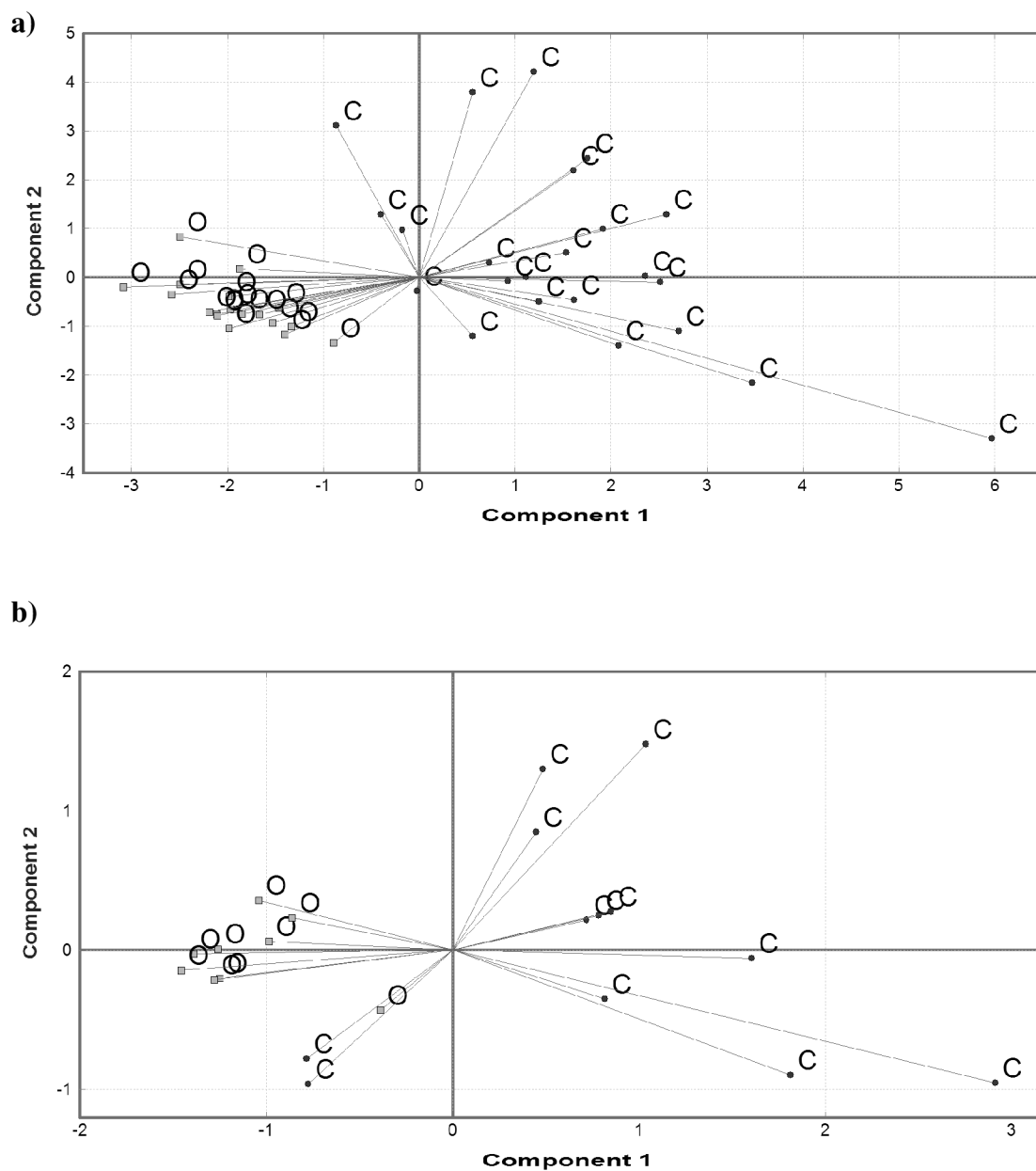


Figure 1. Plot of principal components of white (a) and red (b) organic (O) and conventional (C) wines. In case of white wines differentiation, all 11 biomarkers: Cu, Fe, FRP, TEAC, AAE, RS, citric acid, b*, chromaticity, catechin and epicatechin) were used for principal components construction, while for red wines, first two principal components were constructed using Fe and AAE as biomarkers.

