

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

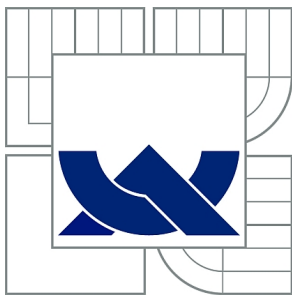
VYUŽITÍ ANALYTICKÝCH TECHNIK A CHEMOMETRIE K
AUTENTIFIKACI VÍN

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

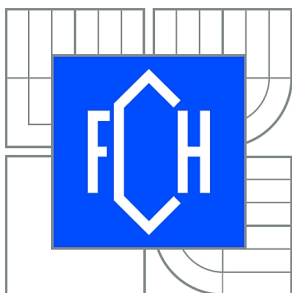
Ing. JAROMÍR POŘÍZKA

BRNO 2015



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

VYUŽITÍ ANALYTICKÝCH TECHNIK A CHEMOMETRIE K AUTENTIFIKACI VÍN

APPLICATION OF ANALYTICAL TECHNIQUES AND CHEMOMETRY FOR AUTHENTICATION
OF WINE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. JAROMÍR POŘÍZKA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0118/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Ing. Jaromír Pořízka	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Využití analytických technik a chemometrie k autentifikaci vín

Zadání dizertační práce:

Analýza vzorků vín a vinné révy pomocí vybraných instrumentálních technik, zpracování naměřených dat pomocí vícerozměrné statistické analýzy, vypracování klasifikačních modelů pro diskriminaci moravských vín podle geografického původu, odrůdy a produkčního systému.

Termín odevzdání dizertační práce: 9.11.2015

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. Jaromír Pořízka
Student(ka)

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 3.9.2014

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Tato dizertační práce se zabývá využitím analytických technik ke stanovení prvkového profilu vín doplněné o analýzu vybraných polyfenolických látek. Pro účely prvkové analýzy byly použity dvě spektrometrické techniky a to Hmotnostní a Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS a ICP-OES). Analýza organických konstituentů ve víně byla provedena kapalinovém chromatografu s detekcí na diodovém poli (HPLC-DAD). Na základě znalostí o chemickém složení známých vzorků vín byly z těchto dat pomocí vícerozměrných statistických metod (shluková analýza, analýza hlavních komponent a kanonická diskriminační analýza) sestaveny matematické modely ke klasifikaci moravských vín dle geografického původu a odrůdy. Pro diskriminaci a klasifikaci moravských vín do 4 moravských vinařských podoblastí byly vytvořeny dva separátní modely pro bílá a červená vína. Úspěšnost klasifikace známých vzorků bílých vín byla 100% a u červených model pracoval s 96,43% úspěšností. Křížový validační test poté pomocí vytvořených modelů vykazoval 95% úspěšnost klasifikace neznámých vzorků bílých vín a 82,15% vzorků červených. Dále byl vytvořen matematický model pro odrůdovou klasifikaci vín, založený na prvkovém profilu zdrojových vzorků vín. Odrůdy vín Müller Thurgau, Ryzlink rýnský a Veltlínské zelené byly od sebe diskriminovány na základě 8 prvkových parametrů. Bylo dosaženo 95,83% diskriminace vstupních vzorků a 70,83% úspěšné klasifikace neznámých vzorků. Poslední oblast, do které byl směřován výzkum, se zabývala vyhodnocením možností využití prvkové analýzy a analýzy celkové antioxidační aktivity k určení agrotechnického systému produkce hroznů. Bylo zjištěno, že prvky jako je Cu, Zn a Mn mohou sloužit jako diskriminační parametry pro rozdělování vín dle systému produkce hroznů. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny tím, že každá agrotechnika využívá k ochraně rozdílných přístupů v aplikaci ochranných látek. Rozdíly v antioxidační aktivitě biovín a vín z hroznů z integrované produkce nevykazovaly statisticky významné rozdíly.

Klíčová slova

Víno, Réva vinná, autenticita, geografický původ, chemometrie, prvková analýza, HPLC, EPR

Abstract

This PhD. thesis is focused on application of different analytical techniques for determination of elemental composition of Moravian wine combined with analysis of selected polyphenol compounds. Two spectrometric techniques were used for elemental analysis of wine – Mass spectrometry and Optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS and ICP-OES). Analysis of organic constituents of wine was evaluated by High performance liquid chromatograph with diode array detector (HPLC-DAD). Data from analysis of wine were used for construction of mathematical models for determining geographical origin of wine and for determining type of varietal wine. Data handling was performed by usage of multivariate statistical methods (cluster analysis, principal component analysis and canonical discriminant analysis). For the discrimination of wine by the geographical origin, two separate models for white and red wine were constructed. Effectiveness of discrimination of Moravian wine (with knowledge about origin) into 4 wine regions was 100 % successful for white wine and 96,43 % for red wine samples. Those models were used for cross validation test of unknown samples with result 95 % successfully classified samples of white wine and 82,15% of red wine. Besides that, mathematical model for discrimination and classification of varietal wine was created. Müller Thurgau, Riesling and Gruner Veltliner were discriminated by the usage of 8 elemental parameters. Discrimination success rate of known samples was evaluated by canonical discriminant analysis with 95,83% of correctly classified known samples and 70,83% of correctly classified unknown varietal wine (cross validation test). In addition to these part of research, impact of different grape production systems on elemental composition of wine and *Vitis Vinifera* was studied. The core of the study was to find the connections between the type of agriculture and chemical properties of wine and *Vitis Vinifera*. Two agriculture systems were assessed – Organic agriculture and Integrated pest management. . Results of this study showed that quantity and manner of pesticide application is very important factor affecting the final elemental composition of the grapevine and wine, especially the content of copper, zinc and manganese. That knowledge can be used in the future for creation of classification model of wine according to grape production system. For comparison of radical scavenging activity, electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) with DPPH method was used. In the case of this study, the influence of vine growing under different farming systems on the total antioxidant activity of wine was found to be insignificant.

Keywords

Wine, *Vitis Vinifera*, authenticity, geographical origin, chemometrics, elemental analysis, HPLC, EPR

POŘÍZKA, J. *Využití analytických technik a chemometrie k autentifikaci vín*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 203 s. Vedoucí dizertační práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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 doktoranda

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval svým vedoucím Ing. Pavlu Divišovi Ph.D. a doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. a doc. za odborné vedení, trpělivost a stálou pomoc při řešení dizertační práce. V neposlední řadě bych rád poděkoval všem, kteří mi přinášeli inspiraci a jakkoliv přispěli k dokončení této práce. Můj velký dík také patří celé mé rodině za podporu jak psychickou tak i finanční a hlavně mé ženě a synovi za trpělivost, lásku a veškerou pomoc.

Obsah

1.	ÚVOD	12
2.	TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1.	Původ révy vinné a vína	13
2.2.	Vinohradnictví a vinařství v Čechách a na Moravě	13
2.2.1.	Vinařské oblasti České republiky	14
2.2.2.	Odrůdy pěstované v České republice	15
2.2.3.	Agrotechnické produkční systémy ve vinohradnictví České republiky	17
2.3.	Autenticita vína	19
2.3.1.	Odrůdová autenticita vína	20
2.3.2.	Autenticita geografického původu vína	22
2.3.3.	Autenticita produkčního systému	24
2.4.	Využití instrumentálních analytických technik ke stanovení autenticity vín	25
2.4.1.	Anorganická analýza	26
2.4.2.	Organická analýza	27
2.4.3.	Souhrn vybraných studií	31
2.5.	Statistická analýza dat - Chemometrie	33
2.5.1.	Shluková analýza	34
2.5.2.	Analýza hlavních komponent (PCA, Hotellingova transformace)	36
2.5.3.	Diskriminační analýza (DA)	37
2.5.4.	Analýza rozptylu (ANOVA)	39
2.6.	Použité analytické techniky	40
2.6.1.	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)	40
2.6.2.	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)	44
2.6.3.	Spektroskopie elektronové paramagnetické rezonance	47
2.6.4.	Vysoce účinná kapalinová chromatografie	50
3.	CÍLE PRÁCE	54
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	55
4.1.	Laboratorní vybavení	55
4.1.1.	Pomůcky	55
4.1.2.	Chemikálie	55
4.1.3.	Seznam použitých přístrojů	55
4.2.	Vzorky	56
4.2.1.	Vzorky vín	56
4.2.2.	Vzorky hroznů a listů <i>Vitis Vinifera</i>	59
4.3.	Instrumentální metody	63
4.3.1.	Metodika prvkové analýzy vzorků vín a révy pomocí ICP-MS	63
4.3.2.	Metodika prvkové analýzy vzorků vín a révy pomocí ICP-OES	67

4.3.3. Stanovení antioxidační aktivity vzorků vína pomocí EPR spektrometrie.....	69
4.3.4. Metodika stanovení vybraných organických látek ve víně pomocí HPLC	70
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	73
5.1. Validace instrumentálních metod	73
5.1.1. Validace ICP-MS metod	73
5.1.2. Validace ICP-OES metod	75
5.1.3. Validace HPLC metody	75
5.2. Výsledky analýz vzorků vín	78
5.2.1. Bílá vína.....	79
5.2.2. Červená vína	82
5.3. Autentifikační modely vín z Moravské oblasti	85
5.3.1. Diskriminace a klasifikace moravských bílých vín dle geografického původu	86
5.3.2. Diskriminace a klasifikace moravských červených vín dle geografického původu.....	103
5.3.3. Odrůdová autenticita	120
5.3.4. Vyhodnocení možností využití prvkové analýzy a analýzy celkové antioxidační aktivity k určení systému produkce hroznů	134
6. ZÁVĚR.....	142
7. SEZNAM LITERATURY	144
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	162
9. SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA	163
10. PŘÍLOHY.....	166

1. ÚVOD

Víno je jedinečný alkoholický nápoj, historicky úzce spojený s vývojem lidské civilizace. Postupem času se víno stalo také významným obchodním artiklem. Cenná byla vždy především vína věhlasných regionů, který si získala reputaci díky své výjimečné kvalitě (Luykx a kol. 2008). S nárůstem obchodu s víny se také stále více začal projevovat problém s falšováním, neboť víno je díky svému složení snadno padělatelné mnoha způsoby (Lees 2003). V dnešní době jsou Státní zemědělská a potravinářská inspekce a další kontrolní instituce často konfrontovány s výrobky, které jsou nesprávně či falešně označené a jsou vydávány za originální produkt s cílem generovat vyšší zisk. Tento problém nabyl na vážnosti s otevřením globálního trhu s víny.

K určení autenticity a ke klasifikaci vín (určení geografického původu, odrůdy a typu agrotechniky) se využívá celá řada analytických technik rozdělených do 4 základních skupin – hmotnostní spektrometrické techniky, spektroskopické techniky, separační techniky a techniky ostatní. K popisu tak komplexní směsi, jakou je víno, je třeba analýzy značného množství analytů. Informace o jednom vzorku tak může být charakterizována, pro účely klasifikace vín, desítkami parametrů. Pro zpracování takto velkého objemu dat je nutné ke zpracování výsledků analýz využít vědní disciplíny zvané **Chemometrie**, která využívá matematických a statistických metod k získávání maxima relevantních informací z experimentálních dat. Pomocí chemometrické analýzy je možné zpracovat velké množství chemicko-fyzikálních parametrů, které charakterizují specifický ‘‘otisk prstů‘‘ jednotlivých skupin vín (Eckschlager 1991). V nedávné době byla vypracována řada studií, které prokázaly, že je možné rozlišit odrůdy, ročník či původ vína z chemického složení. Často ale ke klasifikaci využívají pouze omezenou skupinu parametrů (prvkový profil, izotopová analýza, organická analýza) (Luykx a kol. 2008).

Cílem této disertační práce bylo vytvořit robustní diskriminační a klasifikační matematicko-statistický model, sloužící k určení autenticity a klasifikaci moravských vín, konkrétně k zařazení vín do skupin podle geografického původu, odrůdy a typu agrotechniky použité při pěstování révy vinné. Modely byly založeny na kombinaci parametrů získaných multielementární analýzou vín a révy na ICP-MS a ICP-OES a analýzou vybraných organických analytů pomocí kapalinové chromatografie (HPLC). Pro stanovení vlivu agrotechniky na antioxidační aktivitu vín bylo využito techniky Elektronové paramagnetické rezonance (EPR). K vyhodnocení dat byly využity techniky vícerozměrné analýzy, jako je analýza rozptylu (ANOVA), diskriminační analýza (DA), kanonická diskriminační analýza (DA), analýza hlavních komponent (PCA) a shluková analýza.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část této dizertační práce stručně shrnuje informace potřebné k pochopení problematiky autentifikace vín. Sdružuje výsledky ze zahraničních publikací na toto téma, se zaměřením na oblast klasifikace a diskriminace vín s využitím instrumentálních technik a pokročilých vícerozměrných statistických metod.

2.1. Původ révy vinné a vína

Pro vinohradnictví a vinařství je nejvýznamnějším druhem réva *Vitis vinifera L.* (réva vinná) patřící do čeledi *Vitaceae L.* Původ této rostliny je v Euroasijské oblasti a první výskyt se odhaduje do období před 65 miliony lety. Nejstarší nálezy révy vinné pochází z oblastí Sachalinu a Kazachstánu (Němec 1975). První archeologické záznamy o existenci vinohradnictví a vinařství jsou staré více než 7500 let. Nejstarší oblasti se nacházely v severozápadní části Turecka v horské oblasti dnešního Iránu a Iráku (McGovern a kol. 1996). Důkazem cílené výroby vína se staly nálezy vinařských lisů v království Udimu a objevení amfory v hrobce Narmer (staré přibližně 3150 let př.nl.) obsahující zbytky kvasinek *Saccharomyces cerevisie*, identifikovaných analýzou DNA (Stafford 1959; Barnard a kol 2011; Garnier a kol. 2003). Z Kavkazu se pěstování a výroba vína rozšířila do oblasti Egypta, Mezopotámie a Palestiny. Asyřané, Fénici, Řekové a Římané dále šířili révu do středozemní oblasti. V této oblasti víno nabylo společenského a náboženského významu, réva se šířila dále po Evropě a v rámci kolonizace i do Severní a Jižní Ameriky, čímž se stala globální plodinou (Johnson a kol 2009).

2.2. Vinohradnictví a vinařství v Čechách a na Moravě

Réva vinná se na Moravě poprvé objevila za vlády římského císaře Marka Aurelia Proba (Pavloušek 2007). V současné době registrované vinice na území České republiky zaujímají plochu 17 463,51 ha (Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2014). Rozložení vinařských ploch v ČR bylo v roce 2014 následující:

obhospodařované plochy vinic	17 463,51 ha
plochy vykloučených vinic	71,43 ha
plochy s právem na opětovnou výsadbu vinic	853,01 ha
stávající práva na výsadbu ve státní rezervě	1 245,50 ha

Tabulka 1: *Situace vinohradnických ploch v ČR v roce 2014 (Situční a výhledová zpráva réva vinná a víno 2014)*

Vinařská podoblast	2013	2014	přírůstek/úbytek (%)
Čechy	644,1	652,4	1,3
litoměřická	285,9	301,2	5,4
mělnická	348,0	341	-2,0
Čechy - ostatní	10,2	10,3	0,7
Morava	16 912,8	17 015,9	0,6
mikulovská	4 611,1	4 689,0	1,7
slovácká	4 313,0	4 354,2	1,0
velkopavlovická	4 823,7	4 8306,9	0,3
znojemská	3 155,6	3 126,2	-0,9
Morava-ostatní	9,4	9,6	1,6
Celkem	17 557,0	17 668,4	0,6

Tabulka 2: *Plocha ČR osázená vinohrady (údaje jsou v ha) (Situční a výhledová zpráva réva vinná a víno 2011)*

ČR spadá do severně položených oblastí a řadí se mezi státy s vinohradnictvím chladného podnebí, které vytváří vhodné podmínky pro zrání hroznů. Teplé dny a studené noci kladně stimulují biosyntézu aromatických a fenolických látek (Pavloušek 2011).

2.2.1. Vinařské oblasti České republiky

Členění vinařských oblastí bylo poprvé stanoveno zákonem v roce 1994. Dle aktuálního platného zákona 321/2004 Sb. existují na území České republiky dvě vinařské oblasti – **Česká a Moravská**. Jedná se o dvě geologicky a klimaticky rozdílné oblasti produkující vína

s rozdílným chemickým složením (Linhart a kol. 2007 a Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2014).

2.2.1.1. Česká oblast

Oblast se vyznačuje nesouvislým vysázením vinic, které jsou vysázeny většinou kolem říčních toků Vltavy, Labe, Berounky a Ohře. Dělí na dvě podoblasti – litoměřická a mělnická a zasahuje do Ústeckého, Středočeského a Libereckého kraje. V oblasti je zaregistrováno 72 vinařských obcí s celkovou osázenou plochou 640 ha. Díky krajinné a geologické různorodosti je tato oblast charakteristická produkcí vín s rozmanitým chemickým složením (Kraus 2008 a Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2014). Hlavní odrůdy pěstované v této oblasti jsou Müller Thurgau, Ryzlink rýnský, Modrý Portugal a Svatovavřínecké (Pavloušek 2011). Česká oblast je zařazena do evropské zóny A, s povoleným doslazováním vín (Linhart a kol. 2007).

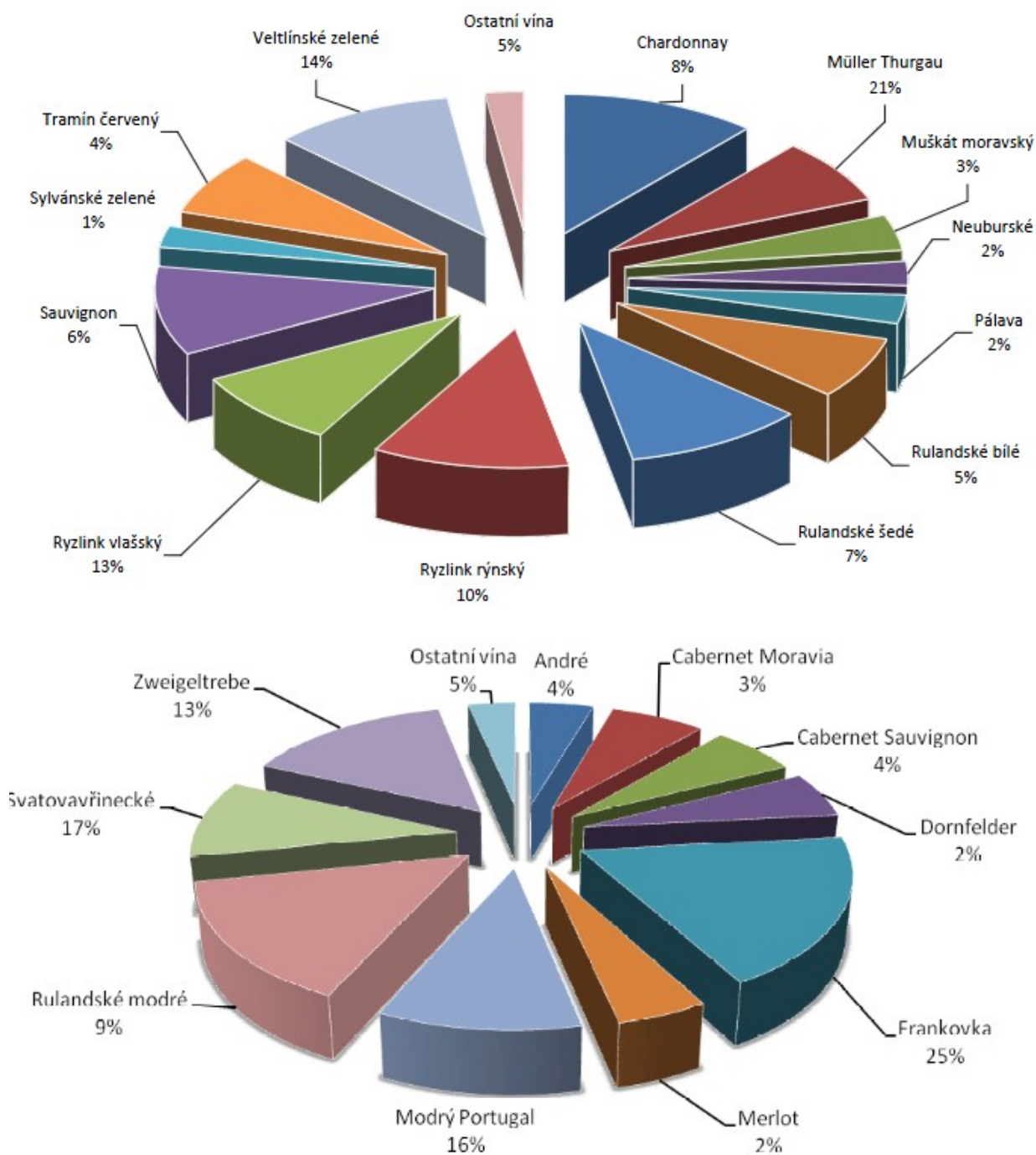
2.2.1.2. Moravská oblast

Tato oblast se rozprostírá v oblasti moravských krajů a dělí se na 4 podoblasti – slováckou, velkopavlovickou, mikulovskou a znojenskou. S rozlohou vinic 16 698 ha zaujímá více než 96 % všech osázených ploch v České republice a zaregistrováno je zde celkem 312 vinařských obcí (Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2011). Vyznačuje se vyššími průměrnými teplotami než oblast Česká (Kraus 2008). Moravské vinice se řadí do evropské zóny B společně s navazujícími vinohrady ze Slovenska a Rakouska. V této zóně jsou nastavena přísná pravidla pro doslazování (Linhart a kol. 2007). Nejpěstovanější odrůdy v moravské oblasti jsou Müller Thurgau, Veltlínské zelené, Svatovavřínecké, Frankovka, Ryzlink vlašský a Ryzlink rýnský (Pavloušek 2011).

2.2.2. Odrůdy pěstované v České republice

Podstatou vinařství a vinohradnictví v České republice je produkce odrůdových vín, proto je výběr odrůd velice široký. Všechny pěstované odrůdy pro komerční účely musely projít zkouškami pro registraci odrůd a byly zapsány do Státní odrůdové knihy České republiky (Encyklopedie révy). Tyto zkoušky musí být v souladu ustanovením podle §30 směrnice Komise 2004/29/ES ze dne 4. 4. 2004. Pro výrobu jakostních vín jsou povolené registrované odrůdy uvedeny v zákoně č. 321/2004 Sb. o vinohradnictví a vinařství. Zkoušky odrůd musely

potvrdit schopnost dosáhnout dobrou produkci v našich geografických podmínkách (Pavloušek 2007). Do odrůdové knihy jsou každoročně registrovány nové odrůdy. V letech 2011-2013 bylo registrováno celkem 9 nových odrůd. V odrůdové knize je k 31. 12. 2013 zapsáno celkem 30 bílých a 27 modrých moštových odrůd révy vinné. Nejčastější odrůdy a jejich podíl v zatříděných vínech jsou uvedeny níže, na obrázku 1.

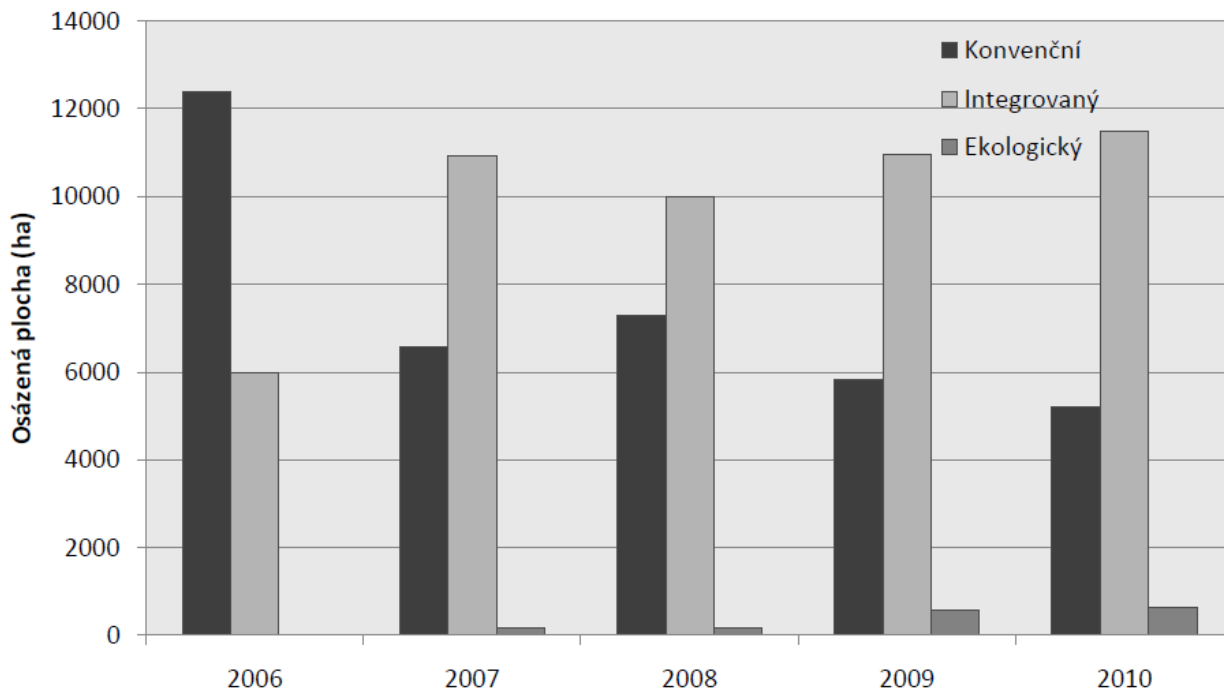


Obr. 1: Odrůdová skladba vinic v ČR (nahore bílé, dole modré odrůdy) [11]

2.2.3. Agrotechnické produkční systémy ve vinohradnictví České republiky

Zemědělství v Evropě prošlo během posledního desetiletí mnoha změnami. Produkční systémy stále více směřují k ekologickému přístupu pěstování plodin. Dle vypracovaných studií veřejnost vnímá potraviny pěstované ekologickým způsobem jako zdravější a bezpečnější než ty pěstované způsobem konvenčním (Brandt a kol. 2001; Woese a kol 1999). Tento trend kopíruje i vinohradnictví v České republice. Ze situačních a výhledových zpráv vydávaných ministerstvem zemědělství ČR je patrný od roku 2006 rapidní přechod k regulovanému hospodaření (viz obr. 2.2) (Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2007 – 2014). V současnosti je v ČR využíváno tří systémů produkce hroznů (Pavloušek 2011):

- Konvenční produkce hroznů
- Integrovaná produkce hroznů
- Ekologická produkce hroznů



Obr. 2: Vývoj používaných registrovaných hospodářských systémů na osázených viničních plochách v ČR (Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2007 – 2010)

2.2.3.1. Konvenční produkční systém

Jedná se o způsob ošetřování a vedení vinohradu používaný v podstatě v celém období 20. století. Cílem tohoto systému je maximalizovat výnosy plodiny bez ohledu na vliv na životní prostředí. K dosažení tohoto cíle se používá celá řada syntetických chemikálií používaných jako pesticidy nebo hnojiva. Důsledkem aplikace těchto chemikálií je snížení biodiverzity ve vinohradu. Mechanickým udržováním půdy dochází k jejímu extrémnímu utužení, což má negativní vliv na funkci kořenového systému révy (Pavloušek 2007). Na rozdíl od regulovaných agrotechnik (integrovaná a bio) se ošetřuje vinohrad v předem stanovených intervalech na základě fenofází, bez ohledu na náhodný tlak patogenů. V současné době je tento systém na ústupu (obr. 2) a nahrazuje jej systém integrované produkce (Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2006-2010).

2.2.3.2. Integrovaná produkce hroznů

Tento regulovaný systém hospodaření je v současné době nejpoužívanějším ve vinohradnictví. Dle situační zprávy ministerstva zemědělství je v tomto systému registrováno téměř 12 000 ha vinic (2/3 celkových registrovaných viničních ploch). Cowell a Clift (1995) prezentovali ideu, že výnosy z integrovaného hospodářství jsou někde mezi výnosy konvenčního a ekologického systému. Od té doby je integrovaný systém přijímán jako třetí cesta v zemědělství – je ekonomicky realistický, šetrný k životnímu prostředí a dlouhodobě udržitelný ve smyslu § 6 zákona č. 17/1992 Sb. o životním prostředí (Pavloušek 2011; Morris a Winter 1999). Celý systém českého integrovaného vinohradnictví je řízen směrnici Integrované produkce v ČR z roku 2010 popisující důsledný systémový přístup k celé technologii pěstování a zpracování révy. Aplikace ochranných látek je možná jen na základě krátkodobé prognózy a signalizace. Přednostně je využíváno ekologických prostředků pro ochranu rostlin a je zakázáno používat pesticidy, které nejsou schváleny pro integrovanou produkci. Nejčastěji využívanými ochrannými prostředky v systému integrované produkce hroznů jsou fungicidy na bázi mědi a zinku v anorganických i organických formách. Aplikační dávky těchto přípravků jsou limitovány konkrétními směrnici integrované produkce hroznů. Například maximální přípustné množství čisté Cu^{2+} je stanoveno na 2 kg/ha za rok (aktuálně v roce 2015) (Směrnice integrované produkce hroznů 2010).

2.2.3.3. Biologická produkce hroznů

Ochrana vinohradu v ekologickém vinohradnictví je založena na kombinaci preventivních opatření a na podpoře přirozeně se vyskytujících organismů (Ochrana révy vinné v eko. vinohradnictví 2007). V současné době se v ČR tímto systémem hospodaří na 649 ha registrovaných vinic. Ekologické vinohradnictví se řídí Nařízením Rady (EHS) č. 2092/91 o ekologické produkci zemědělských produktů a potravin a zákonem č. 242/2000 Sb. o ekologickém zemědělství, včetně vyhlášky 53/2001 Sb. Vinař využívající tento systém musí přihlásit svoje produkty ke kontrole k jedné z akreditovaných organizací v ČR (Pavloušek 2011).

V ekologickém vinohradnictví není povoleno používání pesticidů ani minerálních syntetických hnojiv. Místo toho se využívají metody sázení směsí bylin do meziřadí vinice pro podporu výživy révy, aplikace přípravků na bázi jílovitých zemin, fenyklových olejů, vodního skla, feromonů a přípravků na bakteriální bázi. Jedinou výjimkou v restrikci využívání syntetických ochranných prostředků je možnost použití prostředků obsahující měď (hydroxid měďnatý, oxichlorid měďnatý, síran měďnatý), proti plísní révové a plísní šedé a to v množství 6 kg/ha za rok, což je 3x více ve srovnání s integrovanou produkcí hroznů (Ochrana révy vinné v eko. vinohradnictví 2007). Popis dostupných prostředků ochrany rostlin v ekologickém vinohradnictví je součástí legislativních předpisů uvedených výše.

2.3. Autenticita vína

Autentický, neboli pravý produkt má identitu právě takovou, za jakou je vydávána a za jakou ji považujeme (Sun 2008). Korektní značení má garantovat spotřebiteli původ, kvalitu a stanovit komerční hodnotu vyráběných vín. Víno je díky svému složení snadno padělatelné. Odborníci odhadují podíl falšovaných vín na trhu na 5% (Lerner K. a Lerner W. 2006). Cílem falšování vín je generovat vyšší zisk prodejem neoriginálního produktu. Způsobů padělání je více. Nejčastěji se jedná o použití falešných etiket, udávající nepravý původ, ročník či odrůdu vína. Další obvyklý způsob padělání vína je jeho ředění vodou nebo levnější variantou vína a modifikace vína použitím aromat a barviv (Lerner K. a Lerner W. 2006; Almeida a kol. 2001).

Evropská unie od roku 1992 aktivně chrání autenticitu regionálních potravin (včetně vín) vydáním nařízení 2081/82 a 2082/92 (novelizovaném v roce 2006 - 510/2006 a 509/2006) o ochraně údajů geografického původu a kontrole označení zemědělských a potravinářských produktů. V České republice se problematikou falšování vína zabývá Státní zemědělská a

potravinářská inspekce. Stále sofistikovanější postupy falšování vína iniciovaly zvýšenou vědeckou aktivitu v této oblasti. Během posledních dvou desetiletí se vědci z celého světa zabývají vývojem metod, schopných odhalovat podvodné praktiky označování a falšování vín, založených na analýze chemických konstituentů vína pomocí široké škály analytických technik a jejich kombinací (Arvanitoyannis 1999).

2.3.1. Odrůdová autenticita vína

V České republice jsou vyráběna především odrůdová vína. Jak bylo zmíněno výše, ve Státní odrůdové knize je zapsáno celkem 25 bílých a 17 modrých moštových odrůd révy vinné. Falšování odrůd záměnou za jinou odrůdu či směs je v České republice poměrně časté (Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2014).

Odrůdovou autenticitu vín lze hodnotit na základě analýzy **organických kyselin, fenolických a aromatických látek, aminokyselin, bílkovin, prvkové analýzy a analýzy DNA**. Obsah těkavých **aromatických látek a aminokyselin** ve víně je úzce spjatý nejen s biologickými vlastnostmi rostliny, ale i s biochemickou aktivitou kvasinek a jiných mikroorganismů, která je kromě jiných vlivů závislá na dané odrůdě révy vinné (Hernández-Orte a kol. 2002). Například botrytizovaná vína obsahují zvýšenou koncentraci primárních alifatických aminů, jakožto důsledek infekce *Botrytis cinerea*. To vytváří charakteristický profil těchto vín (Grindlay a kol. 2011; Sass-Kiss a Hájos 2005). K odrůdovému aromatu nejvýrazněji přispívají těkavé **terpenické sloučeniny** (Mateo a Jiménez 2000). Je známo přibližně 50 terpenických sloučenin. Převážně se jedná o monoterpenické alkoholy (např. linaol, geraniol, nerol, citronelol), přítomných nejčastěji ve slupkách muškátových odrůd (Pavloušek 2007). Kromě terpenů má vliv na charakteristické aroma odrůd také přítomnost **norisoprenoidů**, (hlavně u odrůdy Chardonnay - actinodol, vitispiran aj.), **methoxypyrazinů** (odrůdy Sauvignon, Cabernet Sauvignon a Cabernet Franc - 2-methoxy-3isobutyl, 2-methoxy-3-isopropyl, 2-methoxy-sec-butyl a 3-methoxy-3ethyl), **esterů, aromatických alkoholu a acetátů vyšších alkoholů** (Jackson 2008). Další skupinou organických látek vhodných pro diferenciaci vín dle odrůdy jsou **fenolické sloučeniny**. Jedná se o komplexní skupinu molekul s rozlišnou strukturou, vlastnostmi a velikostí (od monomerů až po polymery). Biochemické dráhy syntézy polyfenolů jsou silně ovlivňovány genetickou a enzymatickou výbavou rostliny. Obsah těchto látek se v révě se tak liší mezi jednotlivými odrůdami (Makris a kol. 2006). K účelu stanovení odrůdové autenticity se dá využít parametrů

ze široké skupiny polyfenolů, ale „otisk prstů“ barevných antokyanů lze aplikovat pouze u vín z hroznů modrých odrůd (Brossaud a kol. 1999; Czochanska a kol. 1979).

Pro odrůdovou autentifikaci vín je možné využít také **prvkovou analýzu**, i když její použití pro tyto účely je méně časté. Rozdíly v kořenovém systému jednotlivých odrůd révy se projevují odlišným příjmem rozpuštěných minerálních látek z půdy. Růst kořenů je ovlivněn genetickou výbavou rostliny, environmentálními vlivy, vlastnostmi půdy a typem výsadby. Réva vinná má svůj kořenový systém složen ze starých a nových kořenů, které se často obnovují. Staré dřevnaté kořeny jsou zakořeněny hluboko (až 6m) v zemi, vytváří oporu rostlině a dodávají vodu a živiny z větších hloubek. Starší a autochtonní odrůdy mají obvykle rozsáhlejší kořenový systém než odrůdy moderní a obecně se liší poměrem nových a starých kořenů (Siddique 1990). Odrůdy se také liší v ranosti produkce plodů, citlivostí na nedostatek kyslíku v půdě, tolerancí zamokření kořenů a v neposlední řadě přístupností kořenových buněk k mykorrhizální symbióze. Tato symbióza s houbovými mikroorganismy silně ovlivňuje příjem anorganických látek, zejména P, NH₃, Ni, S, Mn, B, Fe, Zn, Cu, Ca a K. Chrání proti toxickým prvkům jako je Pb a Cd. V období sucha tvoří houby chelatační látky a tím zvyšují dostupnost kovů (Eshel a Beeckman 2013). Kromě kořenů se také různé odrůdy révy vinné liší svou fyziologií – výška, velikost listů, plodů atd. To se také projevuje na distribuci látek v rostlině (Jackson 2008). Všechny zmíněné faktory potenciálně mohou ovlivňovat prvkový profil vinného moštu, respektive vína a mohou být využity pro diskriminaci a klasifikaci odrůdových vín. Jelikož ale dochází k mnoha interakcím genotyp x prostředí x výrobní proces, může být prvkové složení ovlivněno natolik, že ho nelze využít pro klasifikaci vín. Je vhodné multielementární analýzu zkombinovat s analýzou organických látek ve víně a rozšířit tak skupinu parametrů vstupujících do klasifikačního modelu z jiných analytických technik (Greenough a kol. 2005; Almeida a kol. 2003; Charlton a kol. 2010).

Nově se pro diferenciaci vín dle odrůdy začíná využívat analýza rostlinné **DNA**, využitím polymerázové řetězové reakce (PCR). Je schopna odhalit drobné genetické odlišnosti jednotlivých odrůd. Problémem ale často bývá nízká koncentrace DNA, přítomnost jiných DNA (z kvasinek, bakterií) a vysoký obsah polyfenolů, inhibující polymerázovou řetězovou reakci. Tento problém lze částečně korigovat volbou vhodné metody pro extrakci DNA. Přes všechny komplikace se momentálně jedná o nejpřesnější metodu charakterizace odrůd (Jackson 2008).

2.3.2. Autenticita geografického původu vína

Geografická pozice, půdní podmínky, vlivy geologického podloží, klimatické a mikroklimatické vlivy jsou faktory, které spolupůsobením vytváří jedinečné vlastnosti vín, typické pro danou oblast (Linhart a kol. 2007; Suk 1995). Fyzikální a chemické vlastnosti **půd** mají hlavní podíl na výsledné podobě vín. Vznik půdy je dlouhodobý proces, závislý na parametrech stanoviště, geologického substrátu, klimatických podmínkách a na okolním porostu. Horniny a geologické útvary se často příliš neliší v rámci mnoha km², naopak diverzita půd se může měnit i na několika m². České vinařské oblasti mají v půdě menší podíl spraší než v krajině moravské, bohatší na obsah vápníku. Jedná se hlavně o hnědozemě a hnědé půdy. V údolí Labe zase převládají těžší jílovité půdy z křídových sedimentů. V oblasti Litoměřicka a Žernoseků obsahují navíc příměs vulkanického skeletu. Na druhou stranu, složení moravských půd je velice pestré a není výjimkou, když se v rámci jednoho vinohradu vyskytuje více půdních typů. Díky hluboké orbě je viniční půda často směsí několika rozdílných materiálů.

Další významným faktorem, vytvářejícím charakteristické znaky vín z daných oblastí, jsou **hydrogeologické podmínky**. Vodní srážky na jižní Moravě jsou v průměru nižší než v oblastech českých vinic. Deficit je zčásti nahrazován přítomností hlubinných vod a částečně umělým zavlažováním. Hlubinné vody obsahují rozpuštěné minerální látky a stopové prvky. Kromě podoblasti Mikulovské a části podoblasti Znojenské je téměř všude na vinicích jižní Moravy přítomnost souvislé hladiny podzemní vody (Linhart a kol. 2007).

Linhart a kol. 2007 zhodnotili rozdíly vinařských oblastí a podoblastí České republiky a konstatovali, že Česká oblast, včetně obou podoblastí je velice nehomogenní, co se týče podmínek pěstování révy. Obě oblasti netvoří souvislé území a dá se využívat jen určitých vhodných míst. Moravské podoblasti jde také velice dobře oddělit. **Znojenská podoblast** má v půdě převahu spraší i příznivé řečištní sedimenty. Má také charakteristické klima, se splývajícími znaky klimatu oceánského a kontinentálního. Svou homogenitou podmínek se Znojenská oblast blíží **podoblast Slovácká**. Má však odlišné klima (pronikají nevhodné severní větry) a jiné půdní složení. Mikulovská podoblast se dělí na dvě odlišné části – Pavlovské vrchy a podhůří s vápnatými půdami s výjimečným profilem stopových prvků a Wienské pánve s mohutnými sprašemi a říčními náplavami. **Velkopavlovická podoblast** je tvořena všemi geologickými útvary jižní Moravy. Tyto skutečnosti se odrážejí na chemickém složení révy vinné, respektive vína.

Stanovení **prvkového profilu** vína je vysoce efektivní pro určení geografického původu, díky přímé spojitosti se složením půdy ve vinohradu. Charakteristickým znakem může být koncentrace makroprvků (K, Na, Ca, Mg), i prvků stopových a ultrastopových (Medina 1996). Minerální profil však může být ovlivněn vlivy agrotechniky, výrobní technologií nebo skladováním, což může vést k ovlivnění správnosti zařazení vín do jednotlivých kategorií. Li, B, Mg, Ca, Mn, Zn, Rb, Sr, Cs, Pb a prvky vzácných zemin vykazují minimální změny koncentrace v moštu během výrobního procesu (Nicolini a kol. 2004). Jsou tak vhodné pro zařazení do klasifikačního modelu. Výhodné je pomocí multielementární techniky ICP-MS stanovit kompletní prvkový profil vín a na základě analýzy rozptylu a dalších chemometrických metod vybrat prvky mající vliv na rozdělení vzorků do skupin dle podoblastí (Luykx a kol. 2008).

Izotopické poměry stabilních prvků přijímaných rostlinou zůstávají již neměnné a jejich stanovením lze získat vynikající ukazatel geografického původu. Nejčastěji se jedná o poměry $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ v molekulách vody a ethanolu obsažených ve víně. Například $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ je poměr závislý na vzdálenosti od oceánu a nadmořské výšce vinohradu (Luykx a kol. 2008). Dalším izotopickým indikátorem je poměr izotopů Stronciumu. Rozpadová řada Rubidia ^{87}Rb vede ke vzniku izotopu ^{87}Sr . V horninách se tak v závislosti na geologickém stáří mění poměr $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (Almeida a kol. 2003).

Kromě anorganické a izotopové analýzy se pro klasifikaci vín dle geografického původu využívá také analýzy organických složek vína. **Polyfenolický profil** je ovlivněn klimatickými podmínkami stanoviště, na kterém je réva pěstována. Rozdílné teploty, doba slunečního záření, vlhkost a dostupnost vody ovlivňují biochemické dráhy a enzymy zodpovědné za syntézu těchto látek (Makris a kol. 2006). Etievéant a kol. (1989) a Shimoda a kol. (1993) prokázali, že koncentrace **těkavých organických sloučenin** (např. alkanů, aldehydů, alkoholů) je vhodný parametr ke klasifikaci vín dle geografického původu. Jednu z nejstarších dostupných studií zabývající se diskriminací vín dle geografického původu vypracoval Derde a kol., již v roce 1983. K diskriminaci francouzských vín do různých francouzských regionů použili fingerprintingu založený na **aminokyselinovém profilu** zkoumaných vzorků. Využili faktu, že obsah aminokyselin v hroznech je závislý na klimatických podmínkách stanoviště, kde réva roste. Analyzovanými aminokyselinami byly arginin, alanin, tyrozin, valin a leucin. Na základě obsahu těchto látek byli schopni zařadit vzorky z různých regionů se 100% úspěšností.

2.3.3. Autenticita produkčního systému

Biovína mají na trhu obecně vyšší komerční hodnotu než vína z hroznů z vinic obhospodařovaných konvenčními postupy. Falšování je v tomto případě velice snadné. Pouhou záměnou etikety je možné konvenční víno vydávat za bio produkt. V současné době existuje jen velmi malé množství publikací, které by řešily problematiku autenticity produkčních systémů. Výběr parametrů pro klasifikační statistický model tedy závisí na publikacích, popisujících vliv ochranných prostředků, hnojiv a obdělávání na révu vinnou a víno. V kapitole 2.2.3 o agrotechnických produkčních systémech ve vinohradnictví České republiky byly shrnuty zásadní rozdíly mezi jednotlivými systémy. V ekologickém vinohradnictví se přísun živin do půdy realizuje využitím kompostů a chlévské mrvy. Jedná se o živiny v organické formě. Konvenční systém používá hnojiva obsahující dusík a další nutriety v rozpuštěné anorganické formě, rychleji a snáze dostupné kořenovému systému rostliny. Dostupnost anorganických specií dusíku má potenciál ovlivnit syntézu sekundárních rostlinných metabolitů jako jsou **proteiny a rozpuštěné pevné látky** (Rapisarda a kol. 2005). Hrozny pěstované regulovanými ekologickými systémy se vyznačují delším obdobím zrání v porovnání se systémem konvenčním, což je způsobené pomalejším uvolňováním dodávaných živin (Brandt a kol. 2001). Ve fázi zrání jsou formovány **polyfenolické sloučeniny** a díky delšímu období zrání je jejich koncentrace v bobulích vyšší. Fakt, že produkční systém může ovlivňovat mechanismy tvorby těchto sloučenin, se dá využít ke klasifikaci vín. Vybrané polyfenolické sloučeniny jsou prezentovány v tabulce 3 (Gambelli a Santaroni 2004).

Antokyany	Malvidin	Peonidin	Petunidin	Cyanidin	Delphinidin
Flavonoidy	Quercetin	Apigenin	Myricetin	Resveratrol	Prokyanidiny
Fenolické kyseliny	Galová	Kávová	Kumarová		
Ostatní	Resveratr				

Tabulka 3: Vybrané fenolické sloučeniny ke klasifikaci vín dle produkčního systému [47]

Konvenční systém je úzce spojený s využitím pesticidů. Salvo a kol. (2003) publikovali studii, zabývající se vlivem použití konvenčních pesticidů na koncentraci **Cd, Cu, Pb a Zn** ve vínech. Konvenční vína vykazovaly vyšší absolutní koncentrace těchto prvků. Vrček a kol. (2011) studovali vliv konvenční a bio agrotechniky na obsah polyfenolických látek, antioxidační aktivitu a obsah kovů v chorvatských vínech. Tato studie prokázala vyšší obsah Zn, Pb, As, Al, Cr a Ni u konvenčních vín. Obsah polyfenolů pak koreloval s antioxidační

aktivitou a byl vyšší u vín z bio produkce.

Parametry koncentrace Cu a Zn se dá efektivně využít i pro rozlišení vín z produkce integrované a ekologické. Dají se očekávat vyšší koncentrace Cu ve vzorcích bio vín, z důvodu vyšší povolené dávky pro ošetřování bio vinic, v množství 6 kg/ha za rok, proti 2kg/ha za rok u vinohradů s integrovaným systémem. Koncentrace zinku budou pravděpodobně vyšší u produkce integrované, kde je povolena aplikace fungicidů Mancozeb, který obsahuje zinek v organické komplexní formě. Tyto fungicidy jsou u bio produkce zakázány (Směrnice integrované produkce hroznů 2010; Ochrana révy vinné v ekologickém vinohradnictví 2007)

2.4. Využití instrumentálních analytických technik ke stanovení autenticity vín

Senzorické hodnocení prováděné odborníky bylo po dlouhou dobu jediným způsobem, jak určit autenticitu vína. Navzdory dlouhému vývoji má senzorická analýza vysokou míru nejistoty a nedokáže přesně určit původ vína (Luykx a kol. 2008). Nedostatky této techniky řeší moderní instrumentální analytické techniky, schopné identifikovat látky charakteristické pro jednotlivá vína, které jsou ve vínech často přítomny ve velmi nízkých či stopových koncentracích (Arvanitoyannis 1999). Sivertsen a kol. (1999) vypracovali komparativní studii, ve které pro klasifikaci původu 22 komerčních červených vín ze 4 hlavních francouzských vinařských regionů použili senzorickou analýzu a analýzu celkových polyfenolů na HPLC. Správnost zařazení byla u chemické analýzy 81,8 % oproti 63,6 % u analýzy senzorické.

V současné době existuje široký výběr instrumentálních analytických technik a jejich kombinací, vhodných ke stanovení charakteristických chemických složek vína (popsaných v této kapitole), využitelných jako parametry pro klasifikaci vín do skupin, v rámci identifikace jejich autenticity. V zásadě se tyto techniky rozdělují na dvě základní skupiny, a to na techniky anorganické a organické analýzy. Anorganické analýzy se využívá ke stanovení prvkového profilu vín a k určení izotopických poměrů stabilních prvků přijímaných rostlinou. Organická analýza se zaměřuje na stanovení aromatických těkavých látek, fenolických sloučenin, aminokyselin a aminů (Luykx a kol. 2008; Arvanitoyannis 1999).

2.4.1. Anorganická analýza

Jak bylo uvedeno dříve, izotopické poměry stabilních prvků přijímaných rostlinou již zůstávají neměnné a toho se dá využít při rozlišování vín dle geografického původu, stáří a odrůdy. Ke stanovení **izotopických poměrů** se využívá nejčastěji spektroskopie nukleární magnetické resonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie pro stanovení izotopických poměrů (IRMS). Pro účely autentifikace vín jsou stěžejní poměry izotopů $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ v molekulách vody a ethanolu obsažených ve víně (Grindlay a kol. 2011). Poměr $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ je závislý na vzdálenosti od oceánu, nadmořské výšce vinohradu a klimatu (Almeida a kol. 2001). Bréas a kol. (1994) využili této závislosti k rozdělení vín z různých evropských zemí dle geografického původu. Dalším izotopickým indikátorem je poměr izotopů Stroncium (Sr). Rozpadem nestabilního Rubidia ^{87}Rb vzniká izotop ^{87}Sr a tím se v horninách, v závislosti na geologickém stáří mění poměr $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (Almeida a kol. 2003). V praxi techniku izotopických poměrů použili Gimenez-Miralles a kol. (1995), kteří pomocí NMR stanovili poměr deuteria a vody k identifikaci odrůdové autenticity a geografického původu vína z oblastí Valencie. Rossmann (2001) správně zařadil testované vzorky vín dle geografického původu kombinací izotopických poměrů uhlíku z ethanolu a kyslíku z vody pomocí IRMS. Techniky stanovení izotopických poměrů jsou významné také při identifikaci stáří vína. K tomuto účelu se využívá poměr $^2\text{H}/^1\text{H}$ a obsah ^{18}O a ^{13}C ve vodě, respektive ve vinném destilátu. Kromě lehčích prvků se využívají k autentifikaci vín i těžké izotopy olova. Jsou celkem čtyři a tři z nich pocházejí z rozpadových řad uranu a thoria. Stanovením jednotlivých izotopů a poměru $^{206}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$ lze určit původní lokalitu vzniku vína a jeho stáří (Grousset a kol. 1994).

Celá řada autorů úspěšně potvrdila, že k identifikaci geografického původu vína lze využít **elementární analýzy**. Vznikly studie popisující regionální diskriminaci vín ve Španělsku (Iglesias a kol. 2007), Kanadě (Greenough a kol. 1994), Německu (Castineira a kol. 2004), Itálii (Marengo a Aceto 2003), Portugalsku (Pérez Trujillo a kol. 2011), Novém Zélandu (Angus a kol. 2006), Argentině (Fabani a kol. 2010), Jižní Africe (Coetzee a kol. 2005) a České republice (Šperková a Suchánek 2005). Vědci k problematice využití prvkové analýzy ke stanovení autenticity vín přistupovali často odlišně. Díaz a kol. (2003) k úspěšnému zařazení vín z Kanárských ostrovů využili skupinu 11 prvků (K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li, Rb), stanovených pomocí atomové absorpční a emisní spektrometrie (AAS a AES). Baxter a kol. (1997) ve své studii diskriminovali a klasifikovali španělská a anglická vína na základě analýzy 65 prvků technikou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-

MS). Extrémem v počtu použitých prvků je studie efektivně klasifikující vína ze severozápadního Španělska na základě analýzy dvou prvků, a to vápníku a baria (Latorre a kol. 1994). Kromě regionální diskriminace byla prvková analýza vín základem pro rozlišení vín dle odrůdy hroznů. V kombinaci s profilem organických kyselin, polyfenolů a aminů byli Charlton a kol. (2010) schopni s relativně vysokou úspěšností odlišit odrůdová vína (data byly vyhodnocována pomocí techniky klasifikačních a regresních stromů CART).

Technika ICP-MS otevřela možnosti rychlé, multielementární analýzy, kdy lze v jednom kroku analyzovat ve vzorku desítky prvků v ultrastopových koncentracích. Je tak možné stanovovat ve víně i prvky vzácných zemin (La, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Tb, Ho, Er, Tm, Yb, Lu) v koncentracích ng/l, což je v současné době velice účinné pro rozdělování vín do daných oblastí a podoblastí (Thiel a kol. 2004). Alternativními technikami k ICP-MS pro stanovení prvkového složení jsou optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) a atomová absorpční a emisní spektrometrie (AAS) (Jarvis a Grey 1990).

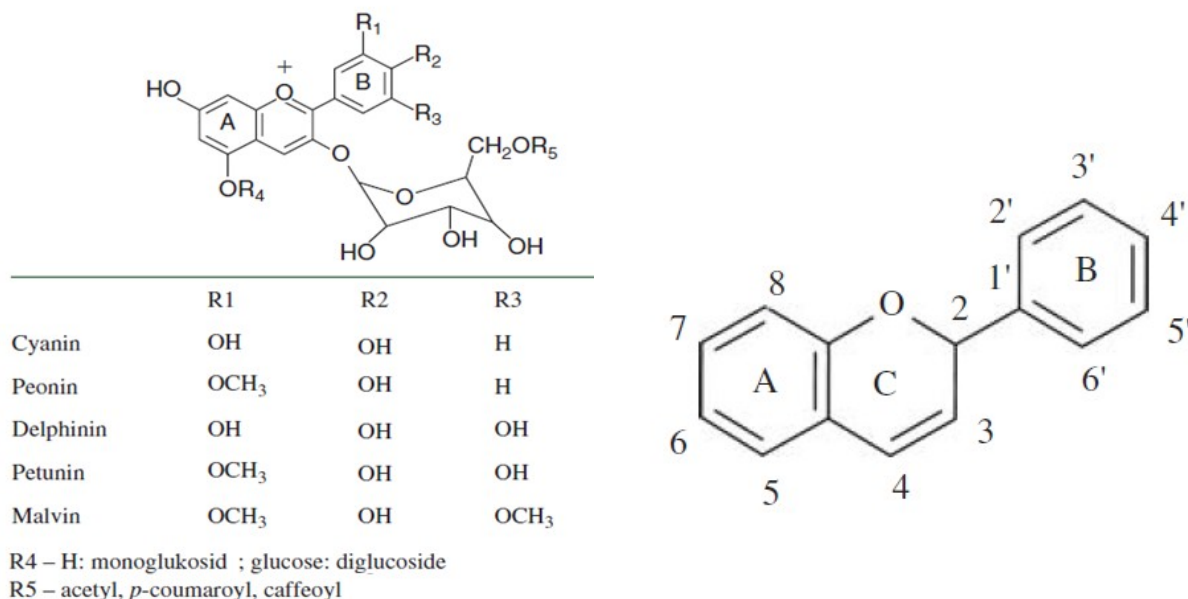
2.4.2. Organická analýza

Tato kapitola pojednává o konkrétním využití analytických instrumentálních technik používaných ke stanovení organických látek, které jsou potenciálními ukazateli pro určení autenticity vín. Tyto látky se dělí do tří základních skupin dle chemické podstaty – fenolické sloučeniny, aminokyseliny a aminy a těkavé aromatické sloučeniny.

2.4.2.1. Fenolické sloučeniny

V kapitole o autenticitě vín bylo uvedeno, že biochemické dráhy syntézy polyfenolů jsou ovlivněny genetickou výbavou jednotlivých odrůd, klimatickými a geologickými charakteristikami vinohradu (Makris a kol. 2006). Na základě těchto faktů byl systém stanovení obsahu fenolických a polyfenolických sloučenin úspěšně aplikován k identifikaci odrůdové autenticity a geografického původu vína v celé řadě studií. Fenoly jsou rozsáhlá skupina látek silně ovlivňujících sensorické vlastnosti vína. Podle struktury se dělí na dvě skupiny. Fenoly s flavonoidní a neflavonoidní strukturou. Je známo, že v průběhu zrání vína se fenolický profil vína mění. Oxidační procesy a rekombinace látek vede ke vzniku polymerních sloučenin, převážně tаниnů. Chuť a barva červených vín je z velké části ovlivněna přítomností antokyanů, pocházejících ze slupek modrých odrůd. Bílá vína obsahují antokyany jen v

minimální míře, proto se tento parametr hodí pouze ke klasifikaci červených a růžových vín (Jackson 2008; Haslam 2005).



Obr. 3: Antokyany ve vínech (Jackson 2008) **Obr. 4** Základní skelet flavonoidů (Jackson 2008)

K separaci a detekci fenolických látek se nejčastěji používá kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s detektorem diodového pole, UV-VIS detekcí a hmotnostním spektrometrem (MS), fluorescenční spektroskopie a plynové chromatografie (GC) (Luykx a kol. 2008; Dufour a kol. 2006). Koncentrace vybraných fenolických sloučenin se mohou výrazně měnit vlivem klimatických a přírodních faktorů. Kyseliny 3,4- Dihydroxybenzoová a trans-kumarová se ukázaly být stabilními sloučeninami ve víně a jejich stanovení sloužilo k zařazení vín dle odrůdy a původu v oblasti Penedés v Katalánsku (De la Presa-Owens a kol. 1995). Vergara a kol. (2011) využili pro zařazení různých odrůd vín z Chile výsledky z analýzy antokyanů a základních flavonolů v kombinaci se stanovením kyseliny šikimové. Identifikace a kvantifikace byla realizována na kapalinovém chromatografu s detekcí na diodovém poli, ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD-ESI-MS). Jako nejvýznamnější parametry k rozdělení se v tomto případě nejvíce osvědčil poměr sumy všech forem myricetinu k celkovému obsahu kvercetinu. Další studie klasifikující vína dle odrůdy byla provedena v Kanadě. Soleas a kol. (1997) identifikovali a kvantifikovali 15 individuálních polyfenolů a chemometricky analyzované výsledky úspěšně použili k zařazení vín z Niagarské vinařské oblasti. Před analýzou na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) se fenolické sloučeniny extrahovaly do ethylacetátu.

Celkový obsah polyfenolů ve spojení se sensorickou analýzou byl úspěšně aplikován

k určení geografického původu francouzských vín, kdy pomocí chemické analýzy bylo úspěšně klasifikováno 81,8% vzorků. Spojením s analýzou organoleptických vlastností vína byl poté vytvořen robustní statistický model, který diskriminoval a klasifikoval vzorky se 100% úspěšností (Grindlay a kol. 2011).

2.4.2.2. *Aminokyseliny a aminy*

Původ aminokyselin ve vínech může být různý. Aminokyseliny pocházející z hroznů mohou být částečně nebo úplně metabolizovány kvasinkami v období růstu. Některé jsou produkovány živými kvasinkami, mezitím co další se uvolňují do vína lyzí mrtvých buněk. Část také vzniká enzymatickým rozkladem proteinů z hroznů. Obsah aminokyselin ve víně je dále závislý na způsobu hnojení, klimatických podmínkách stanoviště a technologii výroby vína (Hernández-Orte a kol. 2002).

Stanovení aminokyselin pomocí instrumentálních analytických technik ve vínech bylo využito k určení geografického původu vín a k ověření odrůdové autenticity, v celé řadě studií. Vysoká koncentrace aminokyselin je běžná u šumivých vín a na základě tohoto faktu byla sestavena studie, porovnávající Šampaňská vína s ostatními šumivými víny. Celkem bylo na HPLC analyzováno 110 vzorků. Šampaňská vína vykazovala vyšší koncentrace všech aminokyselin, kromě argininu a byly se 100% úspěšností odděleny od vín ostatních (Tusseau a kol. 1996). Soufleros a Bertrand (1998) pomocí HPLC s fluorescenčním detektorem (FLD) stanovili ve více než 60 vínech z Bordeaux, Bourgogne, Alsaska a Champagne, 21 aminokyselin, těkavých látek a biogenních aminů. Na základě chemometrického vyhodnocení dat poté klasifikovali vína dle původu, typu a stáří. Etiévant a kol. (1988) v další francouzské publikaci analyzovali prostřednictvím HPLC aminokyselinový profil 34 francouzských vín ke klasifikaci vín dle odrůdy a původu. Soustředili se na stanovení prolinu, hydroxyprolinu, argininu, ornithinu, alaninu, serinu, glycinu, valinu, leucinu, asparaginu, treoninu, izoleucinu, metioninu, lysinu, tyrosinu, fenylalaninu, histidinu a ethanolaminu. Na základě analýzy hlavních komponent (PCA) a diskriminační analýzy (DA) vybrali pro efektivní rozdělení pouze dvě aminokyseliny z celé skupiny a to hydroxyprolin a ethanolamin. Dále je známo, že se obsah primárních alifatických aminů zvyšuje jako důsledek infekce hroznů plísní *Botrytis cinerea*. Z takto nakažených bobulí se vyrábějí specifická Tokajská vína. Sass-Kiss a kol. (2008) analyzovali 21 maďarských a 23 zahraničních tokajských vín. Jednotlivé aminy separovali pomocí HPLC s fluorimetrickým detektorem, při vlnových délkách 345 a 455nm. Maďarská tokajská vína byla segregována od zahraničních se 100% úspěšností.

2.4.2.3. *Těkavé aromatické sloučeniny*

Stanovení aromatických těkavých látek pomocí moderních analytických technik se nejvíce používá pro určení odrůdové autenticity. Aromatické těkavé látky ve vínech jsou nejčastěji terpenické sloučeniny, aromatické alkoholy, acetáty vyšších alkoholů, ethyl estery mastných kyselin, organické kyseliny. U mladých vín je ovocný aromatický charakter vytvářen obsahem ethyl esterů mastných kyselin a acetátů. Především u vín typu rosé je ovocné aroma přímo spojováno s přítomností esterů. Tyto estery v průběhu stárnutí vína hydrolyzují do forem původních alkoholů a kyselin. Analýzou této skupiny látek (nejčastěji pomocí GC) je tak možné rozdělovat vína podle stáří (Jackson 2008).

Ferreira a kol. (1995) charakterizovali rozlišné odrůdy vín pomocí aromatických sloučenin (ethyl estery mastných kyselin, acetáty vyšších alkoholů) izolovaných a identifikovaných ve víně kapalinovou a plynovou chromatografií (HPLC, GC). De La Presa-Owens a kol. (1995) s úspěchem využili k rozdělení bílých vín z oblasti Penedés v Katalánsku srovnání 19 vysoce těkavých a 8 aromatických sloučenin. Podobnou studii provedli ve stejný rok Garcia- Jares a kol. (1995), kteří k identifikaci a kvantifikaci těkavých a aromatických sloučenin (3-methyl-2-methylbutanol, ethyl-octanát, nerol, hexyl acetát, benzyl alkohol a dalších) použili techniku plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií se sektorovým polem (GC-MS-SF). Tento rozbor umožnil rozlišit vína z oblasti Rías Baixas od vín z okolních oblastí.

Monoterpeny a terpenické látky jsou významným zdrojem odrůdového aromatu. Je známo cca 50 monoterpenických sloučenin, z nichž nejvýznamnější jsou monoterpenické alkoholy (linalool, geraniol, nerol, citronelool a terpineol). Muškát a další odvozené specifické odrůdy (Ryzlink, Muller thurgau, Tramín, Ottonel a další) obsahují vysoké koncentrace těchto sloučenin. Mateo a Jimenez (2000) separoval monoterpeny pomocí iontově výměnné a gelové permeační chromatografie. Podle obsah monoterpenů pak rozdělil odrůdy na intenzivně aromatické muškátové odrůdy (koncentrace monoterpenů vyšší než 6 mg/l), nemuškatové aromatické odrůdy (1-4 mg/l) a neutrální odrůdy, jejichž aroma není ovlivněno monoterpenickými látkami.

Většina publikací z této oblasti potvrdila, že pro stanovení těkavých aromatických látek (kterých je ve víně více než 500) je ideální analytickou technikou plynová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). I přes vysokou citlivost hmotnostního spektrometru je vhodné těkavé látky před separací prekoncentrovat. Navíc je možné za plynový chromatograf zařadit olfaktometrický detektor a hodnotit odseparované vonné složky sensoricky (Jackson 2008; Sun 2008)

2.4.3. Souhrn vybraných studií

V níže uvedené tabulce jsou shrnuty některé vybrané publikované studie využívající instrumentální analytické techniky ke stanovení jednotlivých typů autenticity vín.

Tabulka 4: *Souhrn publikovaných studií*

Klasifikace vín dle	Klasifikační parametry	Instrument	Země původu	Reference
Geografického původu	K, Na, Ca, Mn, Mg, Fe, Rb, Cu, Sr, Li	AES	Španělsko	Frías 2003
Prvková analýza	Ca, Ba	AAS, AES	Španělsko	Latorre 1994
	K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li, Rb	AAE, AES	Španělsko	Díaz a kol. 2003
	B, Mg, Ca, V, Mn, Co, Fe, Zn, Rb, Sr, Cs, Pb	SF-ICP-MS	Německo	Castineira a kol. 2004
	65 prvků	ICP-MS	UK	Baxter a kol. 1997
	27 prvků	ICP-MS	ČR	Šperková a Suchánek 2005
	16 prvků	ICP-MS	Španělsko	Iglesias a kol. 2007
	20 prvků	ICP-MS	Kanada	Greenough a kol. 1997
	56 prvků	ICP-MS	Itálie	Marengo a Aceto 2003
	Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Rb, Li	AAS, AES	Portugalsko	Pérez Trujillo a kol. 2011
	Sr, Rb, Ni, Co, Pb, Mn, Cd, Ga, Cs	ICP-MS	Nový Zéland	Angus a kol. 2006
	K, Fe, Ca, Cr, Mg, Zn, Mn	AAS	Argentina	Fabani a kol. 2010
	40 prvků	ICP-MS	JAR	Coetzee a kol. 2005
Izotopické poměry	Prvky vzácných zemin, izotopy Pb a 23 dalších kovů	ICP-MS	Francie	Barbaste a kol. 2002
	Izotopická poměr 18O/16O	IRMS	Španělsko	Bréas a kol. 1994
	Izotopický poměr deuterium/voda	NMR	Španělsko	Giménez-Miralles a kol. 1995
	Izotopické poměry uhlíku a kyslíku z ethanolu a vody	IRMS	Německo	Rossmann 2001

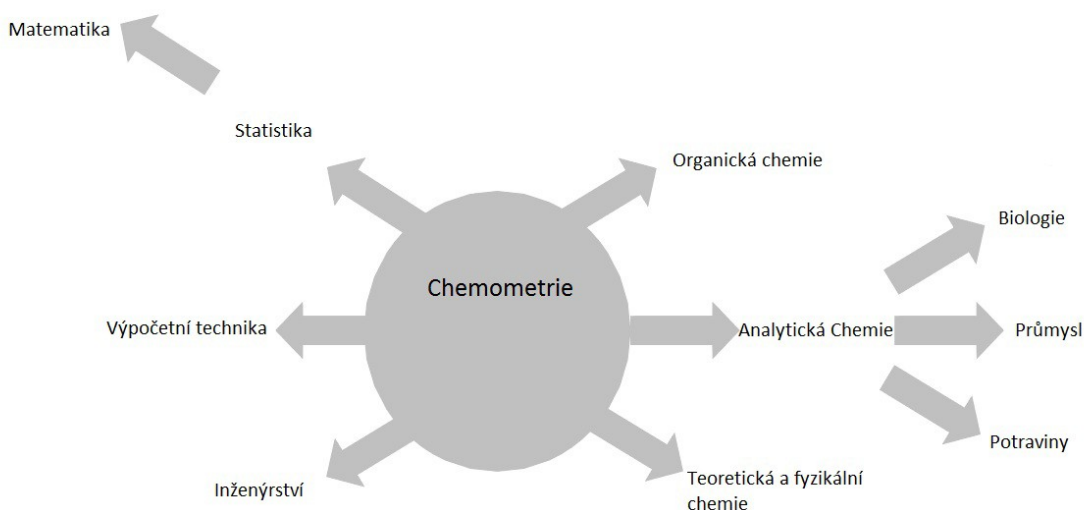
Tabulka 4 pokračování: Souhrn publikovaných studií

Klasifikace vín dle	Klasifikační parametry	Instrument	Země původu	Reference
Typu odrůdy	Fenolické sloučeniny			
	3,4-Dihydroxybenzoová kyselina a trans-kumarová kyselina	GC	Španělsko	De La Presa-Owens a kol. 1995
	Celkové obsah polyfenolů + senzorická analýza	HPLC	Norsko	Sivertsen a kol. 1999
	Aminokyseliny a aminy			
	Základní aminokyseliny	HPLC	Norsko	Sivertsen a kol. 1999
	21 aminokyselin a biogenních aminů	HPLC-FLD	Francie	Soufleros a Bertrand 1998
	18 aminokyselin	HPLC	Francie	Etiévant a kol. 1988
	Primární alifatické aminy	HPLC-FLD	Maďarsko	Sass-Kiss a kol. 2008
	Fenolické sloučeniny			
	3,4-Dihydroxybenzoová kyselina a trans-kumarová kyselina	GC	Španělsko	De La Presa-Owens a kol. 1995
	Antokyany, Flavonoly a kyselina šikimová	HPLC-DAD-ESI-MS	Chille	Vergara a kol. 2011
	15 individuálních polyfenolů	GC-MS	Kanada	Soleas a kol. 1997
	Aminokyseliny a aminy			
	21 aminokyselin a biogenních aminů	HPLC-FLD	Francie	Soufleros a Bertrand 1998
	18 aminokyselin	HPLC	Francie	Etiévant a kol. 1988
	Těkavé aromatické sloučeniny			
	Ethyl estery MK, acetáty vyšších alkoholů	HPLC, GC	Španělsko	Ferreira a kol. 1995
	19 těkavých a 8 aromatických sloučenin	GC	Španělsko	De La Presa-Owens a kol. 1995
	3-methyl-2-methylbutanol, ethyl-octanát, nerol, hexyl acetát, benzyl alkohol aj.	GC-MS-SF	Španělsko	García-Jares a kol. 1995
	Monoterpeny	IEC, GPC	Španělsko	Mateo a Jiménez 2000

2.5. Statistická analýza dat - Chemometrie

Vytvoření spolehlivého, fungujícího predikčního modelu umožňujícího zařazení neznámých vín do skupin dle geografického původu, odrůdy a agrotechniky vyžaduje podrobnou analýzu velkého množství vzorků s ověřeným původem. Moderní analytické techniky generují velké množství informací o zkoumaném vzorku. Například kompletní spektrum aromatických sloučenin vína často čítá až 800 látek (Jackson 2008). Vědci jsou konfrontováni s problémem správné interpretace takového množství dat. Situace se stala složitější poté, co se chromatografické techniky spojily s hmotnostní spektrometrií, popisující složení vzorků ve více rozměrech – chromatografickém a spektroskopickém (Wehrens 2011).

Problematika určování autenticity potravin je jedním z případů, kdy pro správné zařazení do skupin je třeba zpracovat velké množství dat, často z několika analytických technik. Ke zpracování takto velkých souborů se využívá vícerozměrných statistických technik jako je shluková analýza, diskriminační analýza, analýza hlavních komponent a analýza rozptylu. Tyto techniky patří společně s dalšími statistickými technikami do samostatné vědní disciplíny – Chemometrie (Eckschlager 1991).



Obr. 5 Spojení chemometrie s jinými vědními disciplínami (Brereton 2003)

2.5.1. Shluková analýza

Cílem shlukové analýzy je řadit objekty (vína) do skupin a to tak, aby dva objekty stejného shluku si byly podobnější, než dva objekty ze shluku jiného (Řezanková 2007). Analýza vyšetřuje podobnosti vícerozměrných objektů (tj. objektů, které jsou popisovány více proměnnými) a třídí je do shluků (Meloun a Militký 2004). Při této analýze není předem známá příslušnost jednotlivých objektů k určité třídě. Nemusí tedy existovat předběžná informace o počtu skupin dat nebo objektů. Nejedná se tedy o techniku klasifikace, u které je předem jasné do jakých skupin se budou objekty řadit. To je zásadní rozdíl mezi shlukovou analýzou a analýzou diskriminační (Anděl 2005).