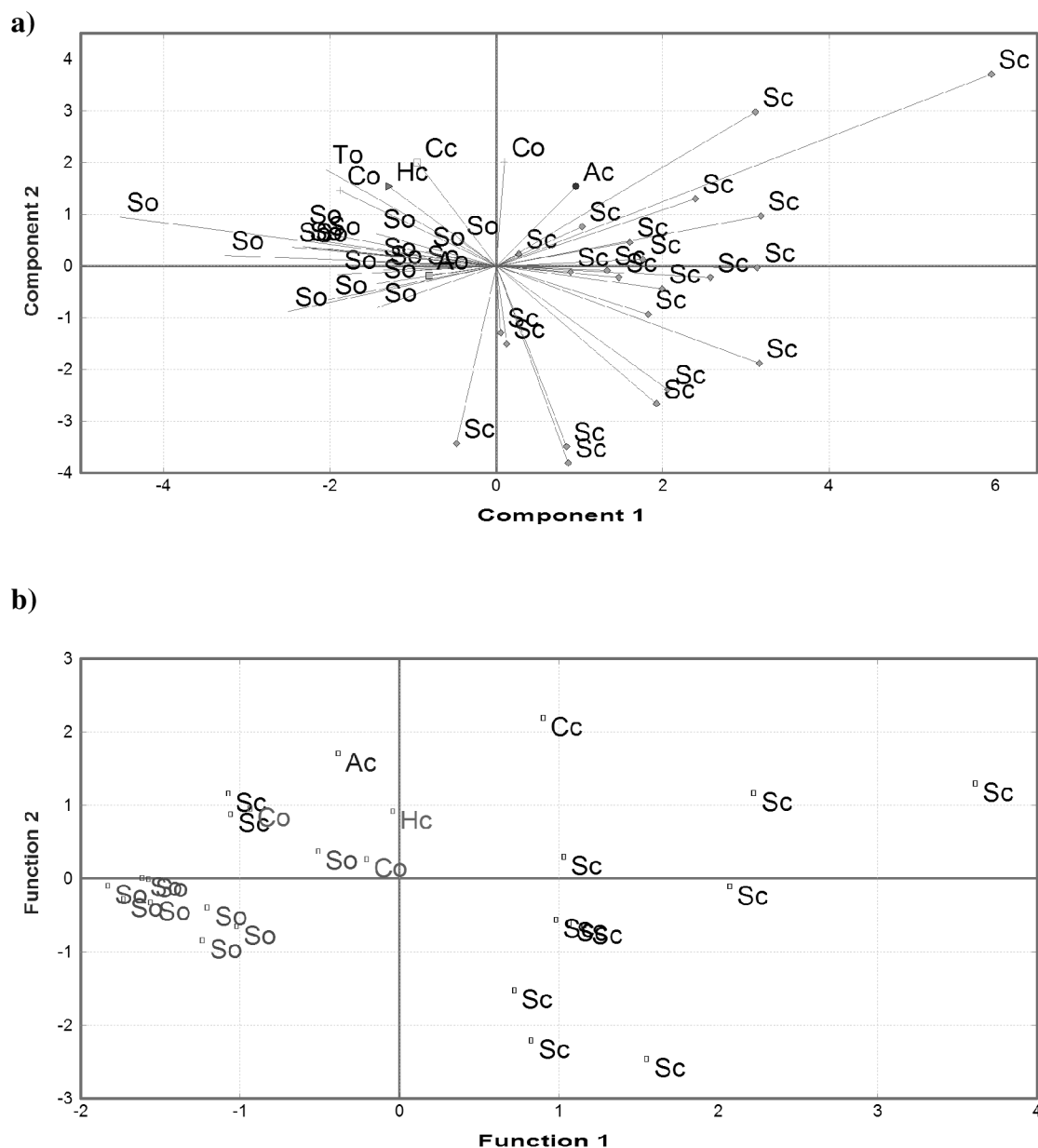


Figure 2. a) Principal component analysis of Slovak (S) and middle-European (A - Austrian, T- Italian, C- Czech, H- Hungarian) organic (o) and conventional (c) white wines.

Biomarkers Cu, Fe, FRP, TEAC, AAE, RS, citric acid, b*, chromaticity, catechin and epicatechin content were used for principal components construction.

b) Canonical discriminant analysis of Slovak (S) and middle-European (A - Austrian, T- Italian, C- Czech, H- Hungarian) organic (o) and conventional (c) red wines. Descriptors Fe and AAE were used for red wines differentiation.

Table 1. Differences between the organic and conventional wines.

Reported differences (organic vs. conventional wines)	
Increase	antioxidant activity (Micelli et al. 2003; Yildirim et al. 2004; Otreba et al. 2006; Vrček et al. 2011)(Micelli A. et al. 2003; Yildirim et al. 2004; Otreba et al. 2006; 2007; Vrček et al. 2011)(Micelli A. et al. 2003; Yildirim et al. 2004; Otreba et al. 2006; Vrček et al. 2011) enzyme polyphenol oxidase concentration and antioxidant activity in grape (Núñez-Delicado et al. 2005) content of biogenic amines (putrescine) (Yildirim et al. 2007) phenolics, polyphenols and resveratrol content in grape (Malusa et al. 2004; Dani et al. 2007)
No differences	content of trans-resveratrol and a p-coumaric acid (Lante et al. 2004) content of biogenic amines (Tassoni et al. 2013)