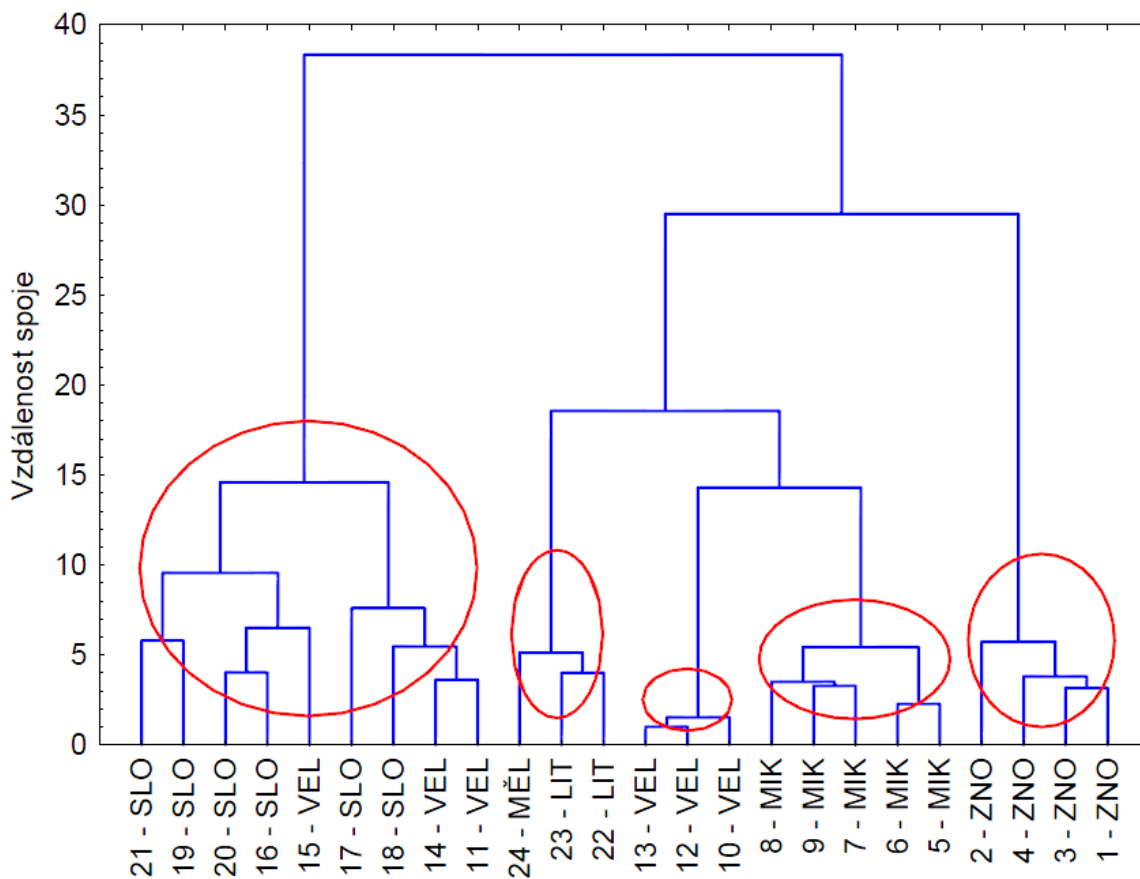
Podle způsobu shlukování dělíme tuto analýzu na (Morrison 1967):

- Hierarchickou
 - Aglomerativní
 - Divizní
- Nehierarchickou – vyžadují oproti hierarchickým metodám předběžnou informaci o počtu shluků, do kterých má být soubor dat tříděn

Pro aplikaci na data k určení autenticity vín se nejčastěji používá metoda SAHN, tj. sekvenční aglomerativní hierarchická metoda vytvářející nepřekrývající se shluky (Morrison 1967). Závislost na kvalitě úpravy zdrojových dat je u shlukové analýzy obecně vyšší než u jiných vícerozměrných analýz (Pytela 2003). Vyžaduje většinou následující posloupnost kroků:

1. Výběr dat – počet objektů musí nejméně 3x převyšovat počet znaků
2. Průzkumová analýza vícerozměrných dat – rychlé posouzení vztahů mezi sloupci (vlastnostmi) matice M-rozměrné náhodné veličiny (Ajvazjan a kol. 1981). Je možné využít metodu PCA k detekci tzv. Outlinerů neboli výrazně atypických odlehlých objektů, které je nutné z chemometrické analýzy vyloučit (Anděl 2003)
3. Předzpracování dat – standardizace dat odečtením aritmetického průměru a podělení směrodatnou odchylkou. Doporučené je i snížení dimenze některou z technik s latentními proměnnými (např. PCA). Snížením dimenze se zpracovává méně proměnných s vyšší významností a výstup je přehlednější
4. Výběr příslušné míry podobnosti objektů a výpočet matice podobnosti
5. Volba vhodné shlukovací procedury (vhodné použít několik metod)
6. Určení optimálního počtu shluků

7. Interpretace výsledků vzhledem k požadovanému rozdělení
8. Grafické a číselné zobrazení výsledků



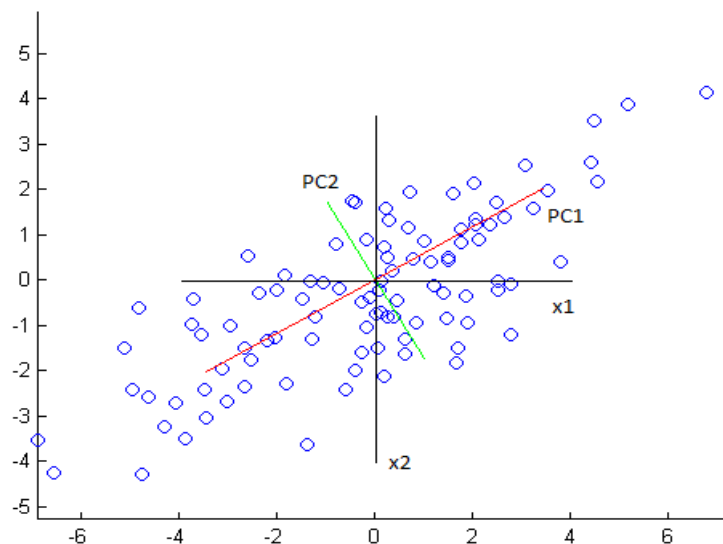
Obr. 6: Ukázkový dendrogram rozdělení vín z moravských podoblastí, se vzdáleností na svislé ose a s uspořádanými objekty na ose vodorovné (Škařupa 2012)

Shluková analýza není v některých případech příliš vhodná pro studium geografických rozdílů objektů, kdy je variabilita znaků v závislosti od gradientu prostředí (Anděl 2005). Výhodou je, že analýza nevyžaduje normální gaussovské rozdělení dat (Řezanková a kol. 2009).

2.5.2. Analýza hlavních komponent (PCA, Hotellingova transformace)

K určení autenticity vín se pracuje s velkým množstvím dat neboli znaků, z nichž některé nejsou pro analýzu významné. Identifikuje podstatné znaky v datech a zvýrazní jejich podobnosti a odlišnosti. Pomocí analýzy hlavních komponent je možné snižovat dimenzi, tj redukovat vysoký počet dat na výrazně menší počet nových znaků, tzv. hlavních komponent. Zkoumání těchto redukováných dat zjednodušuje zpracování a interpretaci. Při analýze je nutné zachovat v nových znacích původní informaci (Marhold 2001; Smith 2002). Původní data se nahradí novými vzájemně nekorelovanými. Tím se původní podstatná informace zkoncentruje do několika prvních ordinačních os, řazených v pořadí podle klesající variability. Nová osa 1 (1. Hlavní komponenta PC1) je vedena ve směru největší variability mezi objekty mezitím co druhá nova osa (2. Hlavní komponenta PC2) je kolmá na první osu a je vedena stejným způsobem. Původní systém os se v prostoru natáčí tak, aby se dosáhlo maximální variability mezi zkoumanými objekty a zároveň je relativní pozice objektů stále stejná jako v původním prostoru (Hendl 2006).

Na základě PCA dostaneme několik výsledků. Základem je komponentní skóre, což je soustava souřadnic objektů v nově vytvořeném prostoru, definovaném hlavními komponentami PC1 a PC2. Čím vyšší je skóre pro daný znak a komponent, tím významnější je daný znak pro rozdělení objektů podél určeného komponentu. Dalším výsledkem je grafické zobrazení objektů v grafu (Anděl 2003; Smith 2002).



Obr. 7: Grafické zobrazení disperze pozorování do rozptylového grafu, optimalizované rotací vytvořených hlavních komponent PC1 a PC2 (Hair 1998)

Pomocí nového souřadnicového systému se objekty (vína) vynesou do faktorové roviny použitím prvních dvou hlavních komponent a z grafického hlediska vytvoří nové osy systému, které mají takovou orientaci, aby bylo možné jednotlivé skupiny objektů rozlišit (Anděl 2003; Smith 2002].

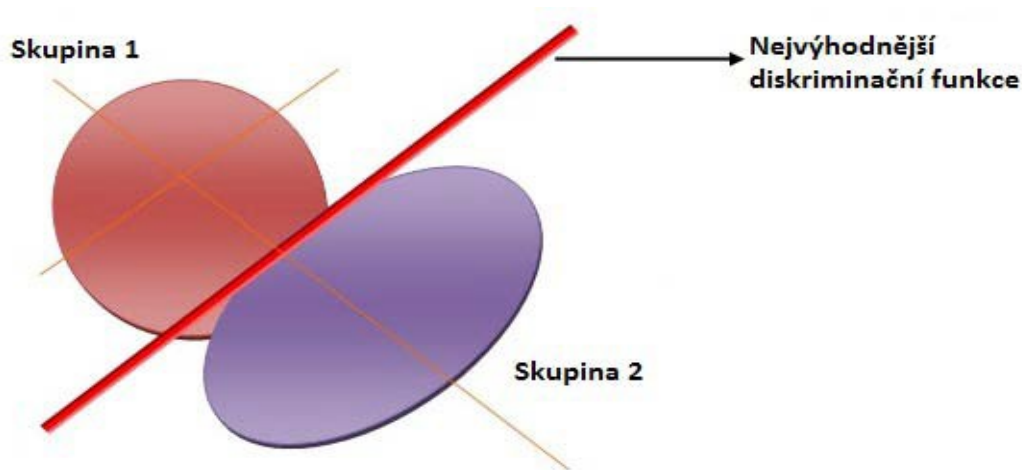
2.5.3. Diskriminační analýza (DA)

Diskriminační analýza a její techniky studují rozdíly mezi skupinami objektů (vín) popsanými větším množstvím znaků (chemické složení vína). Těmto znakům se říká diskriminátory. Znaky každého z objektů jsou porovnávány s diskriminátory objektů ostatních. Cílem je (Izenman 2008):

- **Rozlišení (diskriminace)** – Využívá informací k rozlišení známých objektů (vín) do skupin (odrůdy, podoblasti) k vytvoření klasifikačního modelu – tj. odvození rovnice nebo soustavy rovnic za účelem klasifikace objektů (tyto rovnice se nazývají klasifikační funkce)
- **Klasifikace** – Využívá klasifikačního modelu k zařazení neznámých objektů (vín). Při klasifikačních technikách se zjišťuje pravděpodobnost, s jakou lze klasifikovaný objekt úspěšně zařadit do stanovené skupiny.

2.5.3.1. Kanonická diskriminační analýza

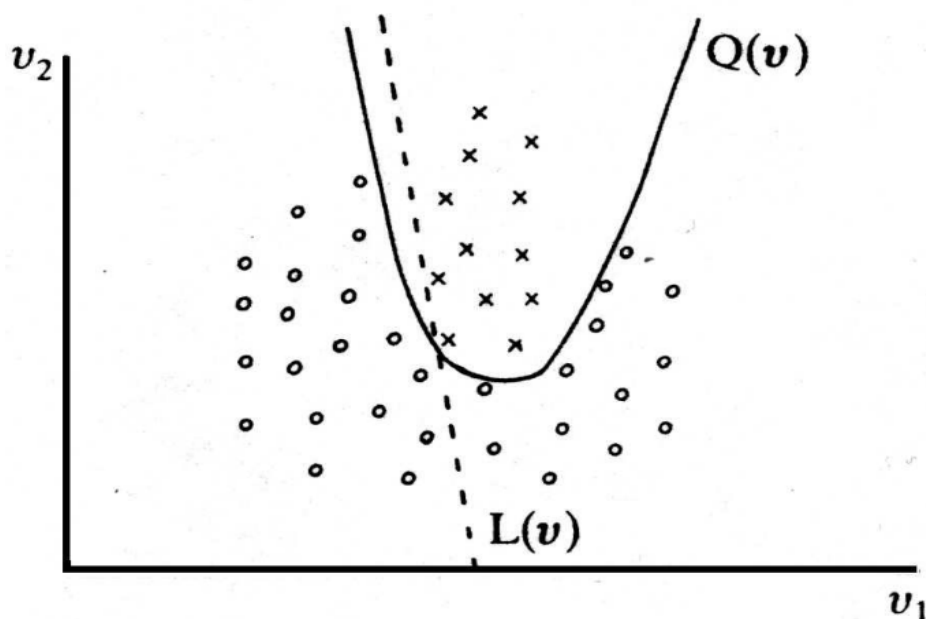
Technika zkoumající rozdíly mezi skupinou objektů ve vícerozměrném prostoru. S jednotlivými znaky charakterizující dané pozorování software pracuje tak, aby se jednotlivá pozorování co nejefektivněji rozlišily dle předem nastavených diskriminátorů (rozdělení dle skupin, kam vzorek patří). Větší váhu mají znaky, které jsou variabilní mezi skupinami, než znaky variabilní v rámci skupiny. Tyto znaky mají největší vliv na orientaci vytvořených ordinačních os. Osy jsou seřazeny dle klesajícího významu pro třídění do skupin. První osa je vedena ve směru největší variability mezi zkoumanými skupinami (Marhold 2001; [www odkaz 1](#)). Osy se vyhodnocují podle pozice objektů podél os a podle pozice průměrných hodnot (centroidů) na kanonické ose pro danou skupinu. Pro zobrazení překrývajících se skupin je vhodné skupiny oddělit kružnicemi, označující určité procento objektů (Marhold 2001).



Obr. 8: Zobrazení diskriminačních os ([www odkaz 2](#))

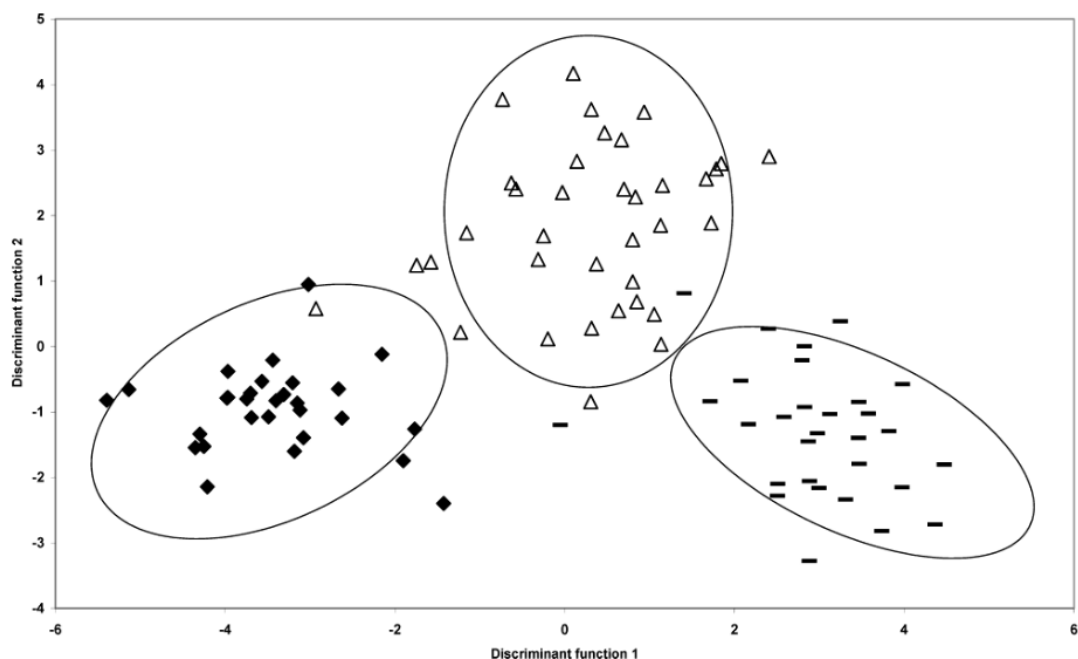
2.5.3.2. Klasifikační diskriminační analýza

Klasifikační diskriminační analýzy se používá k sestavení klasifikačního kritéria pro zařazení objektů do skupin, na základě znalostí o skupinách zjištěných v kanonické diskriminační analýze). Mezitím co kanonická diskriminační analýza maximalizuje míru separace mezi skupinami objektů má klasifikační funkce za cíl minimalizovat počet chybně zařazených objektů. K tomu se aplikuje pravděpodobnostní přístup s využitím lineární nebo kvadratické diskriminační funkce (Izenman 2008).



Obr. 9: Srovnání lineární (L) a kvadratické (Q) diskriminační funkce k rozdělení 2 skupin (Meloun a Militký 2004)

Výstupem jsou hodnoty pravděpodobnosti zařazení objektů do skupin a klasifikační tabulky se zařazením objektů do grup dle klasifikačního kritéria (Meloun a Militký 2004).



Obr. 10: Aplikace LDA na vzorky německých vín (objekty) z 3 různých regionů (skupiny ohraničené elipsami). Rozlišovacími znaky (diskriminanty) je prvkový profil (Castineira a kol. 2004)

2.5.4. Analýza rozptylu (ANOVA)

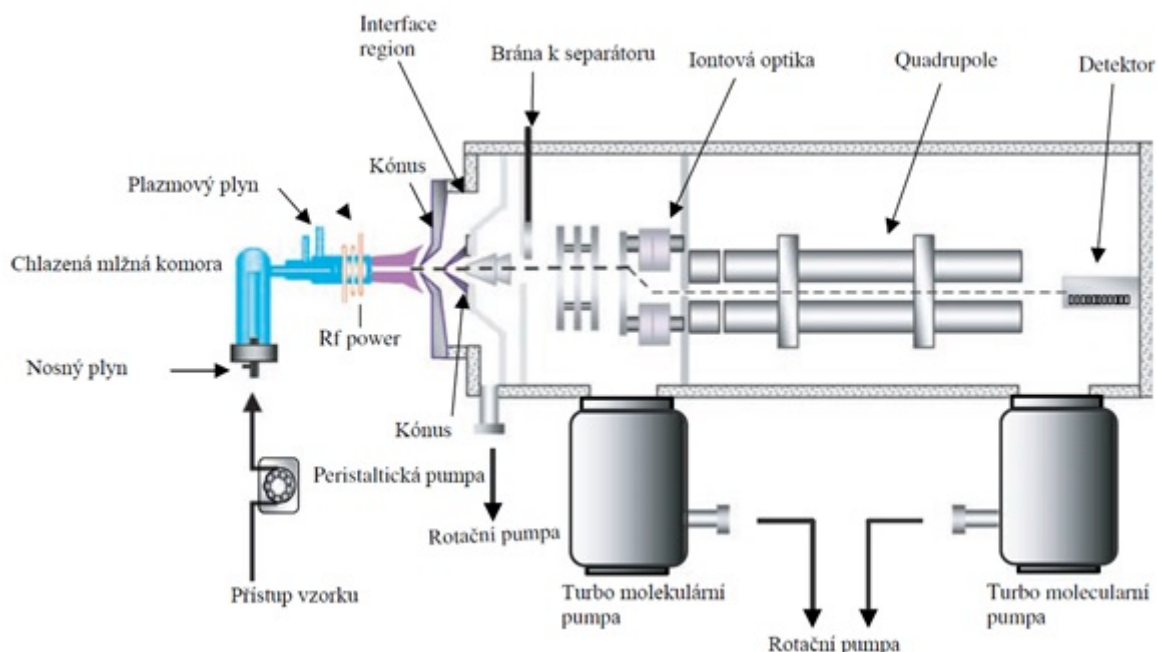
Analýza rozptylu je statistická metoda ověřující vlivy náhodných faktorů na rozptyl dat. Slouží k rozdělení celkové variability na složky a testuje se jejich významnost vůči variabilitě celkové. Cílem ANOVA při vytváření predikčního modelu k řazení vín je zjistit, zda naměřené koncentrace daných analytů vykazují statisticky významný rozdíl mezi skupinami (vinařské oblasti, odrůdy, agrotechniky). Pro tento účel stačí jednofaktorová analýza rozptylu. U každé skupiny se testuje vždy jeden parametr (koncentrace konkrétního analytu). Všechny naměřené koncentrace jednoho určitého analytu tvoří ze všech skupin (např. vinařských podoblasti) soubor, v němž je variabilita způsobena různými hodnotami faktorů a náhodnými chybami. Cílem je zjistit, zda jsou rozdíly mezi skupinami způsobeny právě koncentrací daného analytu nebo jen náhodnými chybami. Volí se nulová hypotéza, že mezi skupinami rozdíl neexistuje. Pokud je nulová hypotéza zamítnuta, znamená to, že daný parametr má vliv na rozdělení vzorků do skupin (Eckschlager 1991; Pytela 2003).

2.6. Použité analytické techniky

K realizaci jednotlivých analýz vín bylo využito několik instrumentálních analytických technik. Prvková analýza byla prováděna na hmotnostním a optickém emisním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Pro účely separace a detekce fenolických látek ve víně byla zvolena technika vysoce účinné kapalinové chromatografie s DAD detekcí. Kromě toho byla experimentálně stanovena celková antioxidační aktivita vín pomocí elektronové paramagnetické rezonance. Budou stručně popsány teoretické principy funkce výše zmíněných zařízení zaměřených na konfigurace reálně využívané k dosažení cílů disertační práce.

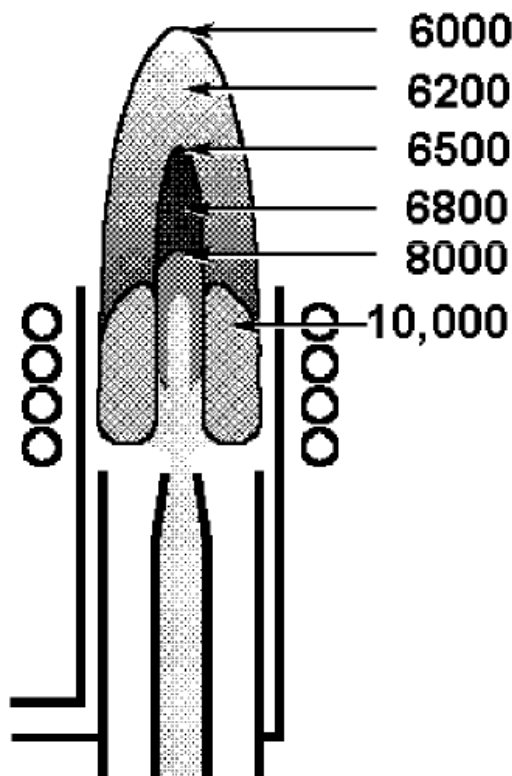
2.6.1. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

Anorganická hmotnostní spektrometrie je v současné době nejvýznamnější analytickou technikou využívanou ke stanovení prvkového složení látek na stopové a ultra stopové úrovni (ppt) a to díky velice nízkým detekčním limitům selektivitě a nízké spotřebě vzorku. Koncentrační rozsah je v případě ICP-MS v rozptylu od ppt po ppm úroveň. Existuje celá řada rozdílných konfigurací ICP-MS sdílející stejné komponenty jako je zmlžovač, mlžná komora, plazmový hořák, detektor, ale lišící se v designu přechodové oblasti, iontové optiky, vakuového systému a iontového separátoru. Základní sestava ICP-MS s kvadrupólem je prezentována na obrázku 11 (Becker 2007)



Obr. 11: Schéma ICP-MS (kvadrupól) (Becker 2007)

Vzorek v kapalné formě je konvertován proudem argonu (1 l/min) do stavu jemného aerosolu pomocí zmlžovače. Jemné kapénky vzorku (cca 1-2% původního objemu) jsou separovány od větších kapiček na základě rozdílné hmotnosti v mlžné komoře. Odseparovaný jemný aerosol je poté unášen z mlžné komory do plazmového hořáku skrze injektor. Zde dochází při teplotách 6000 – 10000K k odpaření rozpouštědla, atomizaci a ionizaci jednotlivých prvků ve vzorku. Je podstatné rozlišovat roli plazmového hořáku u ICP-MS a ICP-OES. Plazma je formována stejným způsobem u obou technik – interakcí magnetického pole (indukovaného radiofrekvenčním generátorem a cívkou) s protékajícím plazmovým plynem (nejčastěji Ar). Iniciale tvorby plazmatu je zahájena vložením vysokonapětového výboje do plazmového hořáku. Dochází k ionizaci určité populace atomů protékajícího plynu, které v silném magnetickém poli začnou migrovat a srážet se s okolními atomy. Tím dochází k ionizaci dalších částic, dokud se nezformuje stabilní indukčně vázaná plazma. V případě ICP-MS je nejčastěji plazmový hořák uložený axiálně a jeho primární účel je formace iontů. Design hořáku, respektive celého iontového zdroje je nastaven tak, aby byla minimalizována emise fotonů, které by mohly zvyšovat pozadí měření.



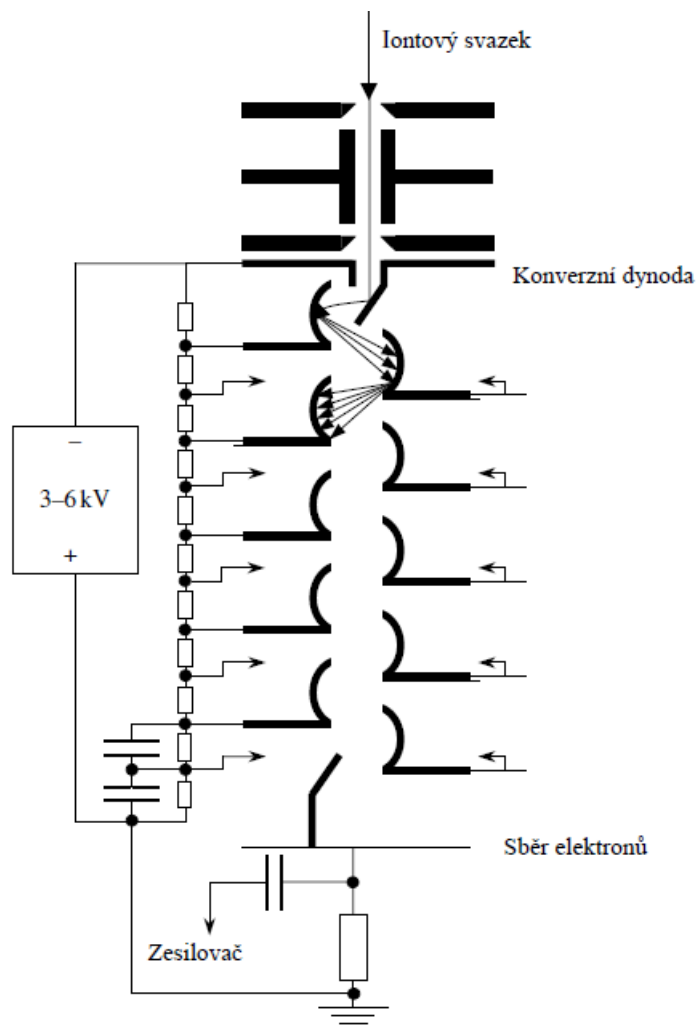
Obr. 12: Teplota plazmatu v K (Boss a Freedon 1997)

Ionizované prvky dále přecházejí do oblasti hmotnostního spektrometru skrze přechodovou zónu, tzv. interface. Jedná se o oblast se sníženým tlakem (1-2 torr) oddělenou od vakuovaného spektrometru (10^{-6} torr) kovovými kónusy s otvory s průměrem 0,6-1,2 mm, kterými ionty procházejí. Po průchodu interface jsou nabitě částice extrahovány do oblasti hmotnostního spektrometru skrze sérii iontových čoček. Vakuum v této zóně je v řádu 10^{-3} torr dosahované pomocí turbo molekulární pumpy. Tyto čočky slouží k zaostření a usměrnění proudu iontů do hmotnostního separátoru. Dále iontová optika brání vstupu fotonů, pevných a neutrálních částic do oblasti MS, respektive do detektoru, čímž minimalizuje nárůst šumu (Becker 2007).

Zaostřený iontový svazek obsahující ionty analytu a matrice je přiváděn z iontové optiky do části hmotnostního separátoru, kde je pomocí další turbo molekulární pumpy vytvářeno vakuum na úrovni 10^{-6} torr. Existuje několik typů hmotnostních separátorů. Nejčastěji využívanými jsou kvadrupól, magnetický sektor a analyzátor doby letu (TOF). Tyto separátory slouží k rozdělení vstupujících iontů na základě poměru hmotnosti a náboje a k filtraci interferujících a matričních iontů. K analýze vzorků z této dizertační práce byl využíván kvadrupólový analyzátor. Jedná se o nejčastěji využívanou a nejméně nákladnou variantu iontového separátoru. Rozlišení jednotlivých hmot je na úrovni 0,6-0,8 m/z. Z toho vyplývá zásadní nevýhoda kvadrupólu a to je vyšší náchylnost na výskyt spektrálních interferencí. Tyto interference jsou nejčastěji způsobeny izotopy jiných prvků s blízkou m/z nebo polyatomickými ionty tvořenými prvky z matrice, plazmového plynu, vody a různých atmosférických plynů. Izotopické překryvy jdou snadno řešit výběrem jiného izotopu za cenu snížené citlivosti z důvodu měření na nemajoritní hmotě. Polyatomické interference se na moderních zařízeních odstraňují pomocí kolizně reakční cely, která využívá mechanismu kolizí a reakcí polyatomických iontů s vhodně vybraným kolizně-reakčním plynem (nejčastěji směs H a He). Polyatomické ionty oproti jednotlivým iontům v prostředí kolizního plynu častěji narážejí do částic inertního plynu a tím ztrácí svou kinetickou energii, která je potřebná na postup do hmotnostního separátoru. Například $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ iont (průměr iontu 230 pm) se hmotnostně překrývá s $^{51}\text{V}^+$ (průměr iontu 135 pm). Díky většímu průměru polyatomických iontů lze tento vzorový interferent pomocí kolizí odfiltrovat (Becker 2007).

Jakmile separované ionty opustí hmotnostní analyzátor, dochází k jejich sběru a detekci pomocí iontového detektoru, který je lokalizován na konci hmotnostního spektrometru v oblasti stejného tlaku, jako je hmotnostní separátor. Od iontového detektoru v hmotnostních spektrometrech je vyžadována vysoká rychlost pro měření jak malých, tak velkých svazků iontů. Nejčastěji využívaným typem detektoru pro ICP-MS je elektronový násobič. Mechanismus detekce funguje na principu konverze kladně nabitých iontů na elektrony pomocí konverzní dynody. Tyto sekundární elektrony jsou urychlovány, zaostřovány a dále se sráží s povrchem sekundární dynody, kdy dochází k násobení sekundárních elektronů. Opakováním tohoto procesu přes 10-14 dynod vede k výraznému zvýšení signálu. K zvýšení účinnosti jsou ještě dynody připojeny ke zdroji vyššího pozitivního potenciálu. Nejčastější materiály dynod jsou slitiny - měď – berylium a stříbro – hořčík. Napětím vloženým na elektrody se dá regulovat citlivost detektoru, respektive ovlivňovat multiplikační účinnost. Podle velikosti vstupního svazku kationtů detektor měří ve dvou módech – analogovém a pulsním. Pulsní režim zachycuje signál ve formě jednotlivých elektronových pulsů a uplatňuje se u měření na nízkých

koncentracích. Detektor přechází do analogového módu v případě překročení hraničního počtu vstupujících iontů do detektoru – dochází ke snížení vloženého napětí na detektor, snižuje se účinnost multiplikace elektronů a tím se zvyšuje životnost elektronového násobiče (Becker 2007).



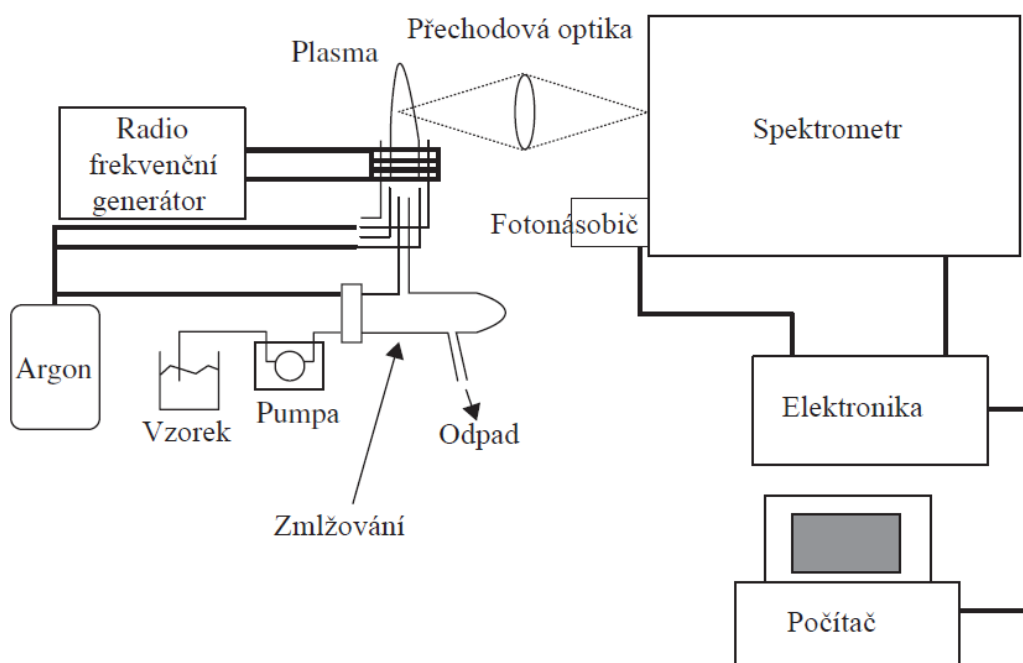
Obr. 13: Schéma elektronového násobiče (Becker 2007)

V kapitole zabývající se využitím prvkové analýzy pro účely fingerprintingu vín je uvedena celá řada konkrétních aplikací této techniky. Hlavní výhody této techniky při analýze vín spočívají v možnosti multielementární analýzy, vysoké citlivosti zařízení a s tím spojenými možnostmi analýzy prvků vzácných zemin, které jsou obsaženy ve víně v koncentracích ng/l. Při vhodné úpravě vzorků je na druhou stranu možné analyzovat i makroprvky v koncentracích desítek, v extrémních případech i stovek mg/l. Vhodnou úpravou je méně ředění samotného vzorku, nebo online ředění aerosolu vzorku proudem argonu. Měřením prvků ve vysokých koncentracích však výrazně snižuje životnost detektoru a je tak vhodné pro tyto účely volit

alternativní analytické techniky, jako je atomová absorpční spektrometrie, nebo optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Becker 2007)

2.6.2. Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je technikou prvkové analýzy sdílející některé podstatné součásti s technikou ICP-MS. Analyty ve vzorku procházejí stejným procesem založeným na dekompozici matrice a ionizaci prvků v plazmatu (nejčastěji argonové plazma). Mechanismus transportu a zmlžování vzorku a formace plazmatu je shodný s technikou ICP-MS. Na rozdíl od hmotnostní spektrometrie, která pro identifikaci a kvantifikaci prvků využívá přímo svazku vygenerovaných iontů, optická emisní spektrometrie měří svazek vygenerovaných fotonů. Excitované elektrony v atomech prvků se při transferu do prostředí s nižší teplotou rychle vracejí do původních energetických stavů a přebytečnou tepelnou energii vyzařují ve formě elektromagnetického záření o vlnové délce odpovídající konkrétním kvantům energie specifické pro jednotlivé prvky (Becker 2007)

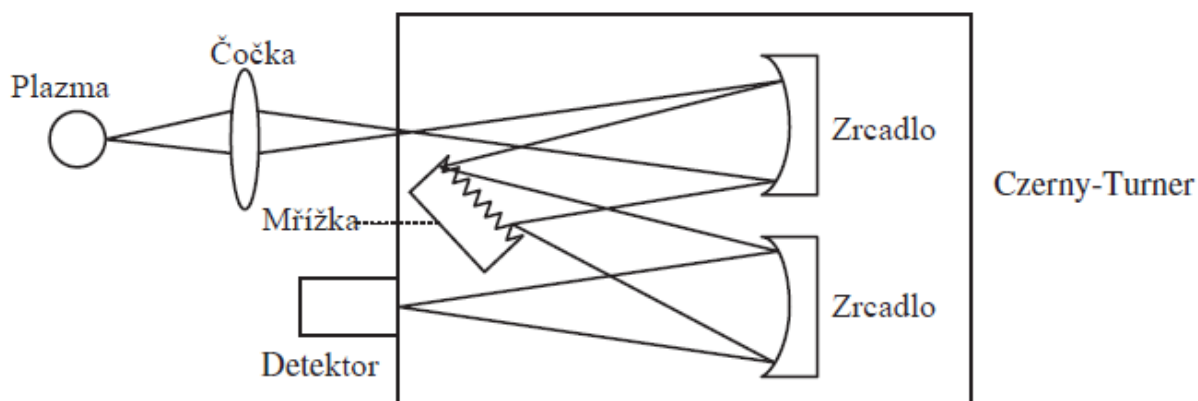


Obr. 14: Obecné schéma optického emisního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (Becker 2007)

Jak bylo zmíněno v kapitole popisující techniku ICP-MS, nejčastější způsob orientace plazmového hořáku v případě ICP-OES je orientace radiální. Tato orientace nabízí možnost

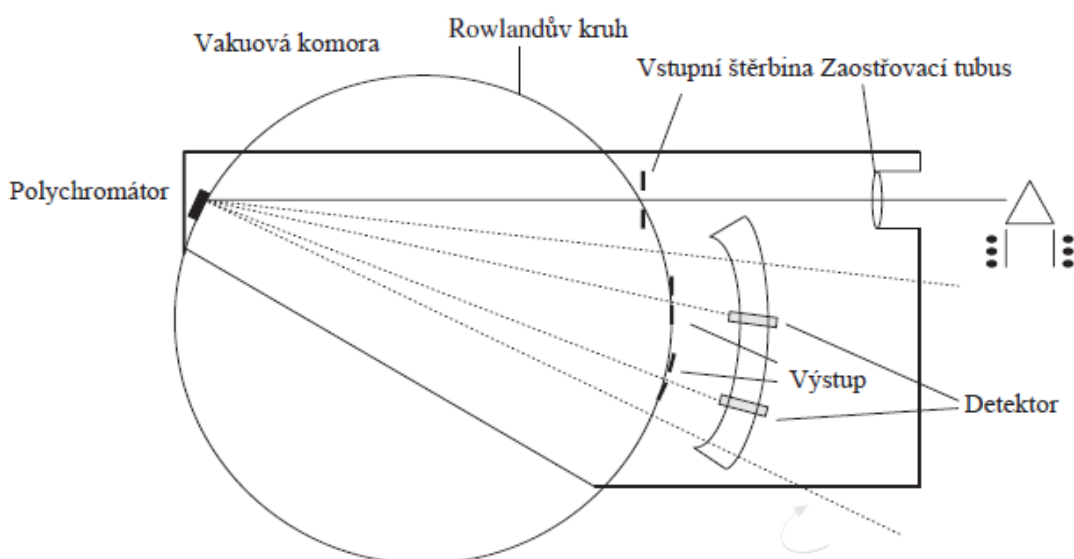
regulace výšky pozorování analytického kanálu v plazmatu. To otevírá široké pole optimalizace metod pro stanovování prvků s různým ionizačním potenciálem. Existují i optické emisní spektrometry s axiálním uspořádáním ICP. Horizontální pozorování plazmatu přináší nižší detekční limity, avšak za cenu složitější instrumentace a problémů s interferencemi. Pro axiální pozorování je třeba „odstříhnout“ špičku plazmového kužele. K tomu se používá přítoku tzv. stříhového plynu. Axiálním pozorováním také odpadá možnost volného nastavení pozorovací výšky a s tím je spojeno výraznější zatížení interferencemi. Optimalizovaná metoda s horizontálním pozorováním však může poskytovat 5-10x nižší detekční limity ve srovnání s konfigurací radiální. Dynamický rozsah ICP-OES je podobně jako u ICP-OES poměrně široký. Reálně se jedná o rozsah přes cca 5 řádů (od setin ppb do desítek ppm). Tento rozsah je samozřejmě silně závislý na typu analytu, matici, vybrané emisní čáře a dalších faktorech (Becker 2007)

Jakmile se světlo emitované plazmovým zdrojem dostane do prostoru optického spektrometru, je třeba izolovat vlnové délky odpovídající měřeným prvkům. Většina těchto vlnových délek je v rozsahu 160-860 nm. Pro selekci fotonů v UV oblasti je třeba proplachovat spektrometr argonem nebo ho evakuovat pumpou pro eliminaci výskytu kyslíku a dalších komponent ve vzduchu, které by mohly způsobovat absorpci záření. V současné době se pro izolaci analytických čar využívá monochromátorů a polychromátorů. Monochromátory umožňují vždy pouze selekci jedné vlnové délky v jeden čas. Sekvenční snímání monochromátory je možné s využitím echelleho mřížky nebo hranolu natáčené servomotorem. U moderních spektrometrů jsou preferovány echelleho holografické mřížky. Tento typ vykazuje nejnižší výskyt tzv. falešných čar (Becker 2007)



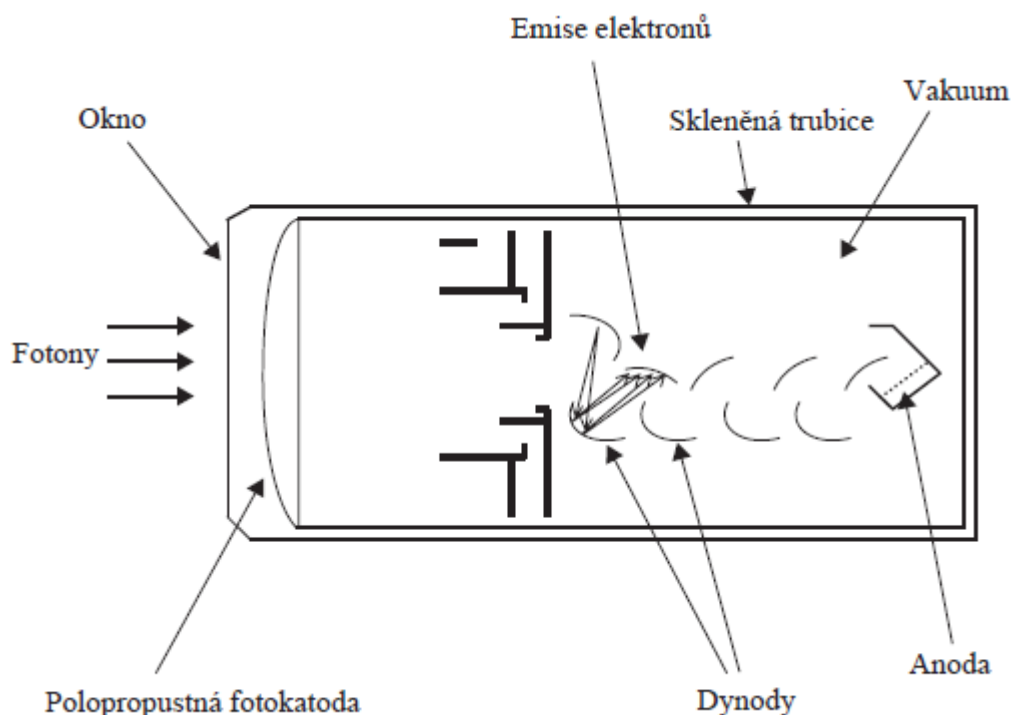
Obr. 15: Schéma spektrometru využívajícího monochromátor typu Czerny-Turner (Becker 2007)

Polychromátory na druhou stranu umožňují stanovení více analytů záraz v jednom čase. To výrazně snižuje čas analýzy. Nejčastěji se využívá Paschen-Ruggeův design polychromátorů. Rozptylová mřížka takového polychromátorů nemá pouze jednu výstupní štěrbinu jako monochromátor, ale má jich několik namířených do několika detektorů. Tyto výstupní štěrbinu jsou fixně nastaveny tak, aby propouštěly vždy pouze fotony jedné vlnové délky. Na polychromatické desce tak může být pouze omezený počet výstupních štěrbin (většinou maximálně 60, standardně 30) lokalizovaných na okraji Rowlandova kruhu. Fixní množství výstupních štěrbin tak omezuje možnosti selekce alternativních emisních čar a hodí se spíše pro rychlé, rutinní typy analýz, při kterých se stanovují stále stejné analyty (Becker 2007)



Obr. 16: Schéma spektrometru s polychromátorem typu Paschen-Runge (Becker 2007)

Izolované fotony reprezentující konkrétní prvek jsou detekovány ve většině spektrometrů pomocí fotonásobičů. Tyto trubice se sestávají z fotosenzitivní katody a skupiny dynod poskládané s postupně rostoucím pozitivním potenciálem až k finální anodě. Fotony, které se dostanou do kontaktu s katodu, iniciují emisi elektronů, které jsou urychleny a násobeny na dynodách. Dochází k lavinovému efektu a k znásobení signálu na úrovni faktoru 10^8 (Becker 2007).



Obr. 17: Schéma fotonásobiče (Becker 2007)

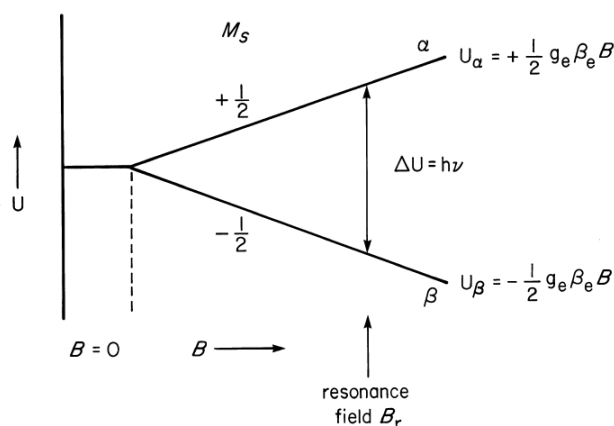
V kapitole této práce zabývající se využitím prvkové analýzy k určení autenticity vín je uvedeno několik konkrétních aplikací ICP-OES. Tato technika je zejména vhodná k analýze prvků, které lze obtížně stanovit pomocí ICP-MS. Jedná se převážně o prvky, které jsou zatíženy spektrálními interferencemi nebo jsou ve víně přítomny ve vysokých koncentracích (makroprvky). Příprava vzorků vín k analýze je díky téměř totožnému designu plazmového iontového zdroje shodná s postupem pro analýzy na ICP-MS. Lze tak snadno techniky kombinovat pro dosažení co nejvyšší přesnosti a správnosti výsledků (Becker 2007).

2.6.3. Spektroskopie elektronové paramagnetické rezonance

Elektronová paramagnetická rezonance slouží ke studiu interakce mezi elektromagnetickým zářením a magnetickými momenty. V případě EPR se jedná o magnetické momenty pocházející z elektronů. Pozorováním těchto jevů lze analyzovat strukturu a vlastnosti látek s paramagnetickou povahou. Toto omezení vychází z fyzikálních vlastností paramagnetických látek. Každý elektron má vnitřní magnetický dipólový moment, který vychází z jeho spinu. V neparamagnetických látkách se elektrony vyskytují v párech a tak je čistý dipólový moment roven 0. Pouze molekuly obsahující jeden nebo více nepárových elektronů zaujímají nenulový

spinový moment potřebný k interakci s elektromagnetickým polem [EPR kniha, a 1 v této knize].

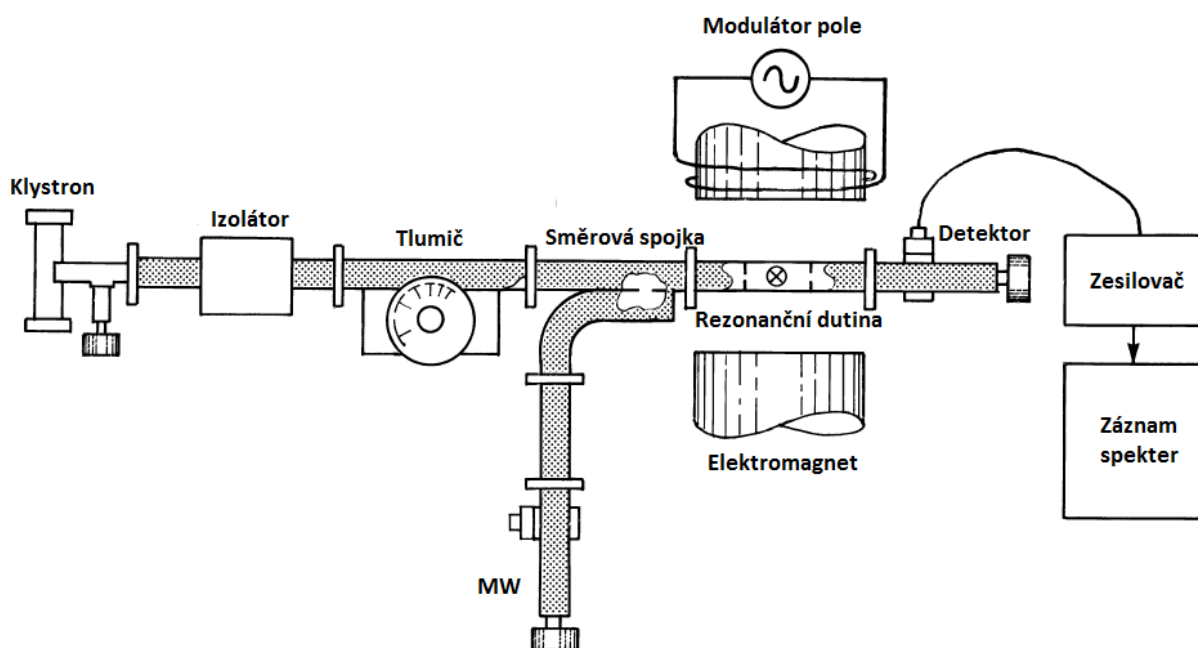
Elektronové paramagnetické rezonance se dá využít při studiu antioxidačních vlastností látek, respektive vlastností radikál-zhášejících. Radikály jsou látky s nepárovým elektronem, čímž splňují předpoklad interakce s elektromagnetickým polem. Existuje celá řada studií využívající tento typ spektroskopie v rámci monitoringu antioxidačních vlastností potravin (Brezová a kol. 2002; Polovka a kol. 2003 a 2006; Staško a kol. 2002 a 2006; Suhaj a kol. 2006). Experimentální postup je založen na eliminaci stabilních volných radikálů při interakci s látkami s antioxidačními vlastnostmi ve vzorku. Nejčastěji jsou experimentální systémy založeny na stabilních radikálech 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazylu (DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny (ABTS) a 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxidu (TEMPO). Nejjednodušší diagram energetických úrovní pro částice se spinem $\frac{1}{2}$ v magnetickém poli je zobrazen na obrázku 18.



Obr. 18: Schéma energetických úrovní pro volný elektron při aplikaci magnetického pole B . U_α a U_β reprezentují energie spinových stavů, g je faktor volného elektronu (2,002319304386), β je Bohrov magneton (Weil a Bolton 2007)

Energetické hladiny jsou označeny α a β . Změnou statického pole B dochází k separaci energetických hladin. Rezonanční absorpce nastává s narůstající frekvencí odpovídající $\Delta U = h\nu$. Symbol ν reprezentuje frekvenci zdroje záření. Přečtová intenzita představuje energii, která musí být absorbována z oscilujícího magnetického pole B_r , pro přechod z nižšího do vyššího energetického stavu. U většina jednoduchých systémů s nepárovým elektronem dochází k rezonanci v magnetickém poli 0,3 T a frekvenci zdroje 9 GHz, tedy v mikrovlnné oblasti - pro tento typ stanovení magneticko-dipólových přechodů se používá mikrovlnný EPR

spektrometr (obrázek 19). Měření se realizuje při konstantní frekvenci zdroje záření, při které se reguluje indukce magnetického pole tak, až dojde k rezonanci (Weil a Bolton 2007).



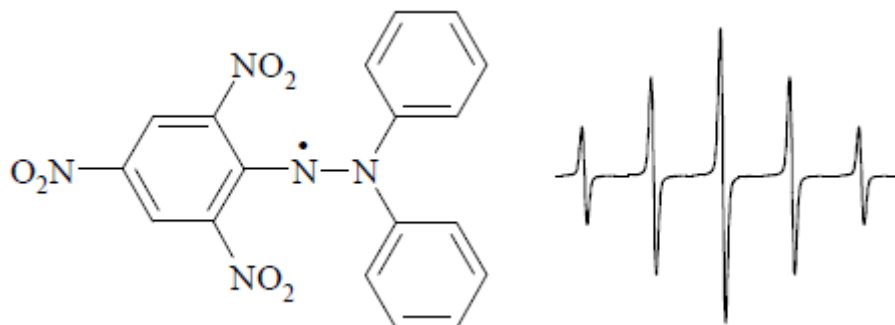
Obr. 19: Mikrovlnný EPR spektrometr (Weil a Bolton 2007)

Zdrojem MW záření je ve většině případů klystron, který pracuje na frekvenci cca 9,5 GHz. Oscilační pole je generováno ve vlastní nastavitelné dutině pomocí koaxiálních kabelů nebo vlnovodů a to v rozsahu cca 1-100 GHz. Jako rezonátor se u většiny EPR spektrometrů využívá rezonanční dutiny, která umožňuje průchod MW záření. Frekvence zdroje je laděna tak, aby odpovídala rozměrům dutiny. Při rezonanci je energetická hustota v dutině výrazně vyšší než ve vlnovodu, což maximalizuje pravděpodobnost zachycení rezonanční absorpce vzorkem (Weil a Bolton 2007)

Záznam absorpce mikrovlnného záření v dutině je realizován pomocí polovodičových diod citlivých na mikrovlnnou energii. Absorpční čáry EPR spektra lze pozorovat, pokud je separační energie dvou energetických sfér rovna, nebo je velmi blízká kvantové energii daného mikrovlnného fotonu. Absorpce tohoto fotonu je zaznamenána jako změna signálu amplifikovaného zesilovačem (Weil a Bolton).

Výstupem analýz vzorků EPR spektrometrií jsou EPR spektra. Rezonanční čáry a poloha spektra jsou hlavním kvalitativním ukazatelem struktury radikálu v systému. Kvantifikace konkrétní látky pak vychází z hodnoty plochy EPR spektra, v případě fixní šířky

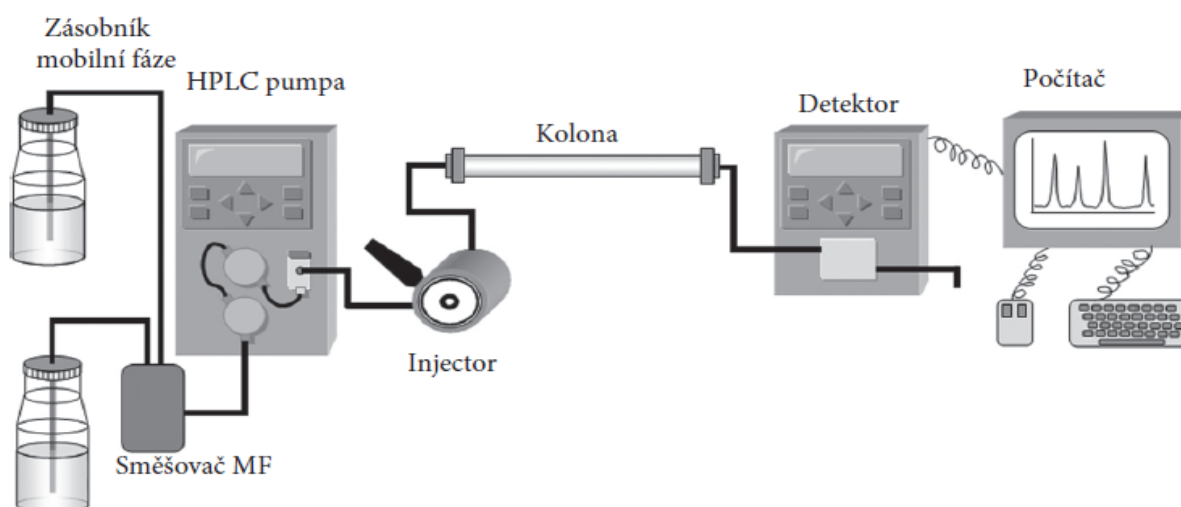
spektrální šířky poté výška (intenzita) EPR signálu. Na obrázku XXX je uveden příklad charakteristického EPR spektra DPPH radikálu (Weil a Bolton)



Obr. 20: Spektrum a struktura volného radikálu DPPH (šířka magnetického pole 6 mT) (Šťavíková 2010)

2.6.4. Vysoce účinná kapalinová chromatografie

V rámci této disertační práce bylo pro účely separace a identifikace látek fenolického charakteru ve víně využito techniky vysoce účinné kapalinové chromatografie. Kapalinová chromatografie se využívá k separaci určité směsi na základě distribuce látek mezi dvěma fázemi – stacionární a mobilní. Stacionární fáze je uzavřena v kolonách rozdílné délky a průměru. Mobilní fáze je přiváděna pumpou do kolony vhodným průtokem odpovídající rozměrům kolony a typu stacionární fáze. Průtoky se mohou pohybovat od hodnot nl po ml/min.



Obr. 21: Zjednodušené schéma kapalinového chromatografu (Nollet a Toldrá 2013)

Vzorek (směs analytů) je přiváděn do kolony jako úzká zóna pomocí injektoru. Tato zóna je transportována skrze kolonu pohybující se mobilní fází. Jednotlivé látky ze směsi jsou v určité rovnováze mezi mobilní a stacionární fází. Na základě rozdílné afinity k těmto dvěma fázím dochází k separaci. Po opuštění kolony jsou separované látky detekovány a zaznamenávány do chromatogramu závislosti odezvy detektoru na čase (Nollet a Toldrá 2013).

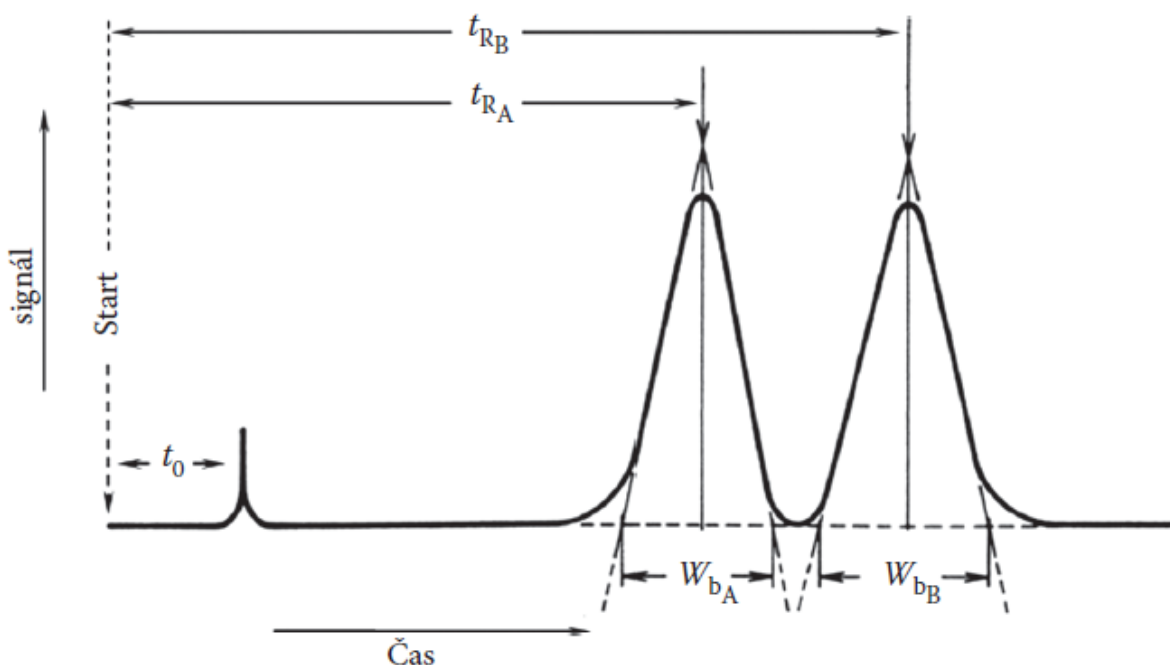
Základním předpokladem separace je, že analyt vykazuje takovou afinitu ke stacionární fázi, že jeho rychlost pohybu k detektoru je nižší než rychlost látky nezadržované, respektive retenční čas analytu t_r je vyšší než retenční čas nezadržované látky t_0 . Z těchto dvou parametrů se počítá *retenční faktor* k , který popisuje poměr času při kterém je analyt v kontaktu se stacionární fází, k času v kontaktu s fází mobilní:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

První stanovovaný analyt by tak měl mít $k > 1$, což znamená, že pík je dostatečně izolovaný od píku nezadržovaných látek. Čím vyšší hodnota retenčního faktoru, tím delší je doba analýzy.

Dalším podstatným parametrem popisující účinnosti separace dvou píků, je rozlišení R_s . Tato proměnná je definovaná jako poměr rozdílů retenčních časů (t) a průměru šířky píku na základní linii (w). Pro efektivní identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek ze směsi je podstatné jednotlivé látky rozdělit tak, aby se jednotlivé píky v chromatogramu nepřekrývaly. Při vyhodnocování je podstatné vyhodnotit symetrii píku. Při ideálním gaussovském tvaru píku je dostatečné rozlišení $R_s > 1,7$. Nesymetrické píky představují problém, pokud vytváří tzv. chvost. Navazující pík na pík předchozí by měl mít svůj počátek vždy na základní linii (Nollet a Toldrá 2013).

$$R_s = 2 \frac{\Delta t}{w_A + w_B}$$



Obr. 22: Grafická definice chromatografického parametru – rozlišení (Nollet a Toldrá 2013)

K dosažení dostatečné účinnosti separace, rozlišení a selektivity je zásadní výběr stacionární fáze. Vychází se z chemické a fyzikální podstaty stanovovaných analytů, jako je polarita či ionizovatelnost. Nejčastější nosič stacionárních fází v kapalinové chromatografii jsou částice na bázi silikagelu, které jsou odolné tlaku a snadno se chemicky modifikují. Na druhou stranu, nevýhodou tohoto typu fází je adsorpce některých typů sloučenin na povrch částic a nestabilita stacionární fáze v oblasti nízkého a vysokého pH. Částice mohou mít rozdílné vlastnosti vycházející z rozdílných velikostí částic, povrchu a další (Arshady 1991). Částice jsou dále pro zvýšení účinnosti a selektivity modifikovány různými typy stacionárních fází, jejichž selekce závisí na typu separovaných analytů a charakteru matrice. Nejčastějšími typy stacionárních fází jsou C_8 - C_{18} řetězce, octacydyl silica, octyl-, phenyl-, diol-silika a další (Nollet a Toldrá 2013).

Pro účely separace organických látek ve víně a podobných maticích se nejčastěji využívá chromatografických metod založených na separaci látek dle rozdílné polarity. K tomu se váže základní rozdělení na techniky využívající reverzní fáze (RF) a normální fáze (NF). Chromatografie s normální fází aplikuje k separaci stacionární fázi s vyšší polaritou než fáze mobilní, mezitím co reverzní fáze naopak. Pokrok v syntéze fází vázaných na siliku způsobil velkou oblibu RF chromatografie. Retenční mechanismus tohoto typu je zejména vhodný pro separaci polárních a hydrofobních látek. Další výhodou je rychlá ekvilibrace systému a

s tím spojená možnost efektivního využití gradientové eluce. V RF chromatografii jsou kolony plněny většinou stacionárními fázemi ze siliky modifikované alifatickými řetězci C₈-C₁₈, které jsou méně polární než použitá mobilní fáze (většinou směs vody a polárních organických rozpouštědel). Analyty s menší polaritou vykazují vyšší retenci než analyty polárnější. Retenci je dále možné modifikovat změnou složení mobilní fáze, stacionární fáze, případně teploty kolony (Nollet a Toldrá 2013).

Posledním krokem chromatografických stanovení je detekce látek z rozseparované směsi. Existuje několik základních typů detektorů, kdy volba závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech měřených látek. Nejpoužívanější typy jsou detektory optické, hmotnostně spektrometrické, elektrochemické a luminiscenční. Zdaleka nejpoužívanějším typem z tohoto výčtu je optický UV-VIS detektor. Do této skupiny patří zařízení rozdělená dle schopnosti snímání vlnových délek. Nejjednodušším typem jsou detektory, které monitorují v čase pouze jednu vlnovou délku. Dále detektory s možností skenování více vlnových délek naráz a nakonec nejpokročilejší UV-VIS detektory s diodovým polem umožňující sběr dat skenováním širokého pásu vlnových délek v rozsahu stovek nm. Kvantifikace látek se realizuje na principu absorbance referenčního signálu, přepočtem dle Lambert-Beerova zákona. Předpokladem pro detekci analytu je absorpce záření ze spektra emitovaného lampou (Nollet a Toldrá 2013).

Konkrétní aplikace chromatografických metod v rámci autentifikace vín jsou vyčteny v teoretické části, v kapitole zabývající se analýzou organických konstituentů za účelem autentifikace vín.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo vytvořit robustní matematicko-statistický model, sloužící ke klasifikaci moravských vín, konkrétně k zařazení vín do skupin dle geografického původu pěstované odrůdy. Modelování bylo založeno na kombinaci parametrů získaných multielementární analýzou na ICP-MS a ICP-OES a analýzou vybraných organických konstituentů pomocí kapalinové chromatografie s detekcí na diodovém poli (HPLC-DAD). Dále byly vyhodnoceny možnosti využití prvkové analýzy révy a vína a analýzy antioxidační aktivity vín k diskriminaci vín dle produkčního systému. Antioxidační aktivita byla stanovována pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR). K vyhodnocení dat byly využity techniky vícerozměrné analýzy, jako je diskriminační analýza (DA), analýza hlavních komponent (PCA), kanonická diskriminační analýza (DA) a další.

Za účelem splnění cílů byly v rámci disertační práce řešeny tyto dílčí úlohy:

- Zpracování literární rešerše shrnující současný stav řešené problematiky
- Na základě rešerše byly vybrány analyty potenciálně vhodné pro klasifikaci vín dle geografického původu, odrůdy a typu agrotechniky
- Bylo zajištěno dostatečné množství vzorků s deklarovaným původem ze všech moravských vinařských podoblastí
- Byly vytvořeny a validovány metody ke stanovení vybraných sloučenin a prvků ve vzorcích vína
- Pomocí vícerozměrných statistických metod byly zpracovány naměřené data a byly vytvořeny jednotlivé autentifikační modely
 - Diskriminace a klasifikace vín dle geografického původu
 - Diskriminace a klasifikace vín dle odrůd
 - Vyhodnocení možností využití prvkové analýzy a analýzy antioxidační aktivity k určení produkčního systému hroznů
- Ověření správnosti modelu

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Laboratorní vybavení

Experimentální činnost byla prováděna v rámci laboratoří a vybavení ústavu Chemie potravin a biotechnologii a Centra materiálového výzkumu.

4.1.1. Pomůcky

Běžné laboratorní sklo Simax (Kavalier, ČR), polystyrenový transportní box, automatické pipety (Finnpipette, Finsko), plastové zkumavky, vialky, septa (Chromservis, ČR), plochá kyveta EPR (Magnettech, Německo), kolona Ascentis C18 15x4,6, 2,7 μ m (Sigma-Aldrich, Německo), filtry 0,45 μ m, třecí miska s tloučkem.

4.1.2. Chemikálie

Suchý led pro transport vzorků, tekutý dusík pro homogenizaci vzorků (Linde, ČR), kyselina dusičná 65 % v/v (Analytika Praha, ČR), peroxid vodíku 30 % v/v (Analytika Praha, ČR), prvkové standardy 1g/L (Analytika Praha, ČR), certifikovaný materiál jahodového listí (Analytika Praha, ČR), 2-2-diphenyl-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, Německo), methanol čistota HPLC (Sigma Aldrich, Německo), acetonitril (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina o-fosforečná (Sigma-Aldrich, Německo), standardy- kvercetin, myricetin, resveratrol, kyselina kávová, kyselina kumarová, (\pm) katechin, kyselina šikimová (Sigma-Aldrich, Německo), argon, Milli Q voda.

4.1.3. Seznam použitých přístrojů

Kapalinový chromatograf Agilent infinity 1260 (Agilent technologies, USA), hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Thermo X-Series (Thermo Fisher Scientific, USA), optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Horiba Ultima 2 (Horiba Scientific, Francie), EPR spektroskop Magnettech Miniscope MS300 (Magnettech, Německo), přípravná deionizované vody Elga Pure Lab (Elga, UK), třepačka, vortex, mrazicí box Snijders (Snijders scientific, Holandsko).

4.2. Vzorky

K dosažení cílů práce bylo třeba zajistit dostatečné množství vzorků vín a révy s ověřeným původem. K tomu přispěli vinaři z Jižní Moravy – Vinařství Holánek (Ivaň) a Réva Rakvice (Rakvice). Pro odběry vzorků révy vinné v terénu byl vytvořen vzorkovací plán. Následně byly vzorky vín a révy upraveny pro účely jednotlivých analýz.

4.2.1. Vzorky vín

Pro účely sestavení jednotlivých autentifikačních modelů bylo separátně pro modré a bílé odrůdy vyselektováno 53 vzorků bílých a 28 vzorků červených vín. Vzorky byly vybrány tak, aby rovnoměrně pokrývaly všechny moravské podoblasti. K orientačnímu porovnání také byly přiřazeny vzorky bílých vín z české vinařské oblasti. Pro stanovení odrůdové autenticity byly vybírány vzorky nejčastěji zastoupených odrůd v ČR. Pro zvýšení robustnosti modelu bylo třeba do modelu zařadit vína z různých ročníků pro minimalizaci vlivů stárnutí vína a rozdílných klimatických podmínek v jednotlivých obdobích. Nejvíce zastoupené ročníky v modelu byly 2011 a 2012, nejstarším vínem bylo Rulandské modré z Dolních Dunajovic z roku 2006, nejmladší vína byla z produkce 2013.

Pro experimenty týkající se autenticity produkčního systému byly získány vzorky vína odrůdy Sauvignon z bioprodukce a integrované produkce hroznů (ročník 2013), z vinařství Holánek. Vína byla stabilizována SO₂ a transportována do laboratoře ve skleněných lahvích s korkovým uzávěrem. Všechny vzorky byly před analýzou skladovány v chladicím boxu.