Decrease	content of <i>p</i> -coumaric and vanilic acid (Yildirim et al. 2004) total antocyanins content in grapes (Vian et al. 2006)

Table 2. Statistically significant markers suitable for Slovak conventional (C) and organic (O) wines recognition obtained by ANOVA Tukey-HSD statistical evaluation.

Marker	Comparisons*	Difference	Standard Error	q Stat	q Table	Probability P < 0.05
White wines						
Cu	C – O	0.5430	0.1407	5.4561	2.8605	0.0004
Fe	C – O	3.8729	0.4788	11.4394	2.8605	0.0000
FRP	C – O	0.2639	0.0516	7.2372	2.8605	0.0000
TEAC^{EPR}_{DPPH}	C – O	0.3671	0.0553	9.3799	2.8605	0.0000
AAE	C – O	0.4297	0.1146	5.3008	2.8605	0.0006
% RS	O – C	18.6839	7.0098	3.7695	2.8605	0.0111
Citric acid	C – O	379.6092	78.5159	6.8375	2.8605	0.0000
b*	O – C	1.1745	0.4387	3.7864	2.8605	0.0108
chromaticity	O – C	1.2198	0.4591	3.7571	2.8605	0.0114
Catechin	C – O	6.6558	1.3507	6.9687	2.8605	0.0000
Epicatechin	C – O	4.2766	1.0747	5.6277	2.8605	0.0003
Red Wines						
Fe	C – O	2.5495	0.5698	6.3278	2.9600	0.0003
AAE	C – O	0.5662	0.1456	5.4996	2.9600	0.0010

* C-O - higher marker content in conventional wines, O-C - higher marker content in organic wines).

Table 3. Stepwise discriminant marker selection to differentiate Slovak organic and conventional wines (Tolerance: 0.001; F-to-Enter: 3.8416 (5.0%); F-to-Remove: 2.7056 (10.0%).