Tabulka 5: *Seznam vzorků bílých vín*

Vzorek	Podoblast	Odrůda	Obec	Trať	Ročník
1	Litoměřická	Rulandské šedé	Rudolice	X	13
2	Litoměřická	Chardonnay	Chrámcce	X	12
3	Litoměřická	Muller thurgau	Čepirohy	Barbora	12
4	Mikulovská	Muller thurgau	Perná	U spálené hospody	8
5	Mikulovská	Ryzlink rýnský	Nový Přerov	Na štěrkách	11
6	Mikulovská	Chardonnay	Vlasatice	Pohořelické vinohrady	11
7	Mikulovská	Ryzlink rýnský	Jevišovka	Stará hora	12
8	Mikulovská	Rulandské šedé	Nový Přerov	Na štěrkách	12
9	Mikulovská	Muller thurgau	Valtice	Jižní svahy	11
10	Mikulovská	Ryzlink vlašský	Valtice	Hinterály	11
11	Mikulovská	Sylvánské - Sauvignon	X	X	12

Pokračování Tabulka 5: Seznam vzorků bílých vín

Vzorek	Podoblast	Odrůda	Obec	Trať	Ročník
12	Mikulovská	Rulandské bílé	Sedlec	Zátiší - Hliník	12
13	Slovácká	Rulandské šedé	X	X	13
14	Slovácká	Ryzlink vlašský	Archlebov	Dubová	10
15	Slovácká	Veltlínské zelené	Terezín	Přídanky	11
16	Slovácká	Chardonnay	X	X	12
17	Slovácká	Sauvignon	Hostějov	Stará hora	12
18	Slovácká	Chardonnay	Hovorany	Díly za vinohrady	12
19	Slovácká	Ryzlink rýnský	X	X	12
20	Slovácká	Tramín červený	X	X	11
21	Slovácká	Muller thurgau	Lipov	Slavkovská	12
22	Slovácká	Rulandské bílé	X	X	11
23	Slovácká	Rulandské bílé	X	X	12
24	Slovácká	Ryzlink rýnský	Lužice	Na stráni	11
25	Slovácká	Rulandské šedé	Násedlovice	Nová hora	12
26	Slovácká	Ryzlink rýnský	Bzenec	Horní hory	12
27	Slovácká	Ryzlink rýnský	Bzenec	Zadní hora	11
28	Slovácká	Rulandské bílé	Skoronice	Slíny	12
29	Slovácká	Chardonnay	X	X	12
30	Slovácká	Rulandské šedé	X	X	12
31	Slovácká	Chardonnay	X	X	12
32	Slovácká	Rulandské šedé	X	X	12
33	Velkopavlovická	Muller thurgau	X	X	13
34	Velkopavlovická	Veltlínské zelené	Rakvice	Trkmansko	11
35	Velkopavlovická	Muller thurgau	Rakvice	Trkmansko	11
36	Velkopavlovická	Sauvignon	Velké Bílovice	Dlouhá hora	12
37	Velkopavlovická	Veltlínské zelené	Starovice	Středohoří	12
38	Velkopavlovická	Veltlínské zelené	Starovičky	Nové hory	11
39	Velkopavlovická	Veltlínské zelené	X	X	12
40	Velkopavlovická	Veltlínské zelené	Rakvice	Trkmansko	12
41	Znojemská	Veltlínské zelené	X	X	13
42	Znojemská	Muller thurgau	Oleksovice	Rajny	11
43	Znojemská	Ryzlink rýnský	Hostěradice	Volné pole	11
44	Znojemská	Tramín červený	Horní Dunajovice	Frédy	12
45	Znojemská	Veltlínské zelené	Olbramovice	Olbramovická hora	12
46	Znojemská	Sauvignon	Stošíkovice	u 3 dubů	11
47	Znojemská	Rulandské bílé	X	X	11
48	Znojemská	Sauvignon	Hnanice	Knížecí vrch	12
49	Znojemská	Muller thurgau	Havraníky	Staré vinice	12
50	Znojemská	Ryzlink vlašský	Vrbovec	Dolina	11
51	Znojemská	Muškat	Hnanice	U Chlupa	11
52	Znojemská	Rulandské šedé	X	X	12
53	Znojemská	Ryzlink rýnský	Hnanice	U kapličky	12

Tabulka 6: *Seznam vzorků červených vín*

Vzorek	Podoblast	Odrůda	Obec	Trať	Ročník
55	Mikulovská	Rulandské modré	Dolní Dunajovice	Dunajovský kopec	6
56	Mikulovská	Cabernet moravia	Perná	Purmice	11
57	Mikulovská	Svatovavřínecké	X	X	11
58	Mikulovská	Frankovka	Horní Věstonice	Pod Martinkou	11
59	Mikulovská	Rulandské modré	Mikulov	Valtická	11
60	Slovácká	André	Hovorany	X	8
61	Slovácká	André	Hovorany	Zadní díly	11
62	Slovácká	Svatovavřínecké	Skoronice	Slíny	12
63	Slovácká	Rulandské modré	X	X	12
			Blatnice pod svatým		
64	Slovácká	Modrý portugal	Antonínkem	X	12
65	Velkopavlovická	André	Velké Pavlovice	Nadzahrady	10
66	Velkopavlovická	Cabernet moravia	Velké Pavlovice	Nadzahrady	11
67	Velkopavlovická	Svatovavřínecké	Přítluky	Přítlucká hora	11
68	Velkopavlovická	Frankovka	Rakvice	Trkmansko	11
69	Velkopavlovická	Svatovavřínecké	Žabčice	Staré vinohrady	12
70	Velkopavlovická	Frankovka	Kobylí	X	12
71	Velkopavlovická	Svatovavřínecké	Němčičky	Dlouhé kněžské	12
72	Velkopavlovická	Cabernet Sauvignon	Velké Pavlovice	Nadzahrady	12
73	Znojemská	Zweigltrebe	Božice	Nová hora	8
74	Znojemská	Modrý portugal	Chvalovice	Dívčí hora	11
75	Znojemská	Zweigltrebe	Hostěradice	Volné pole	11
76	Znojemská	Frankovka	Hrabětice	X	11
77	Znojemská	Frankovka	X	X	11
78	Znojemská	Rulandské modré	Stošikovice	U 3 dubů	11
79	Znojemská	Rulandské modré	X	X	12
80	Znojemská	Rulandské modré	Šanov	U vinohradu	12
81	Znojemská	Svatovavřínecké	Strachotice	Dívčí vrch	12
82	Znojemská	Frankovka	Miroslav	Weinperky	13

4.2.1.1. Příprava vzorků vín pro prvkovou analýzu, organickou analýzu a pro stanovení antioxidační aktivity vín pomocí EPR

Vzorky vín pro elementární analýzu byly zředěny v poměru 1:1 deionizovanou vodou z důvodu snížení koncentrace ethanolu. Vyšší obsah ethanolu ve vzorcích může způsobit problémy s nestabilitou a ochlazováním plazmatu u ICP-MS a ICP-OES. Prosté ředění bylo zvoleno místo mineralizační metody z důvodu nižší pravděpodobnosti kontaminace vzorků (Coetzee a kol. 2005; Jakubowski a kol. 1999). Metoda ředění tak poskytuje lepší detekční limity bez rizika kontaminace, je rychlejší a snazší a zvláště vhodná pokud je možné využívat vysoké výkony

radiofrekvenčního generátoru pro buzení plazmatu. Před samotnou analýzou byly vzorky zfiltróvány přes kvantitativní filtry s velikostí pórů 0,45 μm .

V případě EPR experimentů bylo filtrované víno ředěno v poměru 1:5 deionizovanou vodou bezprostředně před smícháním s roztokem DPPH. Vhodné ředění bylo stanoveno experimentálně, aby byl zajištěn optimální průběh terminační reakce.

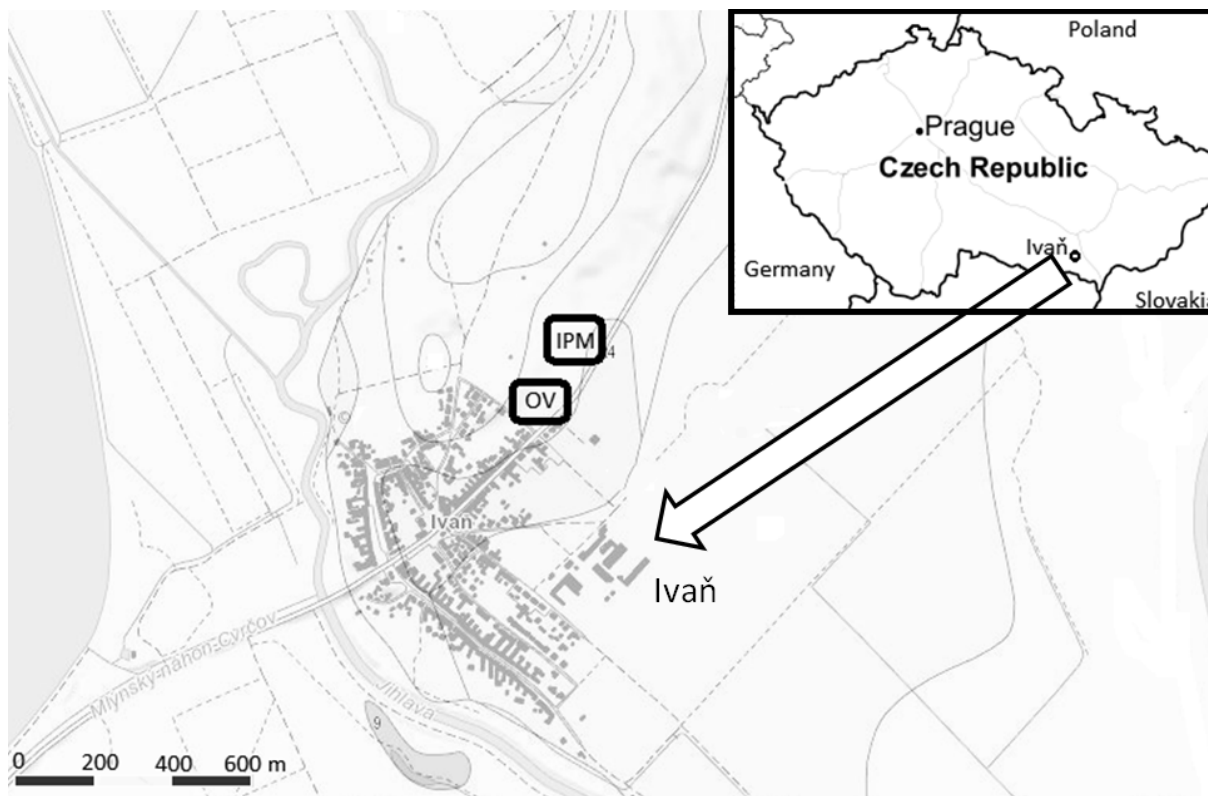
Stanovení vybraných organických konstituentů ve vzorcích vína pomocí HPLC bylo prováděno přímým nástřikem neředěných vzorků filtrovaných přes stříkačkové filtry s velikostí pórů 0,45 μm .

4.2.2. Vzorky hroznů a listů *Vitis Vinifera*

Kromě vzorků vín byly pro testy určení autenticity produkčního systému vzorkovány bobule a listy z odrůd Sauvignon a Rulandské modré. Vzorky byly odebírány z vinohradu v době plné zralosti. Bio vzorky dosáhly zralosti týden po vzorcích z integrované produkce. Společně se vzorky hroznů byly odebírány i listy, ze spodní, střední a svrchní části keře.

4.2.2.1. Charakteristika lokality pro odběr vzorků *Vitis Vinifera*

Vzorky bobulí a listu *Vitis Vinifera* sloužící k vyhodnocení vlivu agrotechniky na prvkové složení byly vzorkovány v lokalitě Ivaň na viniční trati Aebis, patřící do Mikulovské podoblasti. Vytyčené odběrové vinohrady patřily vinařství Holánek, které provozuje dva způsoby pěstování hroznů - Ekologickou a Integrovanou produkci hroznů. V roce 2006 byla většina vinohradu transformována z konvenčního způsobu pěstování na *integrovanou produkci* a přibližně 20 % na *bioprodukci*. Od roku 2009 je réva pěstovaná certifikovaným způsobem dle nařízení Ministerstva zemědělství České republiky a Asociace integrované a ekologické produkce hroznů a vína Ekovín (nařízení EC 834/2007 a 889/2008). Bio a integrované sekce vinohradů jsou separovány vzdáleností 180m. Mapa umístění odběrových míst je na obrázku 23.



Obr. 23: Mapa umístění odběrových míst pro studované agrotechniky (OV – bio agrotechnika, IPM – integrovaná produkce hroznů)

Hlavní podíl půdy tvoří černozem s vysokým obsahem humusu a železa. Podloží bylo formováno jílovitými sedimenty. Průměrná nadmořská výška viniční tratě Aebis je 177 m.n.m., dlouhodobý průměr srážek je 543 mm a průměrná roční teplota této lokality je 8,4°C.

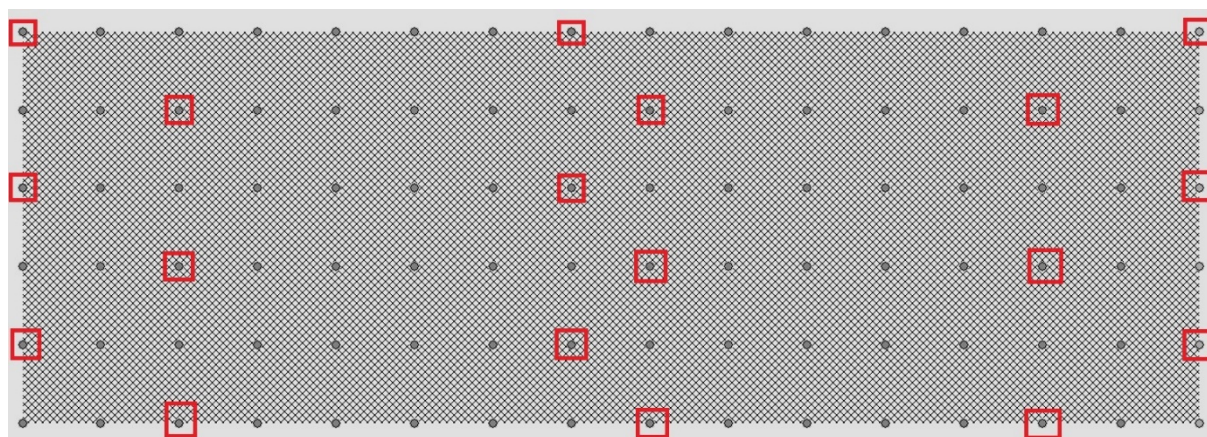
Vinohrady pod certifikací Ekologické produkce hroznů byly ošetřovány kombinací fungicidů na bázi mědi a síry. Jako doplněk ochrany proti parazitům byly používány feromony. Pro posílení rostliny v době největšího tlaku plísni bylo používáno vodní sklo. Přirozená imunita révy byla dále podpořena aplikací přípravků z mořských řas. Vinohrady spravované systémem Integrované produkce hroznů byly ošetřovány aplikací organických a anorganických fungicidů na bázi mědi a zinku. Vinohrady byly hnojeny v rámci obou produkčních systémů stejným způsobem a to použitím pouze přírodních hnojiv k udržení rovnováhy N, P, K. Kompletní seznam ochranných látek a jejich aplikačních dávek je shrnut v tabulce 7.

Tabulka 7: Seznam ochranných prostředků použitých na vzorkovaných vinohradech

Agro	Název produktu	Použití	Aplikace	Složení	Dávka
Bio	Isonet L Plus	Feromon	2	CAS No. 84364-62-4	-
Bio	Kocide 2000	Fungicid	8	Cu(OH) ₂	5,5 kg/ha Cu
Bio	Sulikol K	Fungicid	5	Sulfur	4 kg/ha S
Bio	Vitisan	Fungicid	4	KHCO ₃	3 kg/ha
Bio	Aqua Vitrin	Ochrana rostliny	2	Water glass	2,5 l/ha
Bio	Alginure	Fungicid	2	Algae extract	-
IP	Kocide 2000	Fungicid	6	Cu(OH) ₂	2 kg/ha of Cu
IP	Falcon 460 EC	Fungicid	2	CAS No. 288-88-0	0,3 l/ha
IP	Folpan 80 WDG	Fungicid	6	CAS No. 73771-08-1	1 kg/ha
IP	Discus	Fungicid	2	CAS No. 248582-68-5	0,2 kg/ha
IP	Ridomil MZ GOLD	Fungicid	2	CAS No. 8018-01-7	2,5 kg/ha

4.2.2.2. Odběr vzorků hroznů a listů

Pro vzorkování byla zvolena metoda systematického odběru *hroznů* z různých výšek keře. V porovnání s odběrem vzorků po jednotlivých *bobulích* nedochází k nevědomému výběru pouze výrazně vyzrálých bobulí. Směsný vzorek z hroznů vykazuje reprezentativnější výsledky (Ilanda et al. 2004; Kasimatis et al. 1985). Vzorkovací blok zahrnoval 96 hlav révy v šesti řadách. Vzorky byly odebírány rovnoměrně na začátku, středu a na konci řady. Celkem 54 hroznů bylo vzorkováno od každé agrotechniky a odrůdy. Jednoduché schéma vzorkování je na obrázku 24. Transport vzorků byl realizován v plastových pytlích zasypaných suchým ledem. Před úpravou byly vzorky dále uskladněny v mrazicím boxu při teplotě -75 °C.



Obr. 24: Vzorkovací schéma odběru hroznů a listů

4.2.2.3. Příprava vzorků listů a hroznů pro prvkovou analýzu

Neomyté bobule byly zbaveny třapin a pevných nečistot a dále byly vysušeny při teplotě 60°C. Po odstranění semen byly vysušené bobule rozemlety v třecí misce na prášek, pomocí tekutého dusíku. Každý vzorek reprezentoval směs bobulí z jednoho odběrového keře. Vzorky v práškové formě byly poté mineralizovány v mikrovlnném rozkladném systému Milestone 1200 (Milestone Inc., USA) v teflonových patronách dle mineralizačního programu shrnutého v tabulce 8. Množství 300 ± 5 mg vzorku bylo převedeno do patron se směsí 5 ml HNO₃ (65 %, v/v) a 2 ml H₂O₂ (30 %, v/v).

Tabulka 8: Program mineralizace vzorků bobulí v mikrovlnném rozkladném systému

Krok	Čas (min)	Výkon (W)
1	3	250
2	2	0
3	5	250
4	5	500
5	2	0
6	5	500

Mineralizát byl dále kvantitativně převeden do 25 ml odměrných baněk a doplněn deionizovanou vodou. Vzorky byly připravovány vždy ve dvou replikátech a celkem tak bylo připraveno celkem 36 vzorků od každé odrůdy a agrotechniky.

Vzorky listů byly před homogenizací vysušeny na vzduchu. Po rozemletí byly listy mineralizovány podle identického postupu jako vzorky bobulí, pouze s odlišným nastavením mikrovlnného rozkladného systému.

Tabulka 9: Program mineralizace vzorků listů v mikrovlnném rozkladném systému

Krok	Čas (min)	Výkon (W)
1	2	250
2	2	0
3	6	250
4	5	400
5	5	600

4.3. Instrumentální metody

Pro účel stanovení vybraných chemických parametrů vín a vzorků révy bylo využito celkem čtyř instrumentálních technik - optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, vysoce účinné kapalinové chromatografie s DAD detekcí a EPR spektrometrie. Byly vyvinuty a validovány postupy analýz. Pro stanovení prvkového profilu byly záměrně zvoleny dvě techniky elementární analýzy. Majoritní většina vybraných prvků byla stanovována pomocí ICP-MS. Prvky, které mají své majoritní izotopy při měření zatížené spektrálním překryvy způsobené polyatomickými a molekulárními interferencemi a elementy vyskytující se ve vzorcích ve vysokých koncentracích (Mg, Ca, K, Na), byly analyzovány pomocí ICP-OES (Thomas 2008)

4.3.1. Metodika prvkové analýzy vzorků vín a révy pomocí ICP-MS

V rámci experimentů na ICP-MS byly separátně vytvořeny dvě metody. Jedna pro stanovení vybraných prvků ve víně a druhá v rozložených vzorcích bobulí listů révy. Analýzy byly provedeny na přístroji Thermo X-series ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem. Jako plazmový plyn zařízení využívalo argon. Pro potlačování polyatomických interferencí byl přístroj vybaven hexapolovou kolizní celou (CCT), kdy jako kolizní plyn byla využívána směs He a H. Vzorkovací i sběrný kónus byl vyroben ze slitiny niklu. Zařízení bylo spojeno s autosamplerm, zapojeným přes peristaltickou pumpu ke koncentrickému zmlžovači Micromist (Glass Expansion, Austrálie) integrovaného do cyklonické mlžné komory. Řízení přístroje a zpracování dat byly realizovány pomocí softwaru Plasma lab (Thermo Fisher scientific, USA).



Obr. 25: *Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem*

Pomocí ICP-MS stanovení bylo ve **vínech** měřeno celkem 30 prvků. Pro každý prvek byl vždy měřen pouze jeden izotop, zvolený na základě co nejvyššího zastoupení a co nejnižší úrovně zatížení interferencemi.

Tabulka 10: *Vybrané izotopy stanovované ve vzorcích vín*

⁷Li, ⁹Be, ¹¹¹Cd, ¹¹⁸Sn, ¹²¹Sb, ¹³⁷Ba, ¹³⁹La, ¹⁴⁰Ce, ¹⁴¹Pr, ¹⁴⁶Nd, ¹⁴⁷Sm, ¹⁵³Eu, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵⁹Tb, ¹⁶³Dy, ¹⁶⁵Ho, ¹⁶⁶Er, ¹⁶⁹Tm, ¹⁷²Yb, ¹⁷⁵Lu, ²⁰⁸Pb, ²⁰⁹Bi – Měření bez kolizní cely
⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶⁵Cu, ⁷⁵As, ⁸⁹Y, ⁹⁵Mo – Měření s kolizní celou

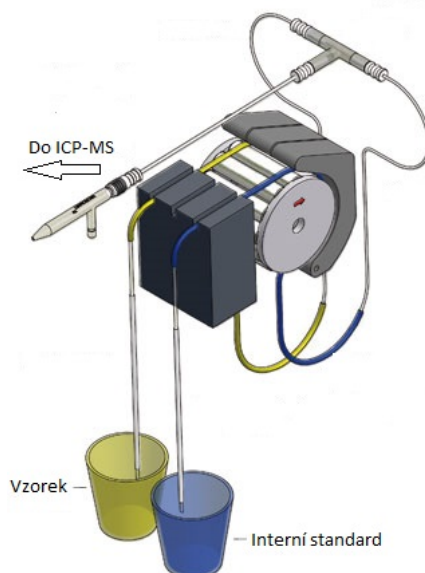
Optimalizace metody (parametry viz Tabulka 11) byla zaměřena na maximalizaci citlivosti na požadovaných m/z při současném důrazu na minimalizaci poměru oxidů, testované na poměru CeO/Ce. Po optimalizaci byl poměr CeO/Ce < 0,01. Citlivost přístroje byla laděna kompromisně pro oblast lehkých, středních i těžkých prvků. Sensitivita lehkých prvků byla testovaná na izotopu ⁷Li, kdy měření standardu o koncentraci 1 ppb vykazovalo signál > 6000 cps/1ppb standardu. Jako zástupce středně těžkých prvků bylo zvoleno ¹¹⁵In. Vyladěné nastavení zařízení pro m/z = 115 poskytovalo odezvu > 50000 cps/1ppb standardu. Citlivost metody pro oblast těžkých prvků byla optimalizována na m/z = 238, pomocí 1ppb standardu

Uranu. Typická senzitivita po optimalizaci překračovala hranici 200000 cps/1ppb standardu. Výkon radiofrekvenčního generátoru byl nastaven na 1400 W pro maximální dekompozici matrice. Průtok kolizního plynu a nastavení hexapolu byly optimalizovány pro zajištění signálu < 500 cps na $m/z = 56$ (m/z odpovídající ^{56}Fe) při analýze deionizované vody (bez kolizní cely dochází k interferencím polyatomickými ionty ArO^+ , $m/z = 56$). Data byla snímána metodou peak jump, s časem setrvání 300 ms na jedné m/z (dwell time) a 100 skeny hmotnostního spektra (sweeps).

Tabulka 11: Parametry nastavení ICP-MS pro prvkovou analýzu vína

Parametr	nastavení bez CCT	nastavení s CCT	Jednotka
Extrakční čočka	-152,94	-145,1	
Čočka 1	-1207,84	-1129,41	
Čočka 2	-82,35	-80	
Čočka 3	-131,76	-119,22	
Pole Bias	-6,9	-9,3	
Hexapol	-2,3	-1,4	
Focus	11,37	10,59	
Deflektor 1	-36,86	-40	
Deflektor 2	-133,33	-139,61	
Chladicí plyn	13,49	13,49	l/min
Pomocný plyn	0,79	0,66	l/min
Zmlžovač	0,77	0,9	l/min
Výkon RF	1400	1400	W
Průtok kolizního plynu	0	6,51	ml/min
Ot. peristal. pumpy	15	15	ot/min

Nežádoucí drift signálu během měření a matriční efekt byl korigován metodou interního standardu, který byl do systému přiváděn pomocí online směšovacího kitu (Thermo Fisher scientific, USA). Jako interní standardy byly zvoleny 10 ppb standardy prvků, které se standardně ve víně ve větší míře nevyskytují a pokrývají rovnoměrně celé hmotnostní spektrum – ^{45}Sc , ^{115}In , ^{232}Th .



Obr. 26: Schéma online přivádění interního standardu (<http://www.geicp.com>)

Pro eliminaci vlivu matričního efektu vína na koncentraci analyzovaných prvků bylo třeba kalibrovat zařízení pomocí metody standardního přídávku. Požadované množství zásobních standardů 1g/l bylo přidáváno přímo do vybraného 1:1 zředěného vzorku vína. Zvolený koncentrační rozsah je v uveden v tabulce 12 a vycházel z očekávaných koncentrací ve víně dle literatury (Jackson 2008).

Tabulka 12: Koncentrace standardů pro kalibraci ICP-MS pro měření vín

Prvek	Koncentrační rozsah	Jednotka
La, Nd, Pr	100 - 500 - 1000 - 5000	ng/l
Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sm, Tb, Tm, Y, Yb	20 - 100 - 200 - 1000	ng/l
Li, Be, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Pb, Bi	1 - 5 - 10 - 50 - 100 - 500	µg/l

V rozložených vzorcích **bobulí a listů** bylo na IPC-MS analyzováno celkem 17 prvků, konkrétně izotopy: ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{88}Sr , ^{95}Mo , ^{111}Cd , ^{137}Ba , ^{208}Pb . Optimalizované nastavení ICP-MS bylo pro tyto vzorky identické s měřením vzorků vín.

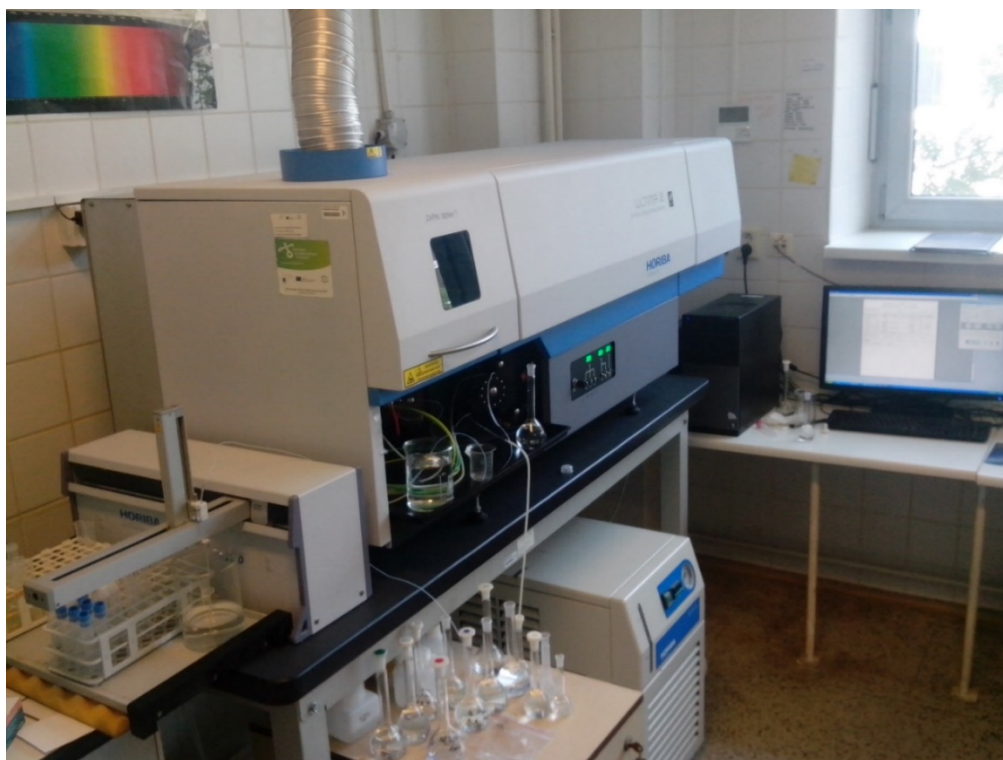
Potlačení matričního efektu způsobeného vysokým podílem HNO_3 a H_2O_2 v rozkladné směsi bylo realizováno kalibrací přístroje pomocí metody standardního přídávku. Jednotlivé standardy byly ředěny ze zásobních 1g/l prvkových roztoků do identické směsi kyseliny a peroxidu, jakou byly vzorky rozkládány. Zvolený koncentrační rozsah je v uveden v tabulce 13 a vychází z očekávaných koncentrací v bobulích a listech révy dle literatury (Barker a Pilbeam 2007).

Tabulka 13: *Koncentrace standardů pro kalibraci ICP-MS pro měření vzorků révy*

Prvek	Koncentrační rozsah	Jednotka
Co, Ni, As, Cd, Pb	1 - 5 - 10 - 50	µg/l
Cu	10 - 50 - 100 - 500	µg/l

4.3.2. Metodika prvkové analýzy vzorků vín a révy pomocí ICP-OES

Pro stanovení prvků ve vzorcích vín a révy, které nebylo možno spolehlivě změřit pomocí ICP-MS, byly vytvořeny a validovány dvě metody měření na ICP-OES. Měření byla realizována pomocí přístroje Horiba Jobin Yvone, typ Ultima 2. Přístroj generoval plazmu v konfiguraci s radiálním uložením plazmového hořáku. Jako plazmový plyn a plyn pro proplach optiky byl využíván argon. Zařízení bylo spojeno s autosamplermem a čerpání vzorku do zmlžovače bylo realizováno peristaltickou pumpou. Vzorek byl zmlžován pomocí skleněného kónického zmlžovače zavedeného do cyklonické mlžné komory, přímo připojené do plazmového hořáku z křemenného skla. Zařízení standardně poskytovalo možnost kontinuálního skenování vlnových délek v rozsahu 160 – 800nm s rozlišením 5pm. Detekčním systémem byl duální fotonásobič s HDD systémem (High dynamic detection system), který umožňoval měření v koncentračním rozsahu až 10 řádů, díky online tuningu signálu během měření.



Obr. 27: *Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem*

V rámci ICP-OES stanovení bylo ve **vínech** měřeno celkem 10 prvků: Ca, K, Na, Al, Fe, Mg, Mn, Sr, Zn. Prvky Ca, K a Na byly měřeny separátní metodou (Metoda 2), z důvodu relativně nízkého ionizačního potenciálu a výrazně vyššího obsahu těchto prvků v porovnání s ostatními měřenými prvky.

Optimalizace metody (parametry viz tabulky 14 a 15) byla zaměřena na maximalizaci poměru signálu k šumu na charakteristických vlnových délkách. Vhodné vlnové délky pro měření vín a rozložených vzorků révy byly zvoleny na základě studia Atlasu spektrálních interferencí pro ICP spektrometrii.

Tabulka 14: Nastavení optické části ICP-OES

Prvek	Vlnová délka nm	Napětí fotonásobiče V	Vstupní štěrbinu μm	Výstupní štěrbinu μm
Al	396,152	750	20	15
Fe	259,94	735	20	15
Mg	285,213	605	20	15
Mn	257,61	650	20	15
Sr	421,552	750	20	15
Zn	206,191	750	20	15
Ca	422,673	711	20	15
K	766,49	849	20	15
Na	588,995	629	20	15

Tabulka 15: Nastavení ICP části ICP-OES

	Metoda 1	Metoda 2	
Výkon	1400	1200	W
Otáčky pumpy	18	15	ot/min
Plazmový plyn	12,5	14	l/min
Stínící plyn	0,2	0,8	l/min
Tlak na zmlžovači	3	3	bar

Metoda 2 zahrnovala nastavení pro měření Ca, K a Na

Kalibrace, v rámci analýz vína, byla realizovaná metodou standardního přídatku do vína připraveného stejným postupem jako vzorky, zvláště pro červená a bílá vína. Zvolený koncentrační rozsah je v uveden v tabulce 16 a vycházel z očekávaných koncentrací ve víně dle literatury (Jackson 2008).

Tabulka 16: *Koncentrace standardů pro kalibraci ICP-OES pro analýzu vín*

Prvek	Koncentrační rozsah	Jednotka
Ca, K, Na	50 - 100 – 500	mg/l
Al, Fe, Mg, Mn, Sr, Zn	0,1 - 0,5 - 1 - 10 - 50	mg/l

Ve vzorcích **bobulí a listů révy** bylo na ICP-OES stanovováno stejných 9 prvků, jako u vzorků vína. Metoda pro analýzu rostlinných vzorků byla optimalizovaná dle stejných postupů jako u ICP-OES analýz vína a bylo ověřeno, že lze tuto metodiku bez úprav aplikovat. Potlačení matričního efektu způsobeného vysokým podílem HNO₃ a H₂O₂ v rozkladné směsi bylo realizováno kalibrací přístroje pomocí metody standardního přídatku. Jednotlivé standardy byly ředěny ze zásobních 1g/l prvkových roztoků do identické směsi kyseliny a peroxidu, jakou byly vzorky rozkládány. Zvolený koncentrační rozsah je v uveden v tabulce 17 a vycházel z očekávaných koncentrací v bobulích a listech révy dle literatury (Bowes a kol. 2008).

Tabulka 17: *Koncentrace standardů pro kalibraci ICP-OES pro révy vinné*

Prvek	Koncentrační rozsah	Jednotka
Ca, K, Mg	50 - 100 – 500 - 1000	mg/l
Al, Fe, Mn, Sr, Zn, Na	0,1 - 0,5 - 1 - 10	mg/l

Podobně jako u ICP-MS metody byl během ICP-OES měření prvkového složení vín a mineralizátů révy monitorován drift signálu a matriční efekt pomocí online přivádění interního standardu. Jako interní standard byl používán 100 ppb roztok In.

4.3.3. Stanovení antioxidační aktivity vzorků vína pomocí EPR spektrometrie

Stanovení radikál zhášejících vlastností vín z bio produkce a z integrované produkce hroznů bylo provedeno na EPR spektrometru Magnostech MS300 (Magnostech, Německo). Jako radikálový systém byl zvolen roztok 2-2-diphenyl-picrylhydrazylu (DPPH) v ethanolu (Garcia-Alonso a kol. 2005; Arvanitizannis a kol. 2006; Petrisor a kol. 2007). Samotné měření bylo realizováno v plochých kyvetách, kvůli potlačení dielektrického efektu polárních roztoků (Garcia-Alonso a kol. 2005)

V rámci optimalizace metody byla nejprve ověřena časová stabilita referenčního reakčního systému (0,5ml vody + 0,5 ml roztoku DPPH). Po 30 minutách skenování EPR

spektra nedocházelo ke snižování intenzity signálu, tzn. k terminaci DPPH radikálů způsobené vnějšími vlivy.

Tabulka 18: *Nastavení EPR pro radikálový systém DPPH*

Magnetické pole	Modulace	Mikrovlnné tlumení	Čas cyklu
G	mG	dB	s
3360	5000	10	11

Vzorky vín upravené dle postupu v kapitole 5.3.3. byly smíchány ve zkumavce v poměru 0,5 ml zředěného vína a 0,5 ml 0,5mM roztoku DPPH. V tomto okamžiku byl spuštěn časovač experimentu. Terminace DPPH radikálů byla pozorována jako snižování amplitudy spektra, které je přímo úměrné úbytku koncentrace DPPH v systému. Jako výstup z analýzy byl v rámci jednoho měření zaznamenáván soubor 12 spekter snímaných od třetí minuty od smíchání DPPH a vzorku vína. Každý vzorek byl změřen 5x. Jako blank byla místo vína použita deionizovaná voda.

Srovnání antioxidačních vlastností vzorků vín bylo vyhodnocováno dvěma kvantifikačními metodami – vyhodnocením relativního úbytku koncentrace DPPH v čase $t = 25\text{min}$ po počátku experimentu a konverzí této hodnoty na Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC – ekvivalent antioxidační aktivity Troloxu) dle vztahu:

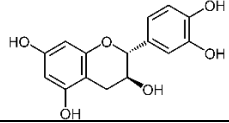
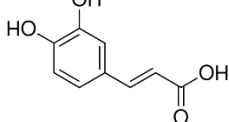
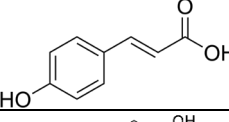
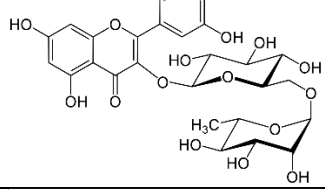
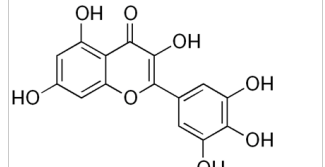
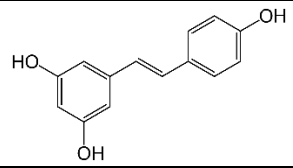
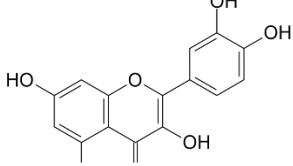
$$\text{TEAC}_{\text{DPPH}} = \frac{(c_0 - c_t) * V_{\text{DPPH}}}{V_{\text{Sample}}} * \vartheta * Z$$

Výpočet TEAC: c_t a c_0 vyjadřují koncentrace DPPH v čase 0 a 14min. V_{DPPH} a V_{Sample} jsou objemy přidávané do systému. ϑ je stechiometrický koeficient reakce DPPH s Troloxem (v případě reakce troloxu s DPPH je to $\frac{1}{2}$). Z je faktor zředění.

4.3.4. Metodika stanovení vybraných organických látek ve víně pomocí HPLC

Pro rozšíření jednotlivých autentifikačních modelů založených na prvkové analýze byly ve vínech stanoveny vybrané organické látky s fenolickou a polyfenolickou strukturou. Stanovované fenolické sloučeniny (Tabulka 19) byly zvoleny na základě jejich vlivu na základní charakteristiku vína, jako je barva, aroma, chuť a další (Mitič a kol. 2010 a Jackson 2008).

Tabulka 19: Fenolické látky stanovené ve vínech pomocí HPLC

Sloučenina	Retenční čas (min)	Vlnová délka DAD (nm)	Strukturní vzorec
Katechin	3,935	280	
Kys. Kávová	5,404	300	
Kys. Kumarová	9,437	300	
Rutin	10,654	360	
Myricetin	12,399	360	
Resveratrol	13,57	300	
Kvercetin	16,268	360	

Analýzy vín byly prováděny na HPLC Agilent 1260 infinity vybaveném detektorem s diodovým polem s 10 mm absorpční celou (DAD), chlazeným autosamplerm, kvartérní pumpou a degasérem. Separace byla realizována na koloně Supelco Ascentis C18 2,7 μm , 10 cm x 4,6 mm s částicemi s pevným jádrem a porézním při teplotě 30 °C. Separace probíhala dle následujícího lineárního gradientového programu: 0-7 min 88% A, 7-15 min 75% A, 15- 20 88% A. Solvent A byl 100% acetonitrile a B byl vodný, 20 mM pufovací roztok KH_2PO_4 upravený kyselinou o-fosforečnou na pH 2,5.

4.4. Statistická analýza dat

Analýza a statistické vyhodnocení naměřených dat bylo realizováno pomocí technik Analýzy rozptylu (analysis of variance - ANOVA), shlukové analýzy (cluster analysis - CA), analýzy hlavních komponent (principal component analysis - PCA) a diskriminační analýzy (diskriminant analysis – DA). Vše bylo realizováno pomocí softwarů Excel (Microsoft, USA), Statistica (Statsoft, USA), Unistat (Unistat, Velká Británie), XLstat (Addinsoft, Francie) a IBM SPSS (IBM, USA).

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

V této kapitole budou postupně uvedeny a diskutovány výsledky všech analýz a vytvořených statistických modelů. Výsledky a diskuse jsou členěny dle následující struktury:

- Výsledky validace metod
- Výsledky analýz vín – zdrojová data
- Klasifikace českých a moravských vín dle geografického původu
- Klasifikace moravských vín dle odrůdy
- Vyhodnocení možností využití prvkové analýzy a analýzy antioxidační aktivity k určení systému produkce hroznů

5.1. Validace instrumentálních metod

Optimalizované metody popsané v kapitole 5 byly před analýzou reálných vzorků validovány, aby se ověřila přesnost a správnost jednotlivých postupů.

5.1.1. Validace ICP-MS metod

V rámci validace metod sloužících k analýze vín a révy se testovala výtěžnost, reprodukovatelnost, linearita kalibrace a limity detekce. Z důvodu rozdílné podstaty matrice vína a mineralizátů rostlinných vzorků byla validace provedena separátně. Výsledky validace ICP-MS metody jsou uvedeny v tabulce 20.

Výtěžnost byla stanovována měřením obohacených vzorků vína a měřením rozložených vzorků listů jahodníku Metranal 3 (Analytika Praha, CZ) s certifikovaným obsahem prvků. Vzorky certifikovaného materiálu byly mineralizovány stejným způsobem, jako vzorky listů révy a bobulí. Průměrná hodnota výtěžnosti v procentech se pohybovala pro stanovované prvky v rozsahu od 89% do 104%. Reprodukovatelnost měření byla ověřena opakovaným měřením ($n = 10$) tří multielementárních standardů o koncentracích 1, 10, 50 ppb ve vinné matrici a v matrici simulující rozkladnou směs pro rozklad rostlinných vzorků. Relativní směrodatné odchylky měření v % pro všechny stanovované prvky nepřekročily 3%. Linearita metody, v tomto případě vyjadřovaná jako těsnost závislosti mezi analytickým signálem a koncentrací prvků, byla testována měřením kalibračních roztoků (viz tabulka 20), nezávisle pro jednotlivé

analyty. Přesnost kalibrace byla charakterizovaná korelačním koeficientem R^2 a v rámci stanovovaných prvků byl ve všech případech $R^2 > 0,999$. Limity detekce pro jednotlivé prvky byly vypočítány z analytického signálu slepého pokusu získaného jeho opakovaným měřením ($n = 10$).

Tabulka 20: *Výsledky validace ICP-MS metody pro analýzu vín a révy*

Prvek	LOD [ug/l]	Výtěžnost víno [%]	Výtěžnost Metranal [%]
Li	0,015	91	neměřeno
Be	0,021	94	neměřeno
V	0,001	98	neměřeno
Cd	0,002	100	97
Cr	0,007	98	neměřeno
Co	0,003	101	94
Ni	0,034	95	90
Cu	0,047	96	93
As	0,23	104	89
Pb	0,001	95	91
Bi	0,078	96	neměřeno
Dy	0,001	98	neměřeno
La	0,004	104	neměřeno
Nd	0,004	98	neměřeno
Pr	0,007	99	neměřeno
Ce	0,001	97	neměřeno
Dy	0,001	97	neměřeno
Er	0,009	99	neměřeno
Eu	0,012	98	neměřeno
Gd	0,003	97	neměřeno
Ho	0,001	102	neměřeno
Lu	0,006	98	neměřeno
Sm	0,014	97	neměřeno
Tb	0,011	97	neměřeno
Tm	0,002	95	neměřeno
Y	0,8	96	neměřeno
Yb	0,003	99	neměřeno

5.1.2. Validace ICP-OES metod

V rámci validace ICP-OES metody se podobně jako u ICP-MS testovaly 4 základní parametry, a to výtěžnost, reprodukovatelnost, linearita kalibrace a limity detekce. Z důvodu rozdílné podstaty matrice vína a mineralizátů rostlinných vzorků byla validace provedena separátně.

Výtěžnost byla stanovována měřením obohacených vzorků vína a měřením rozložených vzorků listů jahodníku Metranal 3 s certifikovaným obsahem prvků. Vzorky certifikovaného materiálu byly mineralizovány stejným způsobem, jako vzorky listů révy a bobulí. Průměrná hodnota výtěžnosti v procentech se pohybovala pro stanovované prvky v rozsahu od 89% do 104%. Reprodukovatelnost měření byla ověřena opakovaným měřením ($n = 10$) tří multielementárních standardů obsahujících všechny měřené prvky ve vinné matrici o koncentracích 0,5, 1, 10 ppm pro mikroprvky a 50, 100, 500 ppm pro makroprvky. Měření bylo prováděno jak ve vinné matrici, tak v mineralizační směsi. Relativní směrodatné odchylky měření ($n = 10$) v % pro všechny stanovované prvky nepřekročily 3%. Linearita metody byla testována měřením kalibračních roztoků (viz tabulka 21), nezávisle pro jednotlivé analyty. Přesnost kalibrace byla charakterizovaná korelačním koeficientem R^2 a v rámci stanovovaných prvků byl koeficient ve všech případech $R^2 > 0,999$. Limity detekce pro jednotlivé prvky byly vypočítány z analytického signálu slepého pokusu získaného jeho opakovaným měřením ($n = 10$).

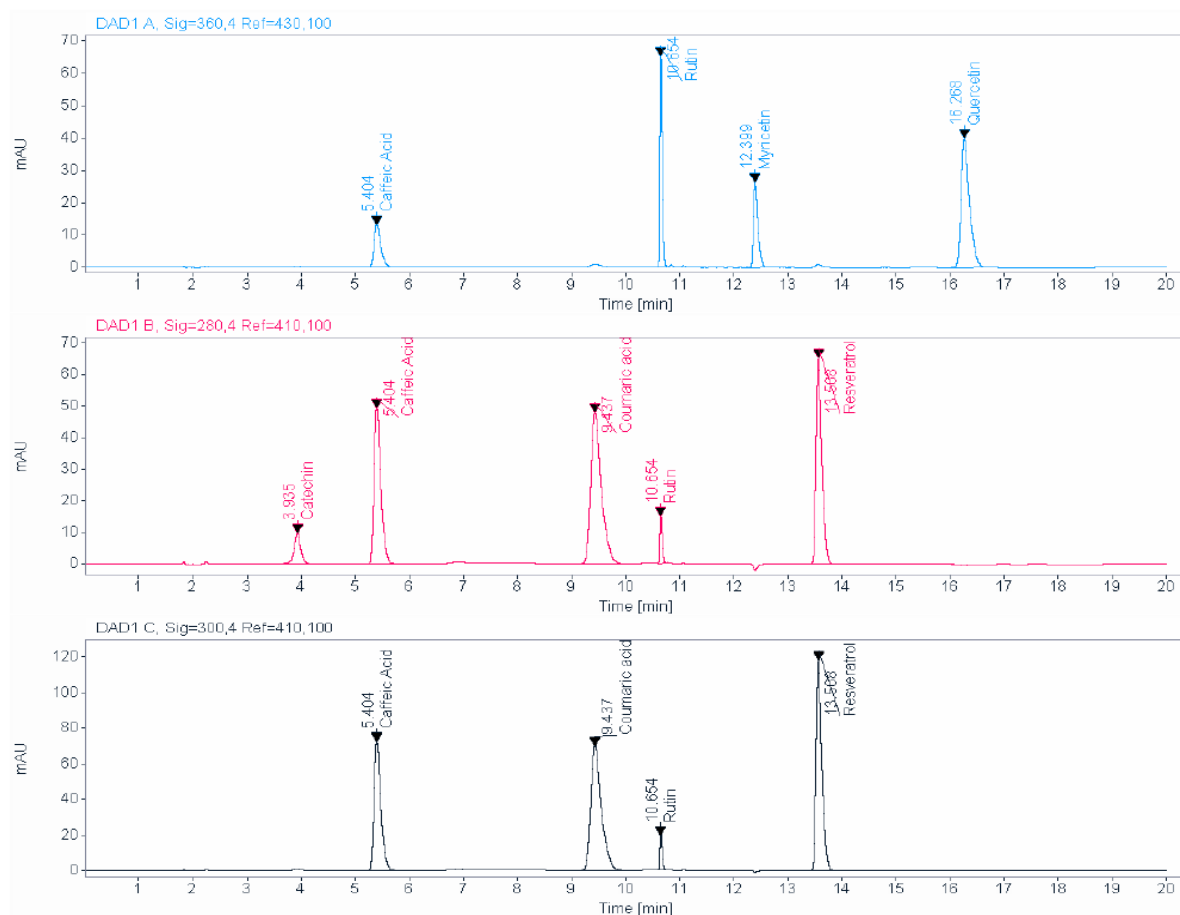
Tabulka 21: *Výsledky validace ICP-OES metody pro analýzu vín a révy*

Prvek	LOD [$\mu\text{g/l}$]	Výtěžnost víno [%]	Výtěžnost Metranal [%]
Al	58	94	91
Fe	10	99	98
Mg	5	102	95
Mn	1	99	98
Sr	1,5	96	101
Zn	12	96	92
Ca	45	89	90
K	550	104	102
Na	48	98	97

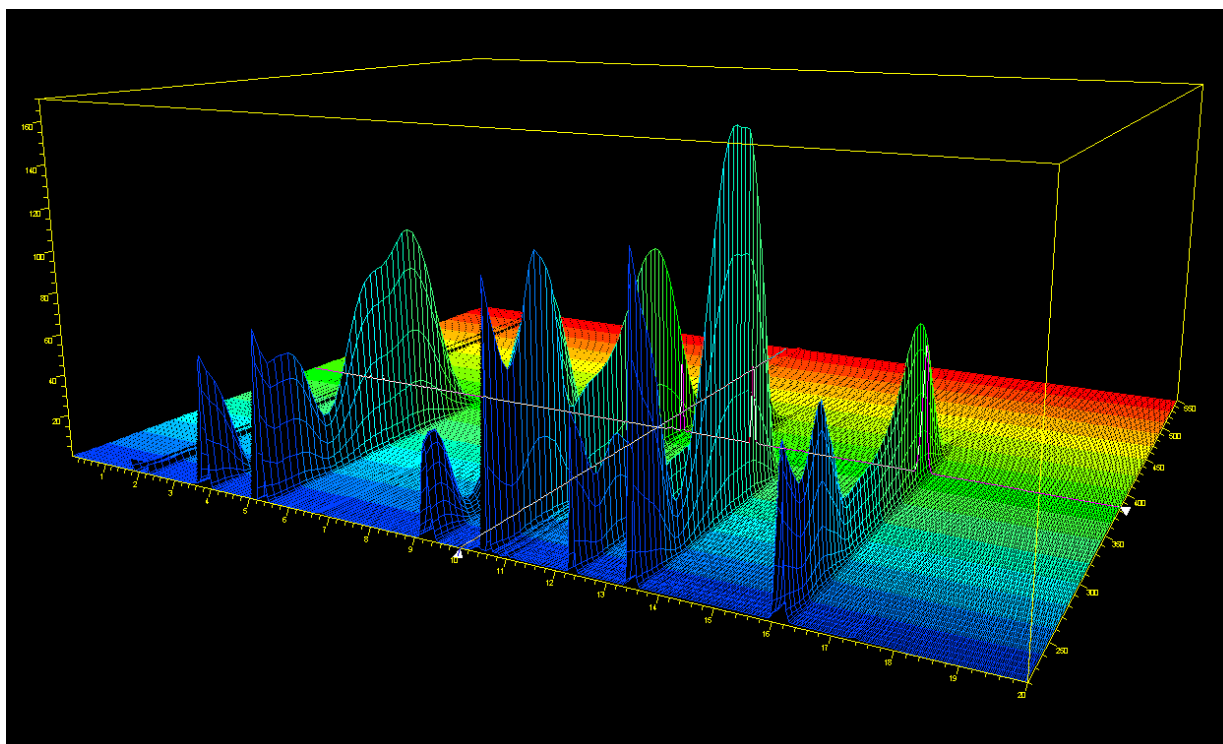
5.1.3. Validace HPLC metody

Identifikace a separace jednotlivých látek byla založená na analýze čistých standardů. Konfirmace identity látek byla provedena porovnáváním naměřených spekter s knihovnou spekter v rozsahu vlnových délek od 220-550 nm, s krokem po 0,5 nm (Obr. 28 a 29).

Vyhodnocení dat bylo prováděno v chromatografickém softwaru Agilent Chemstation (Agilent, USA). Kalibrační měření a vyhodnocení linearoty bylo prováděno lineární regresií analýzou. Všechny kalibrační závislosti byly lineární v testovaném rozsahu koncentrací 1, 10, 20, 50 mg/l ($r^2 > 0,999$).



Obr. 28: Chromatogramy čistých standardů. Stanovení při třech vlnových délkách (280, 300 a 360nm)



Obr. 29: 3D chromatogram směsi čistých standardů (osa X je čas v min., osa Y je absorbance v mAU a osa Z je vlnová délka v nm)

Detekční limity (tabulka 22) byly stanoveny měřením slepého pokusu. Bylo určeno maximální oscilace základní linie v oblasti chromatogramu daného dvacetinásobkem pološířky píku jednotlivých separovaných látek h_{\max} . LOD signálu $y = 3h_{\max}$. Detekční limity se pohybovaly v rozsahu od 0,023 mg/l (Resveratrol) do 0,74 mg/l (Kvercetin). Přesnost metody byla stanovena opakovaným měřením standardních roztoků a vybraných vzorků vín obohacených na koncentraci 5 mg/l všech vybraných látek. Přesnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka 10 měření v %. Výtěžnost metody byla ověřena analýzou vzorků vín obohacených čistými standardy o koncentraci 10 mg/l. Výtěžnost byla stanovena separátně pro bílá a červená vína. Výtěžnost se pohybovala v rozsahu od 89 - 103%.

Tabulka 22: Validační parametry HPLC metody (r^2 – korelační koeficient kalibrace)

Sloučenina	Linearita [mg/l]	r^2	LOD [mg/l]	Výtěžnost červené [%]	Výtěžnost bílé [%]
Katechin	1 - 50	0,9999	0,5	89	93
Kys. Kávová	1 - 50	0,9997	0,35	94	96
Kys. Kumarová	1 - 50	0,9999	0,47	97	97
Rutin	1 - 50	0,9998	0,08	101	99
Myricetin	1 - 50	0,9999	0,9	91	90
Resveratrol	1 - 50	0,9999	0,02	103	101
Kvercetin	1 - 50	0,9999	0,5	97	100

5.2. Výsledky analýz vzorků vín

V této kapitole jsou postupně prezentovány výsledky analýz vzorků vín, separátně pro červené a bílé odrůdy. Tabulky s výsledky analýz prvkového složení a obsahu organických látek obsahují stručné shrnutí naměřených dat, které byly dále zpracovány a jsou diskutovány v kapitolách zabývajících vývojem jednotlivých klasifikačních modelů. Soubor základních stanovených dat byl dále rozšířen o vybrané poměry proměnných zvolených na základě možných vzájemných korelací. Jednalo se o poměry Sr/Ba, Sr/Mg, Na/Fe, Na/Al, Al/Cr, Cr/V, Mn/Cr, Eu/Tb, Na/Li, Mg/Be, Mg/Ca, Pr/Nd, Gd/Tb, Fe/Ni, Eu/Er, Fe/Co, Fe/Ca, Mo/Sn, Mn/Fe, Mn/Zn, Mn/Al, Tm/Yb, Tb/Ho, Yb/Lu, Eu/Dy, Sm/Nd. Společně s poměry tak bylo stanoveno celkem 71 proměnných.

5.2.1. Bílá vína

Data z analýz vzorků 53 bílých vín jsou v tabulkách vyjádřeny jako rozptyl koncentrací v rámci jednotlivých podoblastí, včetně průměrných hodnot celých skupin.

Tabulka 23: *Výsledky ICP-MS analýzy bílých vín*

		⁷ Li	⁹ Be	¹¹¹ Cd	¹¹⁸ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba	²⁰⁸ Pb	²⁰⁹ Bi	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	⁶⁵ Cu	⁷⁵ As	⁹⁵ Mo
Podoblast		ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb
LIT	Max	129,34	0,95	0,824	5,118	0,418	139,3	9,512	0,066	229,6	20,28	6,28	42,4	142,06	6,706	2,022
	Min	2,91	0,416	0,59	2,342	0,194	38,88	4,336	0,006	8,194	8,722	3,91	30,06	61,08	5,26	1,29
	Průměr	66,16	0,69	0,69	3,39	0,30	79,94	7,65	0,04	82,94	12,86	5,47	35,39	102,8	5,99	1,75
MIK	Max	23,8	3,89	0,75	5,388	0,79	131,36	27,05	0,38	40,36	16,966	6,402	31,86	909,8	7,088	7,122
	Min	6,068	0,368	0,394	0,88	0,466	64,12	14,122	0,046	5,806	7,282	3,104	19,168	29,14	2,662	1,282
	Průměr	16,47	1,98	0,55	2,34	0,58	87,64	18,86	0,22	21,53	10,91	4,35	26,19	195,91	5,11	3,91
SLO	Max	26,72	4,148	0,704	5,358	0,81	180,14	24,34	0,378	56,78	23,3	8,868	44,1	213,8	7,986	8,644
	Min	5,102	0,13	0,16	0,134	0,218	43,84	2,56	0,012	1,174	7,048	2,896	17,192	5,75	3,088	0,714
	Průměr	14,14	1,34	0,52	2,07	0,47	86,69	12,55	0,14	17,13	11,66	5,29	28,00	63,88	5,11	3,04
VP	Max	40,9	11,03	0,926	5,756	4,274	115,16	35,24	1,468	117,3	44,94	7,964	42,18	296,4	28,24	32,56
	Min	14,128	0,564	0,278	0,53	0,22	50,78	6,304	0,036	3,098	6,096	1,89	16,398	13,81	2,38	1,736
	Průměr	22,20	3,91	0,60	2,58	1,09	80,31	20,18	0,46	22,21	14,43	4,57	25,55	117,81	8,21	5,92
ZNO	Max	33,44	10,372	0,674	7,628	1,088	158,6	25,96	1,714	32,88	15,99	7,332	36,1	273,36	9,51	3,366
	Min	4,46	2,466	0,388	1,316	0,374	63,1	10,352	0,046	3,358	8,84	2,474	21,48	16,624	3,208	1,328
	Průměr	13,37	5,84	0,51	3,36	0,71	110,61	19,89	0,64	13,67	12,44	4,36	25,75	127,21	6,09	2,37

Tabulka 24: *Výsledky ICP-MS analýzy bílých vín – prvky vzácných zemin*

		¹³⁹ La	¹⁴⁰ Ce	¹⁴¹ Pr	¹⁴⁶ Nd	¹⁴⁷ Sm	¹⁵³ Eu	¹⁵⁷ Gd	¹⁵⁹ Tb	¹⁶³ Dy	¹⁶⁵ Ho	¹⁶⁶ Er	¹⁶⁹ Tm	¹⁷² Yb	¹⁷⁵ Lu
Podoblast		ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt
LIT	Max	3620	7588	944	3898	847,4	268	568	120	645	118	343	49,5	348	56,9
	Min	28,54	30,44	8,894	38,16	12,76	69,8	10,44	2,226	19,84	6,664	34,98	9,338	81,9	15,2
	Průměr	1459	3038	379,82	1567,1	345,19	136,96	236,64	50,38	271,8	51,435	153,7	23,86	172,99	30,6
MIK	Max	8342	18454	2194	9090	1944	595	1349,2	291,6	1621	316,2	904	127,8	897,8	140,
	Min	137,56	466,8	53,96	210,8	52,38	32,46	50,76	9,906	66,08	17,12	68,58	14,334	124,82	26,1
	Průměr	2065	4513	547,71	2262,7	498,74	170,56	367,12	79,98	450,1	89,193	261	40,25	288,25	48,4
SLO	Max	2340	5708	658,4	2816	676,6	224,8	463,8	114,6	717	159,86	502	84,88	615,4	103
	Min	24,64	18,564	10,52	8,812	8,918	19,428	11,268	2,946	25,9	9,478	28,56	6,008	34,72	5,75
	Průměr	681,4	1617	187,35	778,3	185,59	87,394	141,72	34,39	217,8	49,889	169,7	30,591	241,83	43,5
VP	Max	2182	5150	514,4	2070	497,2	130,88	353,8	86,9	543,4	118,34	386	63,34	485,6	88,1
	Min	25,06	49,88	8,574	32,58	9,848	14,126	9,03	2,174	13,7	3,794	17,62	4,098	42,98	9,51
	Průměr	593,8	1375	154,6	641,16	152,7	63,801	118,42	28,43	185,1	43,326	151,2	27,995	230,54	43,2
ZNO	Max	1567	3312	409,4	1728	398	146,28	274,2	64,82	448	107,28	386,8	68,92	594	106
	Min	27,98	49,38	12,47	17,882	8,73	17,356	10,994	1,706	8,818	3,362	15,45	4,992	47	12,2
	Průměr	625,8	1294	163,9	671,69	159,79	77,486	126,37	29,56	190,8	43,682	151,9	28,023	233,86	43,12

Tabulka 25: *Výsledky ICP-OES analýzy vzorků bílých vín*

		Al	Fe	Mg	Mn	Sr	Zn	Ca	K	Na
Podoblast		ppb	ppb	ppm	ppb	ppb	ppb	ppm	Ppm	ppm
LIT	Max	3629	2620	198	1737	260	812	120	13749	16,95
	Min	1265	1554	124	1299	175	683	99,3	11085	7,72
	Průměr	2184	2256	159	1554	216	762	110	11985	11,5
MIK	Max	4395	2433	198	1564	676	847	127	14364	33,1
	Min	1450	574	115	588	281	339	55,9	1314	9,51
	Průměr	2323	1119	148	967	421	580	87,8	7782	18,1
SLO	Max	4808	5022	207	1601	397	962	121	18054	41,3
	Min	1137	524	60	422	202	359	53,6	1890	6,57
	Průměr	2607	1797	134	872	320	604	98,8	12605	18,5
VP	Max	3301	3230	192	1413	569	825	97,0	14116	90,7
	Min	1783	663	127	614	308	291	59,7	1414	6,43
	Průměr	2559	1354	161	887	404	570	84,1	10848	27,9
ZNO	Max	4728	4105	187	1253	533	2191	129	13185	109
	Min	1493	438	113	580	285	285	45,5	1436	10,78
	Průměr	2394	1692	141	817	384	696	86,5	8406	51,8

Tabulka 26: *Výsledky HPLC analýzy vybraných organických konstituentů bílých vín*

		Kyselina Kávová	Kyselina kumarová	(+/-) Katechin
Podoblast		ppb	ppb	Ppb
LIT	Max	2768	1833	18950
	Min	692	716	5934
	Průměr	1676	1246	11518
MIK	Max	2364	2847	17139
	Min	799	826	3833
	Průměr	1652	1323	8522
SLO	Max	2334	2290	28670
	Min	475	669	2506
	Průměr	1197	1282	7323
VP	Max	2673	1776	7625
	Min	829	594	4296
	Průměr	1359	1149	5803
ZNO	Max	10375	5294	18559
	Min	555	817	3118
	Průměr	3476	2192	10590

U bílých vín bylo ve všech vzorcích případech možné naměřit pouze polyfenolické látky uvedené v tabulce 26. V případě, že v některých vínech byly analyty pod limitem detekce, byly tyto proměnné vyřazeny ze statistického vyhodnocování.

5.2.2. Červená vína

Data z analýz vzorků 27 červených vín jsou v tabulkách vyjádřeny jako rozptyl koncentrací v rámci jednotlivých podoblastí, včetně průměrných hodnot celých skupin.

Tabulka 27: *Výsledky ICP-MS analýzy červených vín*

Podoblast		⁷ Li	⁹ Be	¹¹¹ Cd	¹¹⁸ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	⁶⁵ Cu	⁷⁵ As	⁸⁹ Y	⁹⁵ Mo
		ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	Ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb
MIK	Max	15,4	0,884	0,36	5,018	0,362	163,52	60,38	15,14	3,552	33,5	167,04	4,292	0,89	14,896
	Min	7,018	0,088	0,232	1,342	0,228	91,96	1,416	6,906	2,936	21,1	26,1	2,026	0,442	2,712
	Průměr	10,74	0,28	0,29	2,59	0,27	140,12	20,98	10,63	3,28	27,00	96,58	2,97	0,62	6,05
SLO	Max	20,88	0,448	0,524	2,282	1,666	154,76	62,7	17,12	4,764	41,44	101,94	6,928	0,994	4,386
	Min	6,976	0,108	0,2	0,74	0,186	101,34	1,884	7,938	3,256	22,86	35,7	1,702	0,556	1,334
	Průměr	13,55	0,25	0,31	1,20	0,81	126,33	23,74	12,18	3,78	29,67	60,57	4,16	0,79	2,81
VP	Max	27	1,398	0,418	3,612	0,56	190,14	95,7	20,84	6,23	40,16	166,32	6,538	2,84	14,328
	Min	8,326	0,058	0,204	0,316	0,136	78,26	0,484	8,902	2,524	25,54	26,24	1,52	0,178	0,838
	Průměr	16,31	0,34	0,29	1,96	0,29	134,76	22,34	14,17	3,93	32,52	66,13	3,32	1,05	3,92
ZNO	Max	17,234	3,1	0,432	3,158	0,664	253,8	76,04	24,2	5,168	52,92	160,62	4,846	1,066	3,744
	Min	9,678	0,074	0,224	0,758	0,198	103,44	0,78	10,48	3,02	21,78	28,16	2,116	0,17	1,31
	Průměr	12,99	0,48	0,29	1,84	0,32	152,84	15,97	14,11	4,20	34,00	70,64	3,03	0,44	2,02

Tabulka 28: *Výsledky ICP-MS analýzy červených vín – prvky vzácných zemin*

		¹³⁹ La	¹⁴⁰ Ce	¹⁴¹ Pr	¹⁴⁶ Nd	¹⁴⁷ Sm	¹⁵³ Eu	¹⁵⁷ Gd	¹⁵⁹ Tb	¹⁶³ Dy	¹⁶⁵ Ho	¹⁶⁶ Er	¹⁶⁹ Tm	¹⁷² Yb	¹⁷⁵ Lu
Podoblast		ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt
MIK	Max	449,8	1043	115,1	442	96,82	87,26	61,62	14,87	86,82	18,18	63,72	10,98	87,52	15,164
	Min	205,8	496,8	49,54	213,8	60,8	46,44	38,12	11,66	69,16	13,11	37,52	5,612	35,36	4,744
	Průměr	320,88	710,6	76,7	308,1	75,62	75,46	52,41	12,98	79,72	15,95	49,276	7,864	58	9,1596
SLO	Max	750,6	1650	192,8	806,8	184,1	100,94	134,1	31,82	179,8	32,2	88,4	12,62	86,58	14,008
	Min	183,26	303,2	44,78	175	42,3	59,14	29,6	6,886	44,52	11,04	44,64	6,044	36,88	6,364
	Průměr	479,81	1042	127,7	518	118,7	81,792	83,83	19,98	113,3	21,1	64,392	9,732	66,94	10,611
VP	Max	1421,2	2840	328,2	1342	292,2	165,24	207,2	54,36	377	84	269,4	44,88	361,4	60,38
	Min	40,3	100,9	9,324	36,86	12,45	35,54	8,042	1,576	12,54	3,01	10	1,65	11,76	1,74
	Průměr	595,4	1291	145,3	590,4	134,9	91,403	98,17	25,48	150,5	30,58	92,851	14,21	103	16,42
ZNO	Max	893	2266	252,4	973,8	191,6	124,88	126	26,76	134,5	24,62	72,54	9,658	85,24	17,34
	Min	46,74	91,96	11,2	42,54	12,81	41,36	6,994	1,736	8,276	1,768	6,198	1,188	7,464	1,352
	Průměr	279,1	658,8	72,93	288,3	62,81	77,112	40,58	9,451	52,16	10,42	33,347	5,359	39,54	6,808

Tabulka 29: Výsledky ICP-OES analýzy červených vín

Podoblast		Al	Fe	Mg	Mn	Sr	Zn	Ca	Na
		ppb	ppb	ppm	ppb	ppb	ppb	ppm	ppm
MIK	Max	3063	2952	241,9	1,875	779	1181,6	232,2	17,29
	Min	1217	1325	180,1	0,931	678	706,4	138	9,165
	Průměr	1771	1923	211,9	1,333	731	1068,8	183,5	12,75
SLO	Max	2140	9090	233,2	1,211	1074	1544	307,7	19,75
	Min	1116	2018	190,3	0,646	561	953	109,6	8,301
	Průměr	1583	3784	203,7	1,037	818	1311	192,8	11,55
VP	Max	3881	5329	269,3	1,977	1266	1310,8	255,6	25,9
	Min	1012	1098	169,4	0,921	586	920	112,7	3,551
	Průměr	1839	2123	219,3	1,376	824	1093,2	156,1	9,763
ZNO	Max	3017	4998	284,7	1,827	907	1482,6	226,5	110,3
	Min	1080	1658	188,07	0,937	430	918,8	111,6	35,2
	Průměr	1625	3117	229,98	1,497	718	1269,6	176,8	83,6

Tabulka 29: Výsledky HPLC analýzy vybraných organických konstituentů červených vín

Podoblast		(+)-Katechin	K.Kávová	K.Kumarová	Rutin	Myricetin	Resveratrol	Kvercetin
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
MIK	Max	119,47	22,94	6,658	3,588	17,68	3,857	4,513
	Min	31,054	2,765	1,935	1,813	6,066	2,2255	0,461
	Průměr	59,335	9,471	5,11	2,696	10,09	2,8291	2,069
SLO	Max	226,97	10,58	9,849	4,019	24,67	8,1146	9,223
	Min	31,57	2,147	1,716	1,992	1,176	1,6323	1,166
	Průměr	88,681	5,748	6,531	3,132	11,98	4,5218	3,996
VP	Max	85,574	41,8	11,98	7,197	15,42	5,3721	8,151
	Min	23,528	5,544	5,432	1,953	2,519	0,5477	0,798
	Průměr	45,456	16,05	7,179	3,375	9,694	3,173	2,712
ZNO	Max	269,42	18,44	6,982	5,923	12,65	4,4313	4,357
	Min	39,918	0,958	0,438	1,12	2,11	1,7545	0,505
	Průměr	102,6	6,113	3,758	2,992	6,024	3,1497	1,14

5.3. Autentifikační modely vín z Moravské oblasti

Z naměřených dat byly zpracovány celkem 3 diskriminační a klasifikační modely:

- Diskriminace a klasifikace moravských bílých vín dle geografického původu
- Diskriminace a klasifikace moravských červených vín dle geografického původu
- Diskriminace a klasifikace vybraných odrůd
-

Jednotlivé matematické modely byly postaveny na základě analýz celkem 74 chemických parametrů, z toho bylo 40 parametrů z elementární analýzy a 7 z analýzy fenolických látek a 27 poměrů prvků. V ideálním případě mají mít modely následující vlastnosti.

- Vzorby by vždy měly být zařazeny do správné skupiny - diskriminace známých vzorků a predikce neznámých by se měla rovnat 100%
- Model by měl být založen na co nejmenším množství parametrů. Ideální situace je využití pouze jednoho parametru

Prvním krokem analýzy dat bylo testování datasetu na odlehlé výsledky. K tomuto účelu byl aplikován Grubbsův test, vhodný pro data s normální distribucí. Na základě tohoto testování byly odstraněny z klasifikačního modelu vzorky vín, které vykazovaly extrém v chemickém složení v rámci dané testované skupiny (podoblast, odrůda).

Dalším krokem testování byla analýza rozptylu (ANOVA) k posouzení statistické významnosti rozdílů mezi podoblastmi v rámci jednotlivých proměnných na hladině významnosti 95%. Pracovalo se s dvěma hypotézami. Nulová hypotéza (H_0) předpokládá, že průměrné hodnoty konkrétního parametru se statisticky významně neliší mezi podoblastmi respektive mezi odrůdami. Alternativní hypotéza (H_1) předpokládá opak. H_0 byla zamítnuta, pokud hodnota $P < 0,05$ a poměr $F > F_{kritické}$. Čím nižší vypočítaná hodnota P u konkrétního parametru, tím více se liší v rámci jednotlivých skupin. Naopak čím je vyšší poměr F , tím větší byly rozdíly mezi průměrnými hodnotami parametrů v rámci srovnávaných skupin. Parametry s potvrzenou alternativní hypotézou byly vyselektovány do klasifikačních modelů.

Data vyselektovaná analýzou rozptylu byla dále podrobena vícerozměrné analýze dat (popsané v teoretické části) pro určení společných znaků vín ze stejné testované skupiny. Na základě těchto testů byla provedena diskriminace a klasifikace vín do určených kategorií. Vícerozměrné statistické techniky byly aplikovány v tomto pořadí:

- Shluková analýza (CA – cluster analysis)

- Analýza hlavních komponent (PCA – principal component analysis)
- Diskriminační analýza (DA)

5.3.1. Diskriminace a klasifikace moravských bílých vín dle geografického původu

Proces klasifikace bílých vín se sestával z několika fází analýzy dat. Grubsův test odlehlých výsledků a analýza rozptylu byly první selektivní analýzou. Na ty navazovaly klasifikační metody shlukové analýzy, analýzy hlavních komponent a analýzy diskriminační. Výchozí soubor vzorků bílých vín čítal 53 vín, z toho bylo 50 vín z moravských podoblastí a 3 vína z litoměřické podoblasti pro orientační srovnání.

5.3.1.1. Grubsův test odlehlých výsledků

Před samotným testováním byla data z analýz 53 vzorků bílých vín testována na normalitu distribuce. Histogramy potvrdily normální rozdělení dat u všech chemických parametrů v rámci jednotlivých podoblastí. Grubsův test odlehlých výsledků odhalil celkem 10 vzorků vykazujících extrémní hodnoty uvnitř testovaných podoblastí u více než 5 parametrů (viz tabulka 30).