Marker	Entered at Step	F-to-Enter	Probability	Wilks' Lambda
P < 0.05				
White wines				
Fe	1	65.4301	0.0000	0.3735
TEAC_{DPPH}^{EPR}	2	31.4656	0.0000	0.2043
FRP	3	9.9053	0.0033	0.1612
% RS	6	4.5949	0.0395	0.0951
Red wines				
Fe	1	20.0208	0.0003	0.4869
AAE	2	4.5663	0.0474	0.3884

Table 4. Biomarkers content variation in organic and conventional white and red Slovak wines.

Biomarkers	Wine type ^{b)}	Valid cases	Unit	Mean	Median	St. dev.	Coeff. var.	Min.	Max.	Range
White wines										
Cu	O	18	mg.l ⁻¹	0.19	0.13	0.16	0.86	0.02	0.47	0.45
Cu	C	23	mg.l ⁻¹	0.73	0.65	0.58	0.79	0.03	1.97	1.94
Fe	O	18	mg.l ⁻¹	1.37	1.31	0.52	0.38	0.60	2.68	2.08
Fe	C	23	mg.l ⁻¹	5.24	5.03	1.97	0.38	1.30	10.57	9.27
FRP	O	18	AU	0.72	0.73	0.16	0.23	0.36	0.96	0.59
FRP	C	23	AU	0.98	1.00	0.17	0.17	0.66	1.30	0.65
TEAC^{a)}	O	18	mmol.l ⁻¹	0.35	0.36	0.14	0.40	0.17	0.64	0.47
TEAC^{b)}	C	23	mmol.l ⁻¹	0.72	0.68	0.20	0.28	0.37	1.08	0.71
AAE	O	18	mmol.l ⁻¹	0.24	0.17	0.18	0.75	0.06	0.77	0.71
AAE	C	23	mmol.l ⁻¹	0.67	0.73	0.46	0.69	0.09	1.42	1.32
RS	O	18	%	64.80	62.41	9.40	0.15	52.00	80.34	28.35
RS	C	23	%	46.12	48.67	28.48	0.62	-8.06	88.46	96.52
Catechin	O	18	mg.l ⁻¹	1.76	0.97	1.40	0.79	0.97	5.52	4.55
Catechin	C	23	mg.l ⁻¹	8.42	7.88	5.58	0.66	1.61	26.55	24.94
Epicatechin	O	18	mg.l ⁻¹	1.77	0.96	1.84	1.04	0.36	6.16	5.80
Epicatechin	C	23	mg.l ⁻¹	6.04	6.47	4.25	0.70	0.36	18.77	18.41
b*	O	18	AU	3.08	2.92	1.95	0.63	1.17	9.11	7.93
b*	C	23	AU	1.91	1.89	0.69	0.36	0.88	3.98	3.10
Chroma	O	18	AU	3.15	2.95	2.06	0.65	1.20	9.71	8.51
Chroma	C	23	AU	1.93	1.90	0.69	0.36	0.89	4.01	3.12
Citric acid	O	18	mg.l ⁻¹	168.88	151.05	93.06	0.55	4.60	485.50	480.90
Citric acid	C	23	mg.l ⁻¹	548.49	554.50	321.96	0.59	127.30	1305.90	1178.60
Red wines										
Fe	O	9	mg.l ⁻¹	1.76	1.62	0.48	0.27	1.17	2.42	1.24
Fe	C	12	mg.l ⁻¹	4.31	4.59	1.65	0.38	1.00	6.43	5.43
AAE	O	9	mmol.l ⁻¹	0.19	0.18	0.13	0.72	0.08	0.52	0.44
AAE	C	12	mmol.l ⁻¹	0.75	0.67	0.42	0.56	0.26	1.69	1.43

^{a)} TEAC_{DPPH(EPR)} (O- organic); ^{b)} TEAC_{DPPH(EPR)} (C- conventional)