Tabulka 30: *Seznam vzorků bílých vín vyřazených na základě grubbsova testu odlehlých výsledků*

Podoblast	Vzorek
MIK	7
SLO	13, 14, 15, 17, 25
VP	38
ZNO	42, 45, 51

Valná většina vín označených jako odlehlé vzorky pocházela z přechodových zón mezi podoblastmi. Například vzorky 15 a 25 pocházejí z obcí Terezín a Násedlovice, které náleží označením do Slovácké podoblasti, ale leží přímo na hranici s podoblastí Velkopavlovickou. Podobně jako vzorek 45 z Olbramovic, náležící do Znojenské podoblasti, ale geograficky je velice blízko Pohořelicím, na hranici s Velkopavlovickou podoblastí. Z geologických map je jasné, že jednotlivé podoblasti nejsou stoprocentně homogenní a pro naprosto přesnou klasifikaci by bylo třeba ještě jednotlivé zóny rozparcelovat na menší úseky. Předchozí dělení vinařských oblastí podle zákona č. 115/1995 Sb. bylo podrobnější, konkrétně 16 oblastí v ČR

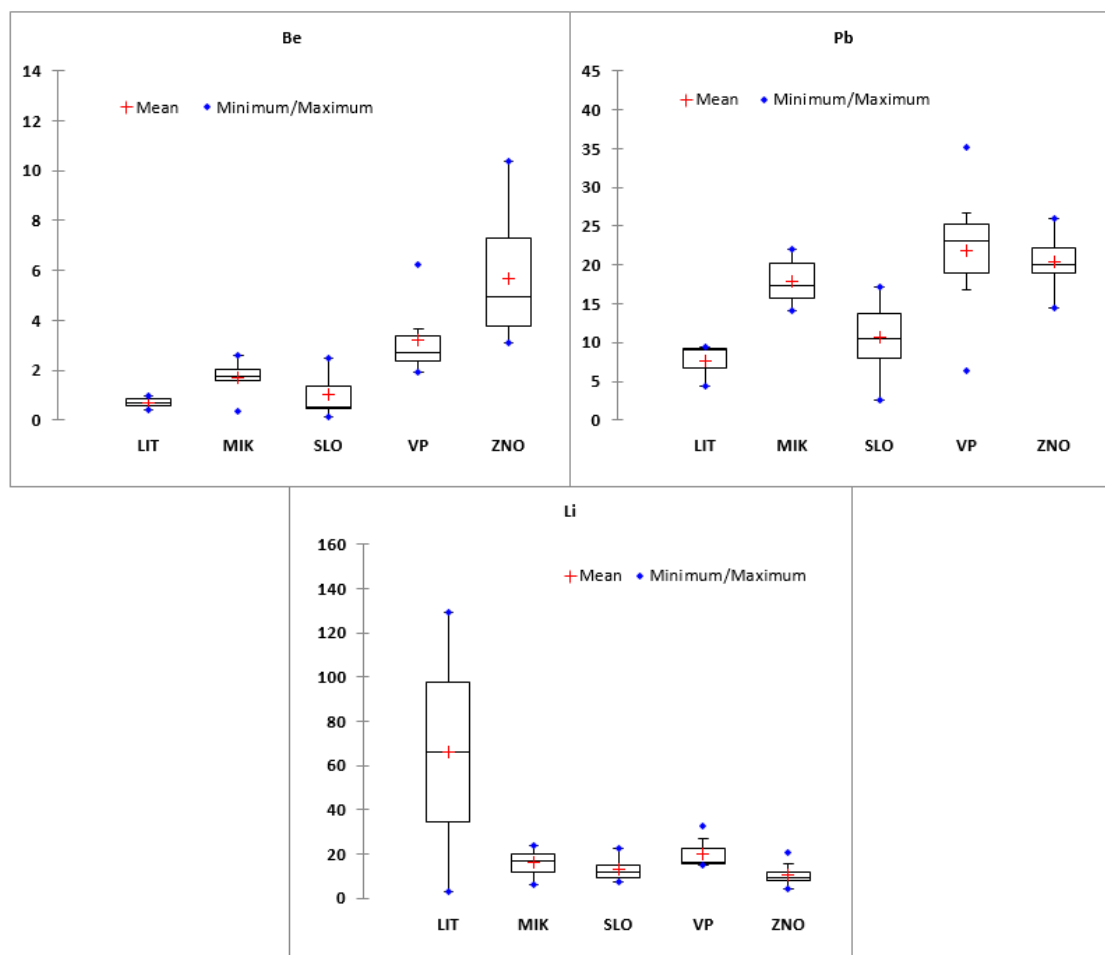
(z toho 10 na Moravě). Současné dělení dle zákona 321/2004 Sb. na oblast Čechy a Morava a 6 podoblastí není pro klasifikaci optimální. Vzorky uvedené v tabulce 10 byly vyřazeny z dalších analýz a nebyly tak součástí diskriminačního a klasifikačního modelu geografického původu moravských bílých vín.

5.3.1.2. *Analýza rozptylu (ANOVA)*

Analýzou rozptylu parametrů naměřených ve vzorcích 43 bílých vín bylo prokázáno, že celkem 16 parametrů (21,5% z výchozího počtu) vykazovalo statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými podoblastmi (P blízké nebo $< 0,05$ a $F > F_{crit}$; $F_{crit} = 1,91$). Tyto vybrané parametry jsou uvedeny v tabulce 31 a seřazeny podle statistické významnosti. ANOVA byla nastavena na interval spolehlivosti 95%. Grafické zobrazení rozptylů dat je přehledně prezentováno na níže uvedených krabicových grafech.

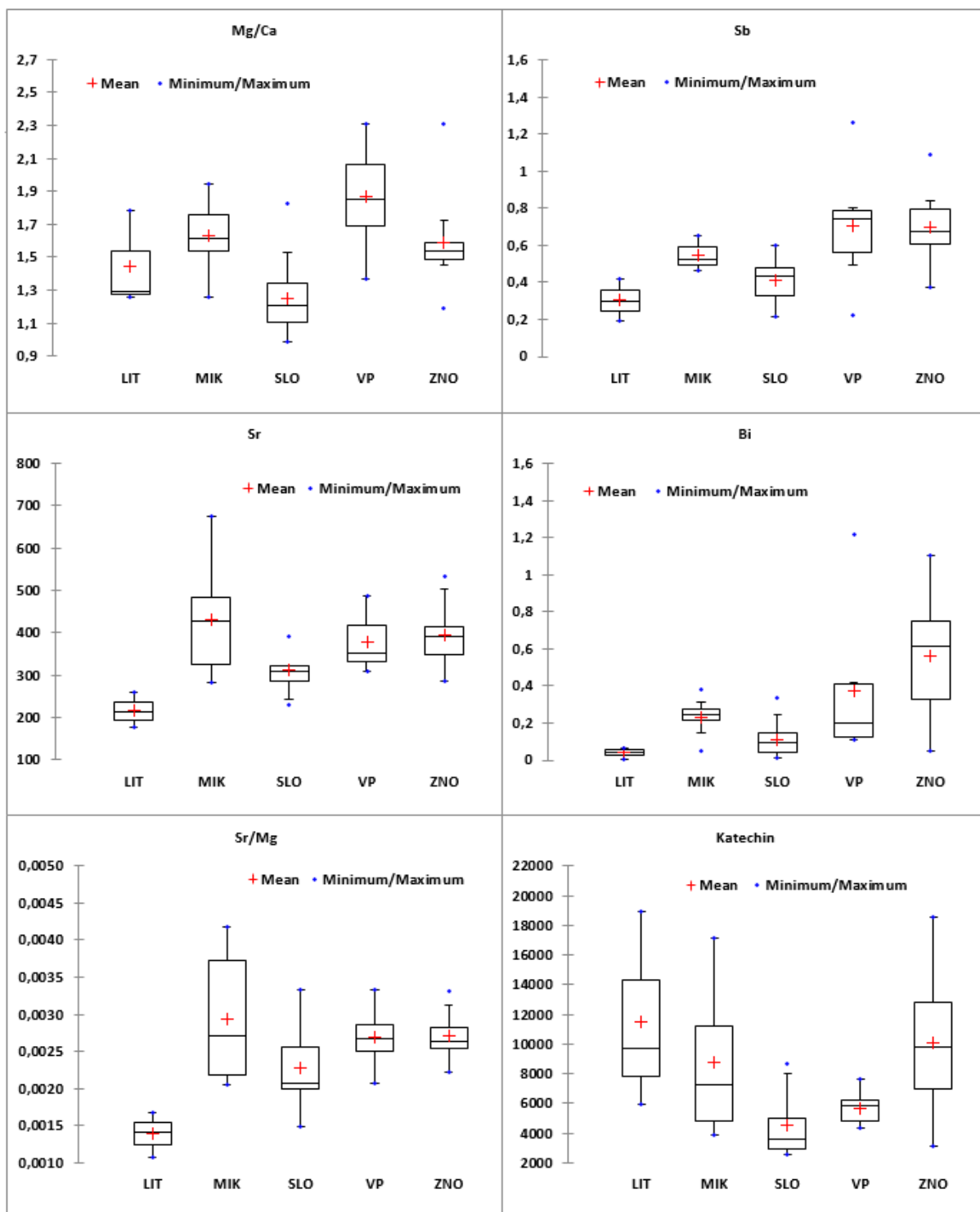
Tabulka 31: *Chemické parametry vína vyselektované pomocí ANOVA v rámci klasifikace bílých vín dle geografického původu*

Parametr	F	P
Be	18,8779	< 0,0001
Pb	12,2478	< 0,0001
Li	8,3837	< 0,0001
Mg/Ca	7,6697	0,0001
Sb	6,7129	0,0003
Bi	6,2939	0,0005
Sr	5,9344	0,0008
Sr/Mg	5,7862	0,0010
Katechin	5,3238	0,0017
Na	4,8768	0,0028
Mg	4,6328	0,0038
Kyselina Kávová	4,0623	0,0077
Mo	3,8837	0,0097
V	3,5278	0,0152
Kyselina Kumarová	2,8828	0,0353
Gd	2,1771	0,0901



Obr. 30: Krabicové grafy pro Be, Pb a Li, jednotky v µg/l

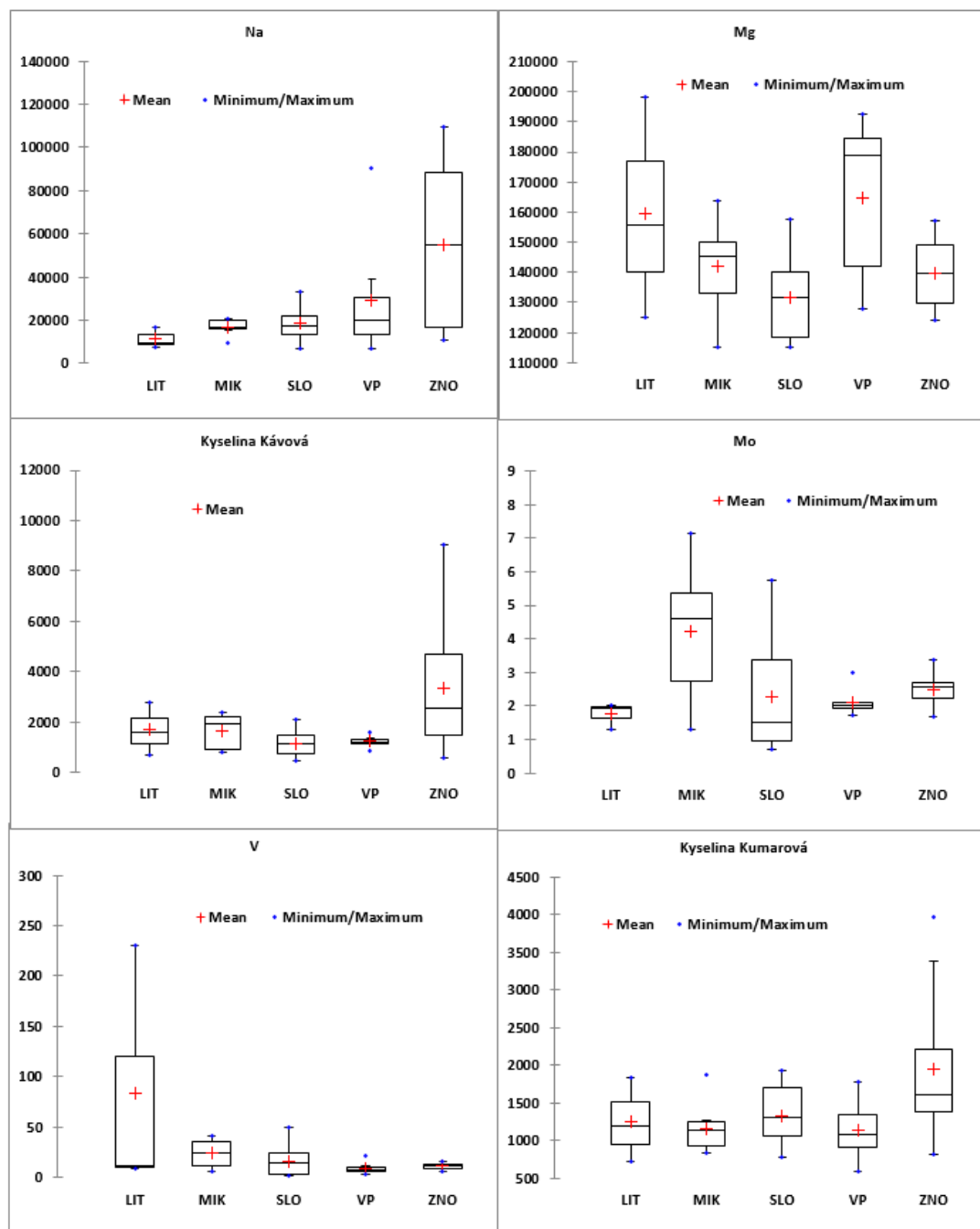
Beryllium, olovo a lithium vykazovaly nejvýznamnější rozdíly mezi podoblastmi ($P < 0,0001$). Výsledky vykazovaly podobnou variabilitu jednotlivých skupin, jen v případě rozptylu výsledků vín z litoměřické podoblasti byla stanovena výraznější variabilita. To je pravděpodobně způsobeno velmi malým počtem vzorků z této lokality. Litoměřická vína byla do testování zařazena z důvodů orientačního porovnání moravské a české vinařské oblasti. Výzkum z této oblasti již dříve potvrdil, že lithium je velmi vhodný diskriminační prvek pro diferenciaci vín dle geografického původu (Coetzee a kol. 2005; Pérez-Trujillo a kol. 2003; Suhaj a Korenovská 2005). Také olovo, přirozeně se vyskytující v horninách a půdách, je významným diskriminačním parametrem, jelikož se jedná o produkt řetězu rozkladu radioaktivních prvků v horninách, které se liší v závislosti na lokalitě (Michlovský 2014).



Obr. 31: Krabicové grafy pro Mg/Ca, Sb, Sr, Bi, Sr/Mg, Katechin. Všechny koncentrace jsou uvedeny v $\mu\text{g/l}$, kromě poměrů, které nemají rozměr

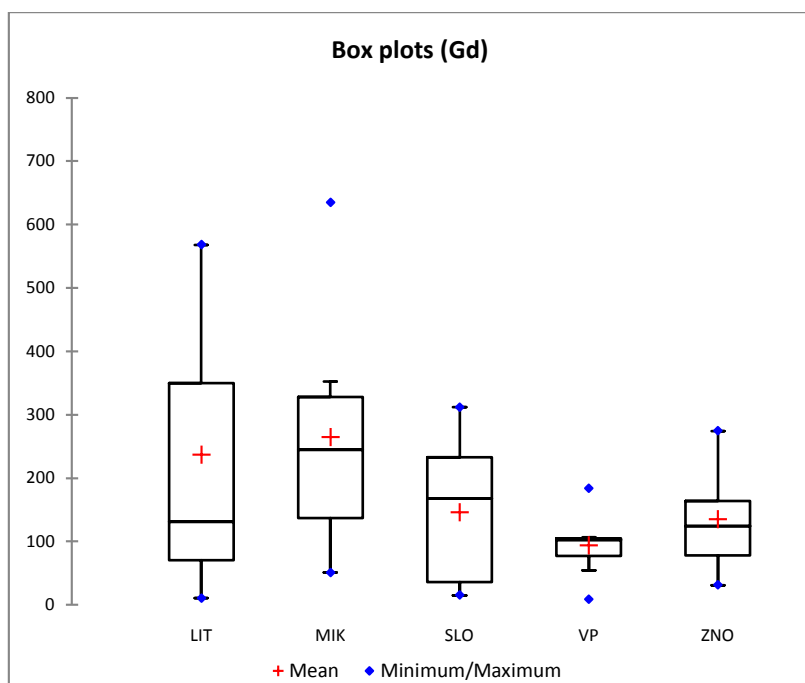
Parametry Mg/Ca, Sb, Bi, Sr, Sr/Mg a katechin patřily do skupiny statisticky velmi významných parametrů s $P < 0,002$ a $F > 5$. Největší variabilitu výsledků z této skupiny vykazovala koncentrace katechinu. Tento fakt lze s největší pravděpodobností přisoudit tomu, že se jedná o fenolickou sloučeninu, jejíž produkce je výrazněji ovlivněna typem odrůdy než charakteristikou lokality a jelikož je model založen na vínech rozdílných odrůd, dají se větší

rozptyly výsledků očekávat. Předchozí výzkum potvrdil, že stroncium je velmi často vyživaný parametr pro diferenciaci vín dle geografického původu, což se potvrdilo i v této práci ($P = 0,0008$, $F = 5,78$). Dále je stroncium vhodným parametrem v poměru s hořčíkem. Je to dané pravděpodobně tím, že stroncium je zachycováno kořenovým systémem společně s rozpustnými živinami, snadno dostupnými révě (Marchionni a kol. 2013; Martin a kol. 2012; Días a kol. 2003, Frías 2003; Castineira a kol. 2004; Pérez-Trujillo a kol, 2011; Angus a kol. 2006).



Obr. 32: Krabicové grafy pro Na, Mg, kyselinu kávovou, Mo, V a kyselinu kumarovou, Katechin. Všechny koncentrace jsou uvedeny v µg/l

Další skupinou parametrů, které dle ANOVA vykazovaly v průměru koncentrací statisticky významné rozdíly mezi podoblastmi, byly proměnné Na, Mg, kyselina kávoová, Mo, V a kyselina kumarová. Úroveň významnosti těchto parametrů stále dosahovala pod prahovou kritickou hodnotu $P < 0,05$ a hodnota významnosti F byla v této skupině $>2,8$. Do této skupiny byly analýzou rozptylu zařazeny dva významné makroprvky, Na a Mg, které byly v rámci 16 vybraných parametrů ve víně přítomné v průměru v nejvyšších koncentracích. Hořčík je jedním z nejčastěji citovaných prvků používaných jako parametr pro stanovení autenticity vín, převážně pro autentifikaci geografického původu a to pravděpodobně díky jeho značné mobilitě půda – rostlina. (Greenough et al. 1997; Marengo a Aceto 2003; Šperková a Suchánek 2005; Thiel a kol. 2004). Dle výsledků je patrné, že nejvyšší průměrnou koncentraci Mg mají vína z velkopavlovické podoblasti. Tato podoblast je známá vyšším obsahem tohoto prvku v půdách, což se projevilo i na měřených vzorcích. Podobný obsah hořčíku také vykazovaly vína z litoměřické podoblasti. Co se týče obsahu sodíku, nejvyšší průměrné koncentrace sodíku byly stanoveny u vín ze znojemské podoblasti, naopak nejméně sodíku v průměru obsahovala vína z litoměřické podoblasti.



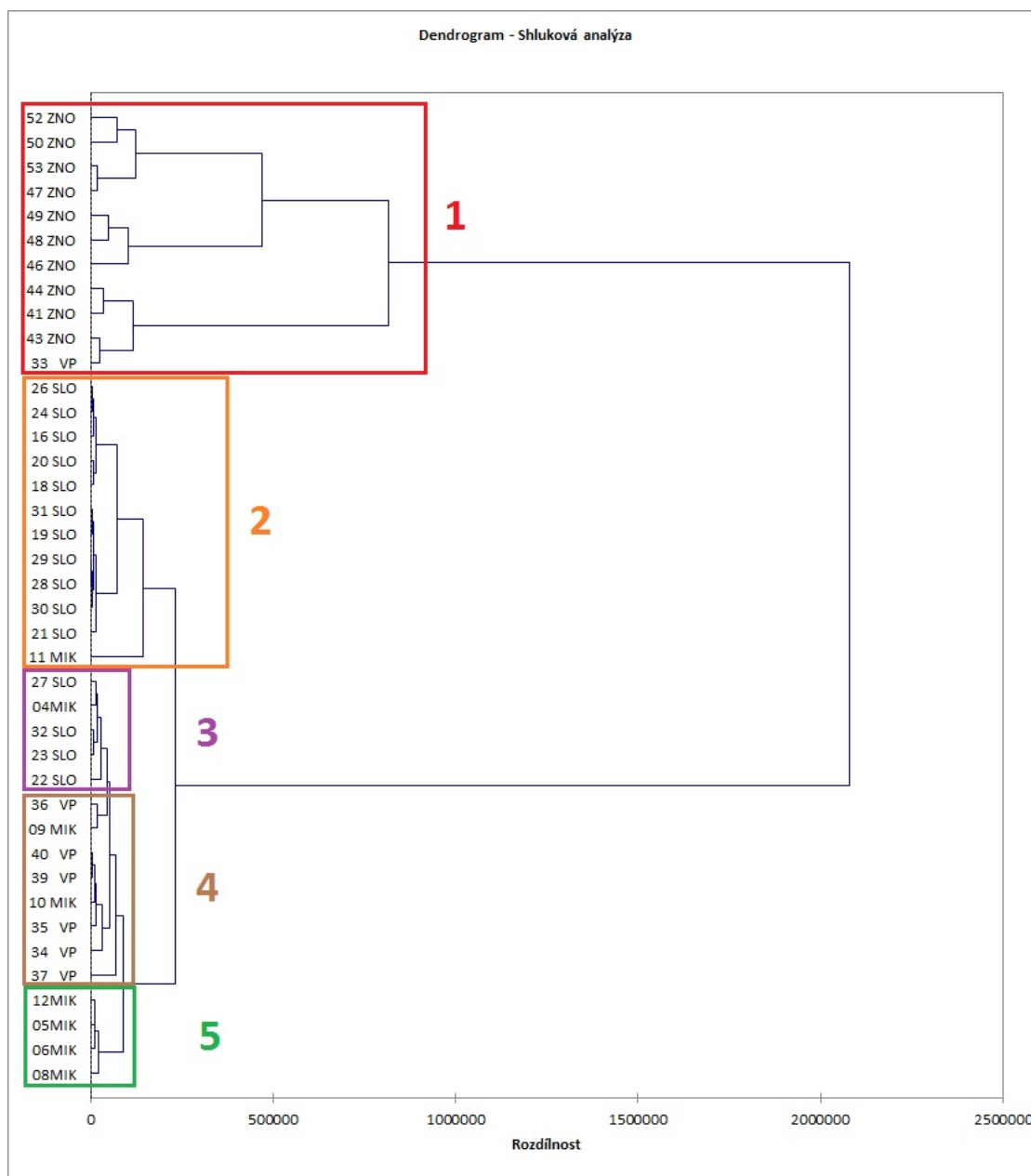
Obr. 33: Krabicový graf obsahu Gd v ng/l

Předchozí výzkum naznačil, že prvky vzácných zemin jsou možným rozlišovacím parametrem chemického složení vína vhodným ke klasifikaci vín dle geografického původu. Tento předpoklad se však nepotvrdil v případě testovaným bílých vín. Pouze parametr Gd byl

na hranici statistické významnosti pro rozdělení vín dle podoblastí ($P = 0,09$ a $F = 2,2$) a byl zařazen do modelu.

5.3.1.3. Shluková analýza

V této kapitole jsou shrnuty výsledky shlukové analýzy 40 vzorků bílých vín ze 4 moravských podoblastí. Vstupní data do analýzy byla založena na proměnných vybraných analýzou rozptylu. Jako slučovací technika byla zvolena Wardova metoda a jako metrická metoda čtvercových Euklidovských vzdáleností. Primárním výstupem je dendrogram (obr. 34), který vizuálně zobrazuje podobnosti a rozdílnosti mezi jednotlivými vzorky.



Obr. 34: Dendrogram shlukové analýzy vzorků bílých vín

Z dendrogramu shlukové analýzy jsou na první pohled patrné dva základní shluky (klastry) spojující se na úrovni rozdílnosti 2100000. Izolovaný **klastr 1** sdružuje všechny testované vína ze znojemské podoblasti, které se dle hodnoty rozdílnosti výrazně liší od zbytku testovaných vzorků. To vytváří předpoklad, že znojemská vína mají v rámci moravských vín velmi specifické chemické složení. Do tohoto klastru byl také zařazen jeden vzorek vína z velkopavlovické podoblasti a to konkrétně vzorek 33. Komerční vzorek 33 odrůdy Muller Thurgau byl opatřen pouze označením podoblasti, konkrétní popis vinařské obce nebyl znám. Toto víno pravděpodobně pocházelo z hraniční oblasti mezi VP a ZNO podoblastí.

Další velký izolovaný shluk tvořila vína ze slovácké podoblasti (**klastr 2**), který se spojuje na úrovni rozdílnosti 232000 s dalšími 3 menšími shluky. Klastr dva zahrnuje celkem 11 slováckých vín, tzn. 73% vzorků z této podoblasti. Vzdáleně je do tohoto klastru přidružen jeden vzorek z mikulovské podoblasti (vzorek 11). Jedná se o směs odrůd Sylvánské zelené, Sauvignon a Veltlínské zelené. Cuveé nebylo míchané z hroznů z jedné lokality mikulovské podoblasti, což se podepsalo na klasifikaci shlukovou analýzou, nicméně další nejpodobnější skupinou vzorků jsou právě vína mikulovské podoblasti v **klastru 5**.

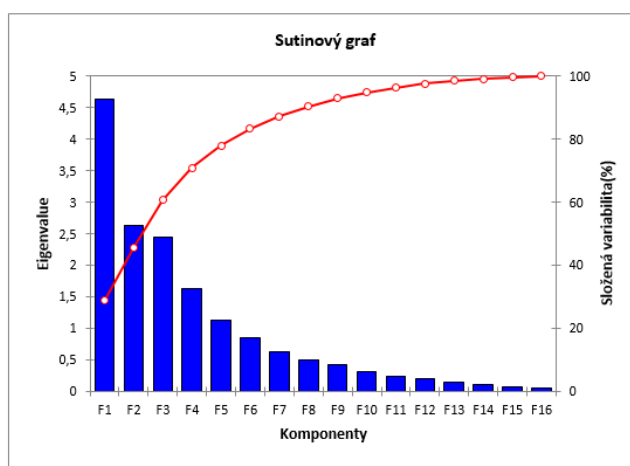
Kromě těchto velkých shluků se zbytek vzorků spojoval v třetí velké skupině, rozdělené na 3 menší shluky (**klastry 3, 4 a 5**). Do **klastru 3** se seskupil zbytek vzorků ze slovácké podoblasti. Tři ze čtyř slováckých vín této skupě nemělo na etiketě uvedenou přesnou vinařskou obec a viniční trať. Testování shlukovou analýzou odhalilo malou odchylku těchto vzorků od hlavního shluku slováckých vín, dalšími analýzami (diskriminační analýza) byla tato vína korektně klasifikována do této podoblasti, což je patrně způsobeno výrobním procesem těchto konkrétních komerčních odrůdových vín, pravděpodobně vyrobených z hroznů ze slovácké podoblasti, ale ze souboru různých vinařských obcí. **Klastry 4 a 5** zahrnovaly vzorky vín z velkopavlovické a mikulovské podoblasti. Na dendrogramu je viditelné, že vína z velkopavlovické podoblasti vykazují jisté podobnosti jak s víny z oblasti slovácké, tak i mikulovské. Stejný vzor lze vyčíst pohledem na geografickou mapu moravských vinařských podoblastí. Velkopavlovická podoblast je sevřená mezi mikulovskou a slováckou podoblastí a je možné, že tato vína mohou sdílet určité společné znaky. Pokud dojde k prolínání podobných znaků tak jako v tomto případě, je pravděpodobné, že techniky jako je shluková analýza, které nevyužívají diskriminátory, mohou klasifikovat jednotlivá pozorování s menší přesností. Nicméně, již na základě tohoto preliminárního testování ale lze usuzovat, že klasifikace do jednotlivých podoblastí je možná.

5.3.1.4. Analýza hlavních komponent – PCA

Analýza hlavních komponent moravských bílých vín sloužila k vizualizaci a vyhodnocení informací z 16 proměnných vybraných analýzou rozptylu jako parametry statisticky významné pro rozdělování do skupin dle moravských vinařských podoblastí. Informace z vybraných 16 parametrů byly pomocí PCA (metoda Pearsonovy korelace) rozděleny do 16 hlavních komponent. Míra uložené variability v jednotlivých komponentech byla popsána hodnotou eigenvalue. Čím vyšší je eigenvalue dané komponenty, tím větší je množství informací v této komponentě uloženo. Dle Kaiserova kritéria byly dále vyřazeny všechny komponenty s eigenvalue < 1, kdy množství informací uložené v takové komponentě odpovídá informaci parametru výchozího, nebo je menší. V tomto případě bylo na základě Kaiserova kritéria stanoveno **5 hlavních komponent** popisujících dohromady 77,96% celkové variability (viz tabulka 32 a obr. 35).

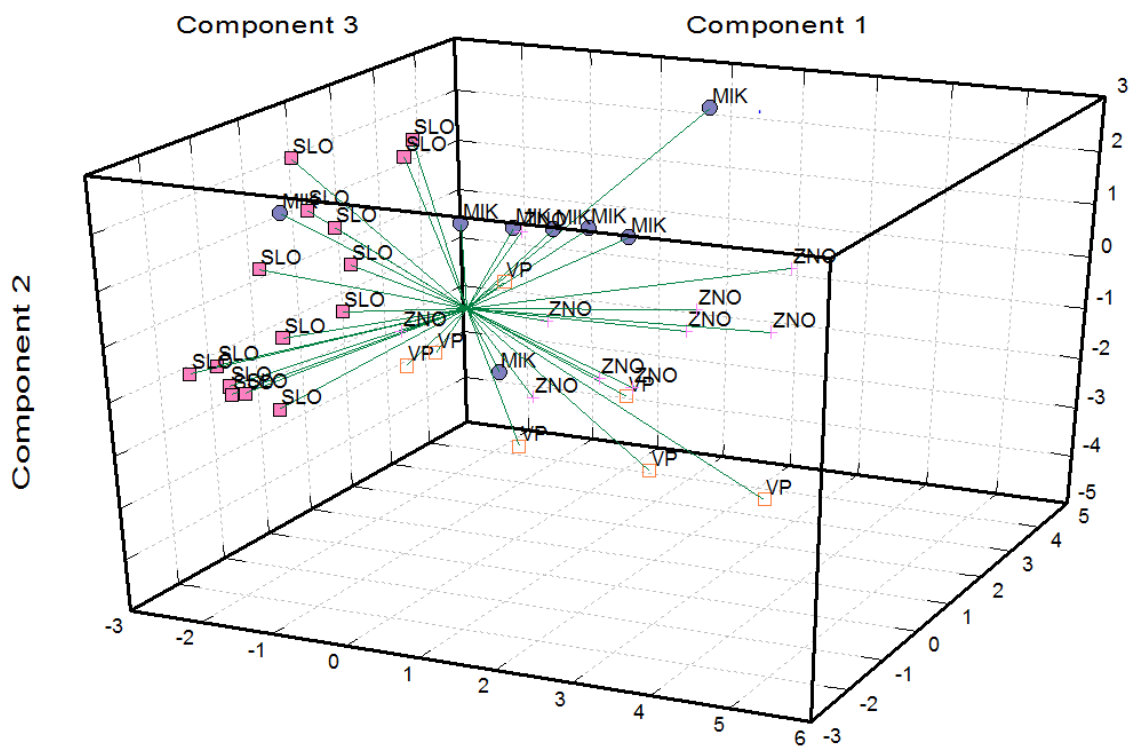
Tabulka 32: Souhrn hlavních komponent – bílá vína

Komponent	Eigenvalue	Variabilita	Souhrnná %
F1	4,64	28,99	28,99
F2	2,63	16,44	45,43
F3	2,45	15,32	60,75
F4	1,62	10,15	70,90
F5	1,13	7,06	77,96
F6	0,86	5,36	83,32
F7	0,63	3,91	87,24
F8	0,50	3,10	90,33
F9	0,41	2,59	92,92
F10	0,31	1,97	94,89
F11	0,24	1,47	96,36
F12	0,21	1,31	97,66
F13	0,14	0,87	98,53
F14	0,11	0,68	99,21
F15	0,07	0,44	99,65
F16	0,06	0,35	100,00

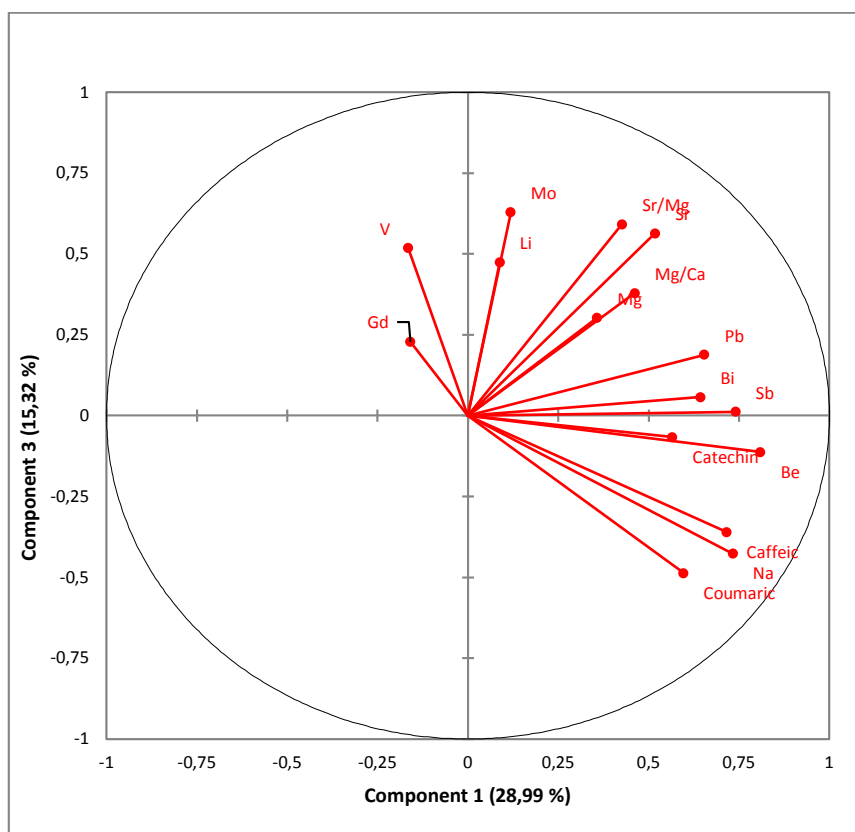


Obr. 35: Sutinový graf demonstrující význam jednotlivých hlavních komponent

Na základě hlavních komponent byly sestaveny grafy (obrázky 36, 37 a 38) zobrazující jednotlivé projekce do faktorového prostoru a faktorových rovin.

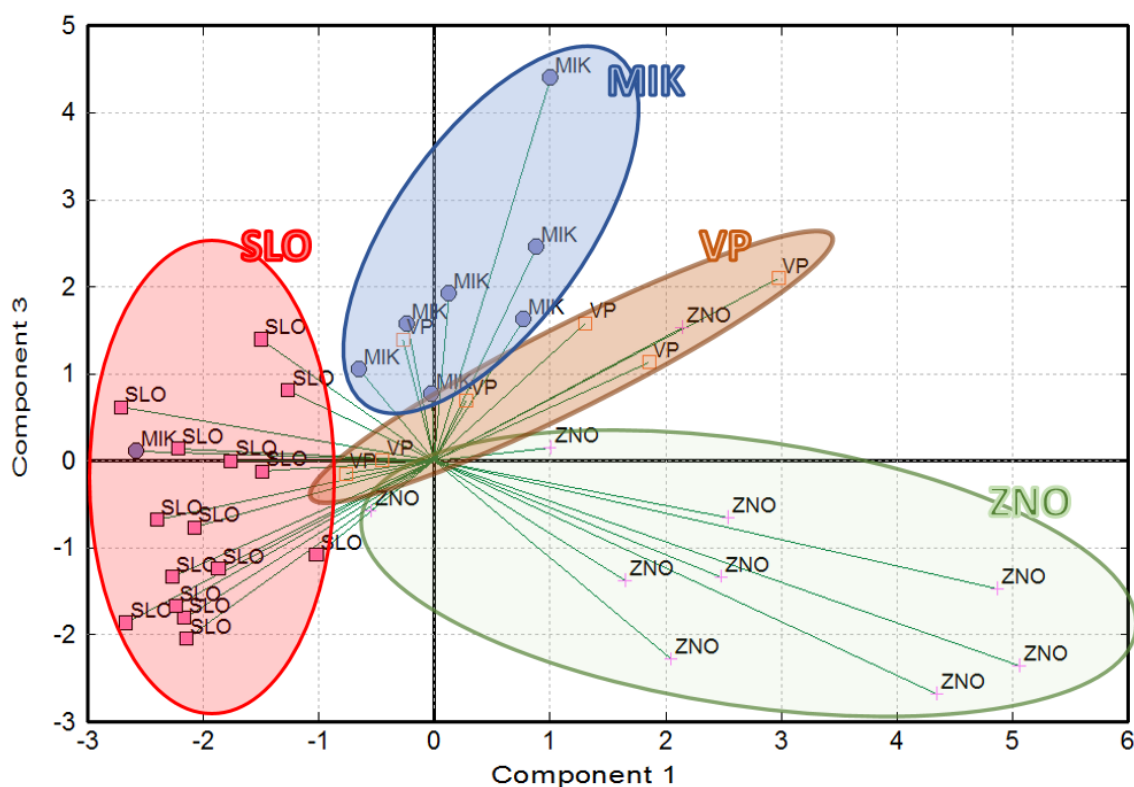


Obr. 36: Projekce vzorků vín do faktorového prostoru hlavních komponent 1, 2, 3



Obr. 37: Rozptylový graf - Projekce proměnných do faktorové roviny hlavních komponent 1 a 3

Projekcí vzorků vín do faktorového 3D grafu (obrázek 36) bylo zjištěno, že nejlepší rozlišovací schopnost pro jednotlivé podoblasti, při projekci do 2D faktorové roviny, poskytují komponenty 1 a 3. Komponenty 1 a 3 vysvětlují 44% celkové variability. Hlavní komponenty byly pozitivně nebo negativně korelovány výchozími proměnnými (chemické složení). Tyto vlivy jsou graficky zobrazeny v rozptylovém grafu 37. **Komponenta 1** byla značně pozitivně korelována parametry koncentrací Be, Sb, Pb, Bi, kyseliny kávové a Na. Naopak negativně byla korelována koncentrací V a Gd. **Komponenta 3** byla nejvíce ovlivněna koncentrací Mo, V, Sr a poměrem Sr/Mg. Negativně pak obsahem Na, kyseliny kumarové a kávové. Jednotlivé proměnné dále korelovaly více či méně mezi sebou. Dle předpokladu diskutovaného v kapitole o analýze rozptylu bílých vín spolu vzájemně souvisely proměnné Mg, Sr, Mg/Ca a Sr/Mg. Další silnou korelaci bylo možné pozorovat mezi prvky Pb, Bi a Sb. Je to dané tím, že bismut a antimon patří mezi chalkofilní prvky tvořící sulfidy, jejichž výskyt je geochemicky úzce spojený s výskytem olova, zinku a mědi (Li a Thornton 1993). Další korelaci mezi proměnnými byla patrná v případě kyseliny kávové a kumarové. Tato spojitost je pravděpodobně dána velice podobnou chemickou strukturou těchto dvou látek, respektive podobným mechanismem syntézy těchto látek v révě.



Obr. 38: Projekce vzorků bílých vín do faktorové roviny hlavních komponent 1 a 3

Na obrázku 38 je graficky znázorněna disperze jednotlivých pozorování (vzorků vín) do faktorové roviny komponent 1 a 3. Je patrné, že na základě této analýzy došlo k oddělení jednotlivých vzorků vín do 4 zón. Skóre vín ze znojemské podoblasti se pohybovaly ve 4 kvadrantu s pozitivním skóre u první komponenty a negativním u komponenty 3. Při porovnání s rozptylovým grafem se dá usuzovat, že tato vína obsahují v průměru vyšší koncentrace sodíku, beryllia a fenolických látek. Naopak obsahují menší množství hořčíku, stroncia, lithia, molybdenu, vanadu a gadolinia. U vín z velkopavlovické podoblasti se potvrdilo, že obsahují v průměru vyšší koncentrace stroncia a hořčíku. Projekce PCA skóre těchto vín do faktorové roviny odpovídala oblasti rozptylového grafu, kde parametry Mg a Sr daným způsobem korelovaly s hlavními komponenty 1 a 3. Podobně jako u shlukové analýzy vykazovala velkopavlovická vína určitě přechodové znaky mezi všemi podoblastmi, což je dáno geografickou polohou. Vína ze slovácké podoblasti se profilovala tím, že dle PCA obsahovaly v průměru nižší koncentrace všech vybraných chemických konstituentů. Tento fenomén je viditelný i z krabicových grafů v kapitole analýza rozptylu. Mikulovská vína byla charakteristická vyšším obsahem gadolinia, vanadu a spíše menším obsahem stanovovaných fenolických sloučenin.

Rozdělení moravských bílých vín dle geografického původu bylo pomocí analýzy hlavních komponent úspěšné. Dá se očekávat, že se vzrůstajícím počtem vzorků by také vzrůstala přesnost klasifikace. Tato analýza poskytla přesnější klasifikaci než shluková analýza, kde vzorky byly místo do 4 skupin klasifikovány do 5 skupin, s občasným zařazením vzorků do nesprávné kategorie.

5.3.1.5. Kanonická diskriminační analýza - DA

Kanonickou diskriminační analýzou byly rozdělovány a klasifikovány vzorky bílých vín dle geografického původu, kdy klasifikačním diskriminátorem byly jednotlivé vinařské podoblasti. Na rozdíl od shlukové analýzy a analýzy hlavních komponent tato parametrická metoda využívá znalosti o počtu skupin a příslušnosti vzorků k maximalizaci rozdílnosti mezi vinařskými podoblastmi a minimalizaci rozdílností vín patřících do stejné kategorie. Byly vymodelovány diskriminační a klasifikační funkce pro jednotlivé podoblasti. Pro orientační zhodnocení rozdílů mezi moravskou a českou vinařskou oblastí byla provedena doplňující diskriminační analýza zahrnující vybraná česká vína.

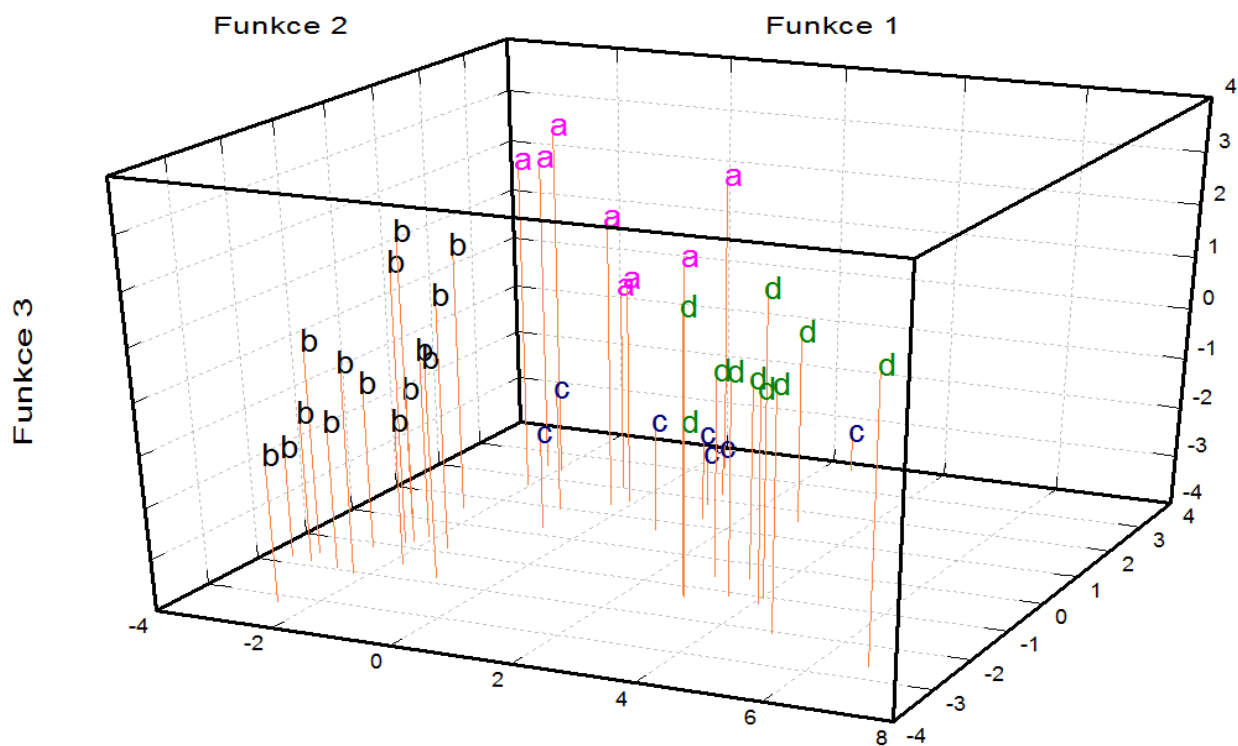
Vstupní parametry byly do DA vybrány na základě analýzy rozptylu. Sekundární třídění proměnných dle významu pro přesnost klasifikace bylo prováděno pomocí kritéria Wilksovy

lambdy (Tabulka 33). Čím blíže je lambda hodnotě 0, tím významnější vliv má proměnná na klasifikaci. Krokovou dopřednou selekcí byly postupně přidávány do modelu proměnné na základě hodnoty lambda do té doby, dokud rostla přesnost modelu, respektive efektivita rozdělení podoblastí. Nakonec byly do modelu zařazeny všechny proměnné vyselektované analýzou rozptylu. Byly vypočítány tři statisticky významné diskriminační funkce popisující vnitřní propojení mezi proměnnými a vzorky, kde Be bylo nejvýznamnější korelační proměnnou pro funkci 1, Mg/Ca pro funkci 2 a Mo pro funkci 3.

Tabulka 33: *diskriminační funkce a Wilksovy lambdy jednotlivých proměnných*

Proměnná	Funkce 1	Funkce 2	Funkce 3	W. Lambda
Li	-0,1373	0,5079	-0,3743	0,7082
Be	0,8593	-0,0829	-0,0354	0,3517
Sb	0,5776	0,2535	-0,1922	0,6398
Pb	0,6260	0,4608	-0,1648	0,4877
Bi	0,6484	0,0333	-0,0346	0,6327
V	-0,2576	0,1661	0,3782	0,8324
Mg	0,2211	0,4686	-0,4773	0,6548
Sr	0,3184	0,4437	0,2438	0,7314
Na	0,7495	-0,3587	0,1966	0,3934
Kys. Kávová	0,6061	-0,1851	0,2712	0,6093
Kys. Kumarová	0,5018	-0,3794	0,1939	0,6527
Sr/Mg	0,2564	0,4050	0,1734	0,8047
Mg/Ca	0,4362	0,5916	-0,2574	0,5385
Gd	-0,1337	0,2694	0,4869	0,7829
Mo	-0,0518	0,3868	0,5215	0,7182
Katechin	0,5158	0,1647	0,3998	0,6484

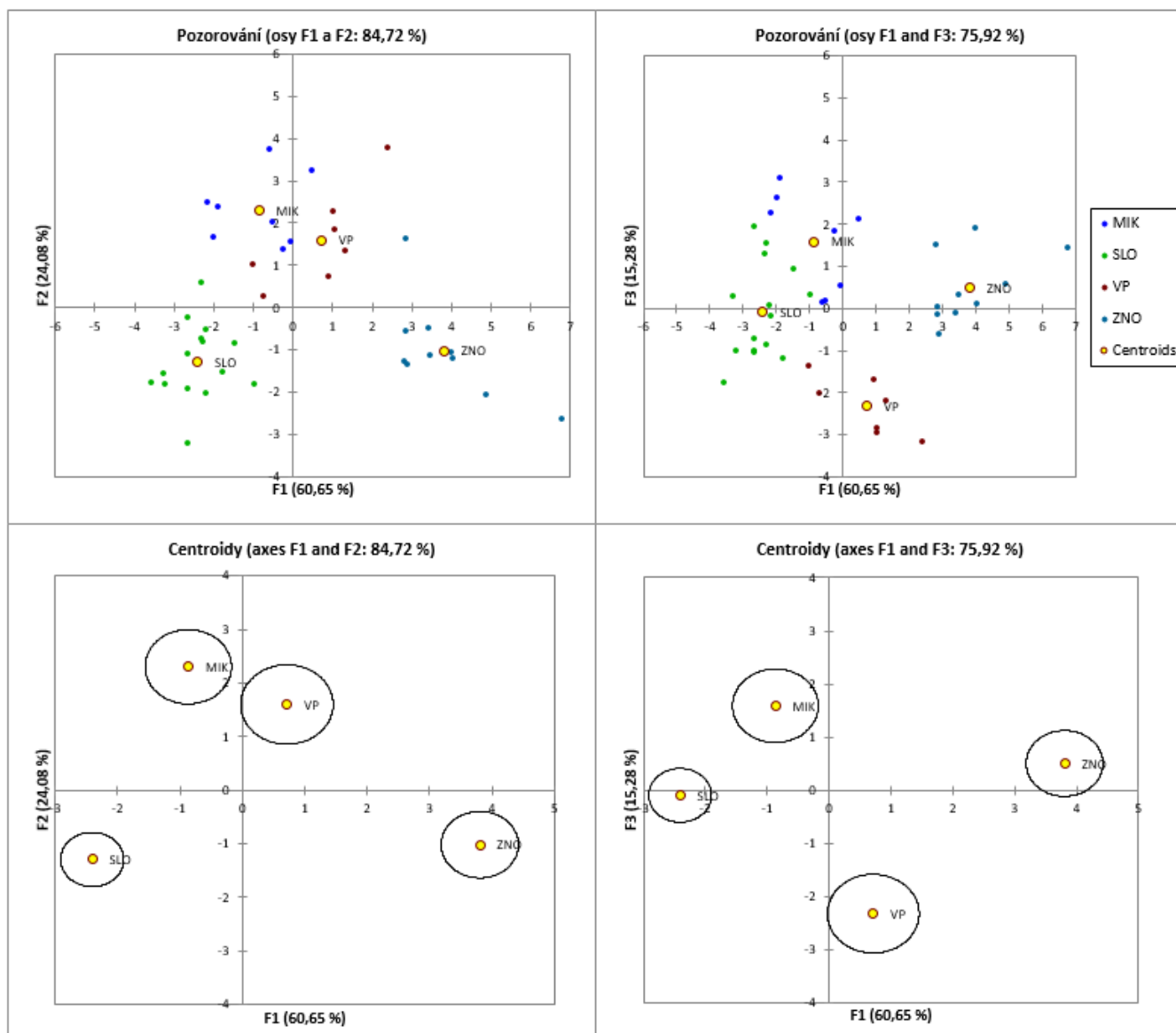
Rozptylové grafy (viz obr. 39 a 40) vizualizují rozdělení vzorků do jednotlivých skupin. Dle centroidů a kružnic spolehlivosti (spodní část obrázku 40) je patrné úplné rozdělení moravských podoblastí. Znojemská podoblast, podobně jako u shlukové analýzy a analýzy hlavních komponent, tvoří izolovanou skupinu výrazně vzdálenou od ostatních grup. Zbylé tři podoblasti jsou si blíže, ale stále dostatečně mezi sebou rozlišené se vzdáleností centroidů > 4 (viz tabulka 34). Největší vzdálenost mezi centroidy jednotlivých podoblastí byla stanovena mezi podoblastmi slováckou a znojemskou (6,2838). Tyto dvě podoblasti tak nejsou vzdáleny pouze geograficky, výrazně se také liší i chemickým složením vín. Nejblíže si byly centroidy podoblastí mikulovské a slovácké a mikulovské a velkopavlovické. Tím se potvrdily výsledky přechozích analýz, kdy vína z těchto geograficky si bližších podoblastí vykazovaly určité vzájemné podobnosti v chemickém složení.



Obr. 39: 3D rozptylový graf klasifikačních funkcí (a – MIK, b – SLO, c – VP, d – ZNO)

Tabulka 34: Vzdálenosti mezi centroidy v rámci jednotlivých podoblastí

Centroidy	Vzdálenost mezi centroidy
MIK-SLO	4,2616
MIK-VP	4,3689
SLO-VP	4,8578
VP-ZNO	4,9394
MIK-ZNO	5,8925
SLO-ZNO	6,2838



Obr. 40: Rozptylový graf klasifikačních funkcí včetně zobrazení centroidů a vzorků

Primárním výstupem diskriminační analýzy jsou vytvořené klasifikační a predikční funkce (tabulka 35) matematicky popisující jednotlivé podoblasti. Tyto funkce dále slouží ke klasifikaci vzorků s neznámým původem, kdy na základě dosažení změřených vyselektovaných proměnných lze s určitou pravděpodobností zařadit vzorek do jedné ze 4 podoblastí, nebo konstatovat, nebo že daný vzorek pochází či nepochází z moravské vinařské oblasti. Samotná diskriminace a klasifikace vín byla založena na Mahalanobisových čtvercových vzdálenostech pozorování od centroidů a posteriorních pravděpodobnostech pro každý vzorek a každou skupinu. Vína jsou tak rozdělována do podoblastí na základě výpočtu vzdáleností od modelových centroidů z klasifikačních funkcí. Stanovené klasifikační funkce umožnily rozdělení **známých** vzorků vín dle podoblastí s 100% úspěšností (Tabulka 36).

Tabulka 35: *Predikční klasifikační funkce pro bílá vína*

	MIK	SLO	VP	ZNO
Intercept	-141,27	-99,90	-144,39	-156,50
Li	-1,7222	-1,3029	-0,9139	-1,5561
Be	-2,0177	-0,8221	2,4528	2,7507
Sb	-23,21	-30,83	-46,97	-59,41
Pb	1,8635	1,3296	2,1403	2,5777
Bi	-4,362	-6,435	-18,880	-10,26
V	0,3734	0,4054	0,2836	0,3377
Mg	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009
Sr	-0,0571	-0,0828	-0,1175	-0,1258
Na	0,0004	0,0004	0,0004	0,0007
Kys. Kávová	-0,0059	-0,0057	-0,0046	-0,0088
Kys. Kumarová	0,0146	0,0147	0,0129	0,0236
Sr/Mg	20555	21769	28226	28087
Mg/Ca	37,396	23,650	39,167	39,569
Gd	0,1055	0,0823	0,0846	0,0924
Mo	1,2845	-0,5208	-0,8424	-0,6292
Katechin	0,0011	0,0007	0,0006	0,0014

Tabulka 36: *Klasifikační matice modelu pro bílá vína*

	MIK	SLO	VP	ZNO	Celkem	Správnost zařazení %
MIK	8	0	0	0	8	100,00%
SLO	0	15	0	0	15	100,00%
VP	0	0	7	0	7	100,00%
ZNO	0	0	0	10	10	100,00%
Celkem	8	15	7	10	40	100,00%

Pro ověření správnosti klasifikačního modelu bylo třeba provést křížovou validaci. Jedná se o testování vyřazením vždy jednoho konkrétního vzorku z modelu. Predikční schopnosti jsou po té ověřeny na nově sestaveném modelu, podle kterého je konkrétní vyřazený vzorek klasifikován. Výsledkem této validace bylo 100% zařazení znojenských a slováckých vín. Vína z mikulovské podoblasti byla křížovou validací zařazena správně v 87,5% případů. Velkopavlovická na tom byla, co se týče predikce nejhůře - 71,4% správně zařazených vzorků. Snižující se predikční schopnost modelu při této validaci je způsobena malým počtem vzorků z těchto dvou podoblastí. Křížovou validací se vždy z modelu vyřadí jeden vzorek, což v případě mikulovské podoblasti tvoří úbytek 12,5% vstupních dat a v případě velkopavlovické podoblasti dokonce 14,3%, což výrazně narušuje integritu modelu. Je jasné, že s rostoucím počtem vstupních dat roste i přesnost modelu. V absolutním počtu vín se však je jedná o celkem tři špatně zařazená vína. Kombinovaná predikční úspěšnost je 95%.

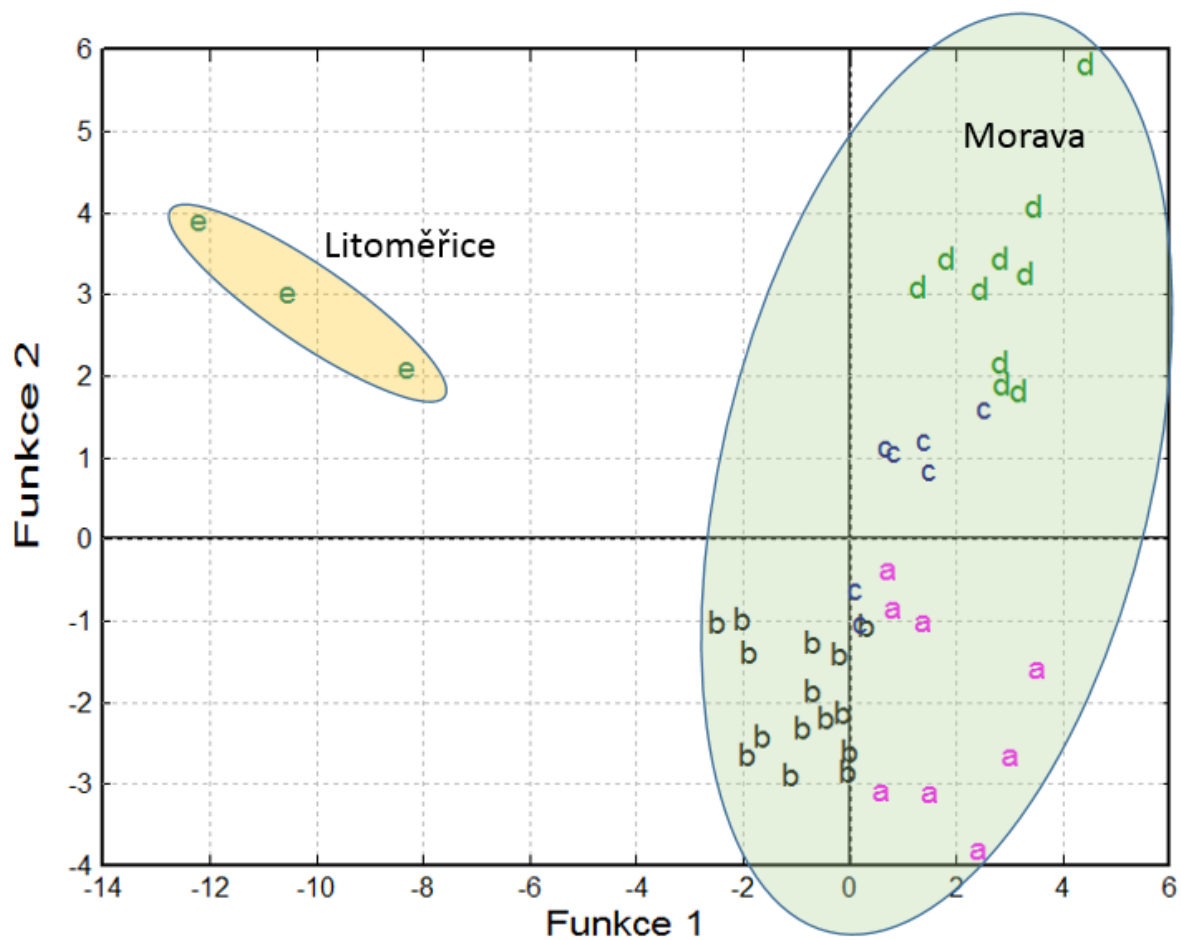
Tabulka 37: *Matice křížové validace modelu pro bílá vína*

	MIK	SLO	VP	ZNO	Celkem	Správnost zařazení %
MIK	7	0	1	0	8	87,50%
SLO	0	15	0	0	15	100,00%
VP	2	0	5	0	7	71,40%
ZNO	0	0	0	10	10	100,00%
Celkem	9	15	6	10	40	95,00%

Diskriminační analýza je jednou z nejčastěji využívaných metod pro stanovení autenticity geografického původu bílých vín. Frías a kol. (2003) využili lineární diskriminační analýzu k diferenciaci vín z Kanárských ostrovů na založenou na prvkovém profilu. Dosáhli 100% klasifikační a 95,6% predikční úspěšnosti, tedy úspěšnosti na podobné úrovni jako zde předkládaný systém. Podobné výsledky publikovali Baxter a kol. (1997), kdy na základě prvkové analýzy 112 španělských a anglických vín dosáhli modelováním pomocí DA kombinované úspěšnosti klasifikace 93 %.

Vytvoření dokonale fungujícího diskriminačního modelu pro určení geografického původu moravských vín bude do budoucna vyžadovat rozšíření databanky vzorků, hlavně z mikulovské a velkopavlovické podoblasti. Výsledky naznačily, že vliv rozdílných odrůd lze jednotlivými statistickými analýzami odfiltrovat. Podobně tak i vliv odlišných ročníků vína. Pro 100% jistotu je nutné model pravidelně aktualizovat novými vzorky a testovat jeho klasifikační a predikční efektivitu.

Pro demonstraci rozdílů ve složení moravských a českých vín byla zpracována diskriminační analýza rozšířená o 3 vzorky bílých vín z české vinařské oblasti, podoblasti litoměřické. Z obrázku 41 je zřetelné výrazné oddělení litoměřické podoblasti od podoblastí moravských. Je to dáno výrazně odlišným profilem půd a podloží české vinařské oblasti ve srovnání s oblastí moravskou. V okolí Litoměřic převládají půdy s příměsí kamenitého vulkanického skeletu. Metavulkanické je i složení hornin v této lokalitě (Linhart 2007). Dá se předpokládat, že i další vzdálenější vinařské zóny v okolí ČR i dále ve světě nebude obtížné diskriminovat od moravské vinařské oblasti.



Obr. 41: Rozptylový graf klasifikačních funkcí moravské oblasti a litoměřické podoblasti

5.3.2. Diskriminace a klasifikace moravských červených vín dle geografického původu

Podobně jako u klasifikace vzorků bílých vín dle geografického původu, tak i data z analýz vzorků červených vín procházela vícestupňovým vyhodnocováním. Byl zpracován Grubbsův test odlehlých výsledků, analýza rozptylu, shluková analýza, analýza hlavních komponent a diskriminační analýza. Výchozí soubor vzorků červených vín obsahoval 28 vín ze 4 moravských podoblastí.

5.3.2.1. Grubbsův test odlehlých výsledků

Grubbsův test na přítomnost odlehlých výsledků v rámci vzorků červených vín řazených do skupin dle původu neodhalil u žádného vzorků extrémní parametry v relaci s průměrnými

hodnotami z daných podoblastí. Data vykazovala dle histogramu normální gausovskou distribuci. Všech 28 vzorků červených vín bylo podrobena dalším statistickým analýzám.

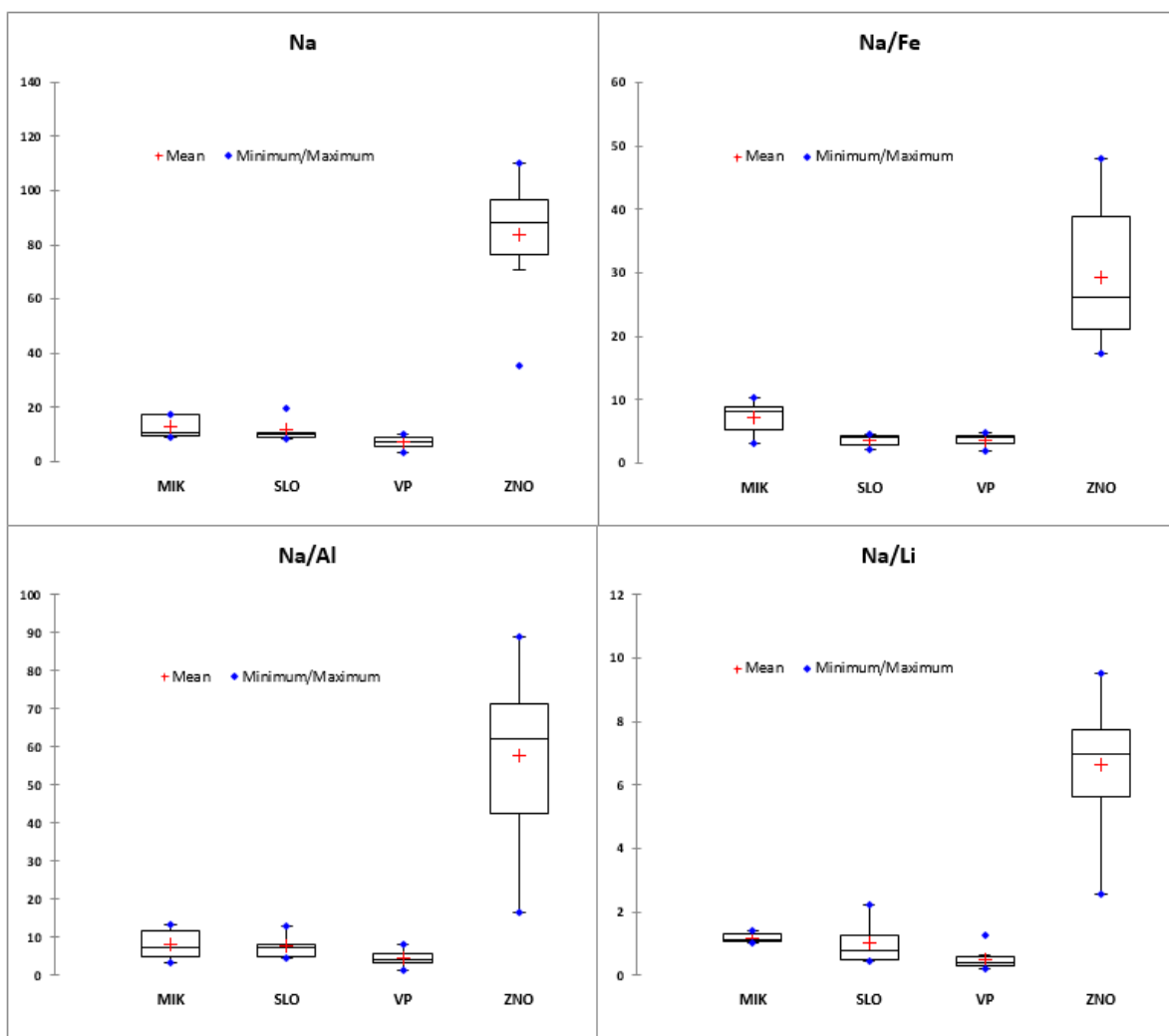
5.3.2.2. *Analýza rozptylu (ANOVA)*

Analýzou rozptylu dat z měření chemických parametrů ve vzorcích 28 červených vín bylo prokázáno, že celkem 17 proměnných (23,9% z výchozího počtu) vykazovalo statisticky významné rozdíly v koncentracích mezi podoblastmi (P blízké nebo $< 0,05$ a $F > F_{crit}$; $F_{crit} = 2,9$). Tyto vybrané proměnné jsou uvedeny v tabulce 38 a seřazeny podle statistické významnosti. ANOVA byla nastavena na interval spolehlivosti 95%. Všechny statisticky významné parametry byly v koncentracích výrazně vyšších než LOD daných metod.

Při přímém porovnání ANOVA bílých a červených vín jsou vidět rozdíly mezi vyselektovanými proměnnými. Společnými znaky mezi bílými a červenými víny jsou Na, Mo, kyselina káвовá a kumarová. To, že pro červená vína jsou významné jiné parametry, než pro bílá je způsobeno převážně přechodem jiného druhu a množství látek ze slupek při delší maceraci, což je proces charakteristický pro tato vína (Jackson 2008). Grafické zobrazení rozptylů dat je přehledně prezentováno na níže uvedených krabicových grafech.

Tabulka 38: *Chemické parametry vyselektované pomocí ANOVA, v rámci klasifikace červených vín dle geografického původu*

Parametr	F	P
Na	67,5762	< 0,0001
Na/Fe	29,1440	< 0,0001
Na/Al	28,3116	< 0,0001
Na/Li	48,1562	< 0,0001
Kvercetin	7,1133	0,0014
Mn/Fe	6,1663	0,0029
Fe	5,5614	0,0048
Mo	5,3398	0,0058
Kyselina Káвовá	5,1960	0,0066
Fe/Ni	5,0488	0,0075
Eu/Dy	5,0051	0,0078
Eu/Er	4,6948	0,0102
Kyselina Kumarová	4,3574	0,0138
Mn	4,1261	0,0171
Pr	3,7549	0,0242
Fe/Al	3,7220	0,0250
Fe/Co	3,4845	0,0314



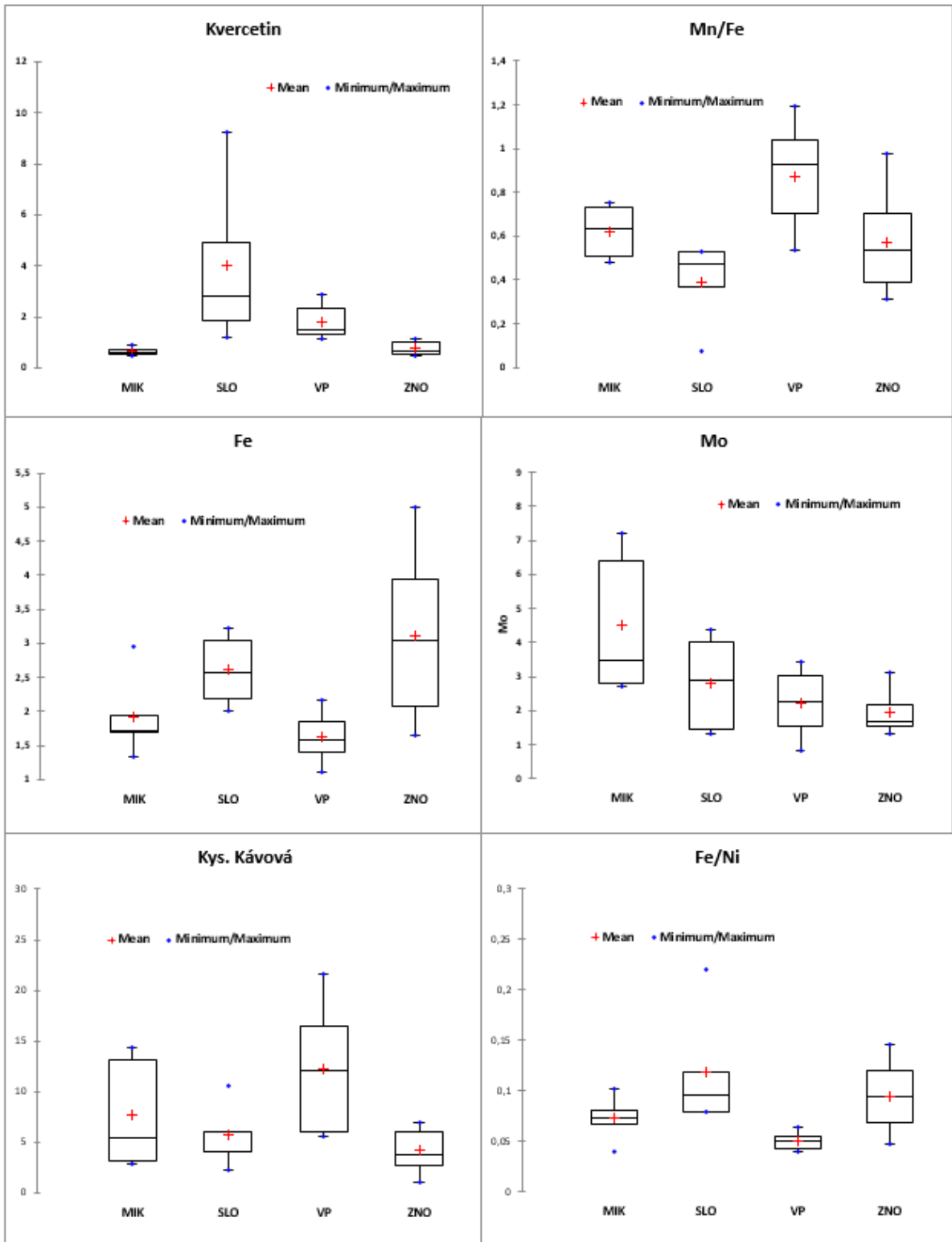
Obr. 42: Krabicové grafy pro Na, Na/Fe, Na/Al, Na/Li. Jednotky koncentrace Na jsou v mg/l, poměry jsou bezrozměrné

Podobně jako u analýzy rozptylu bílých vín (pro klasifikaci dle geografického původu) je statisticky významným parametrem vykazující rozdíly mezi podoblastmi koncentrace sodíku. V případě červených vín se dokonce jedná o proměnnou nejvýznamnější, s $F=67,58$, což je výrazně vyšší hodnota než $F_{crit}=2,9$. Opět se potvrdilo, že vína ze znojenské podoblasti obsahují vyšší koncentrace sodíku (v průměru 83 mg/l). To se samozřejmě projevilo i v rámci prvkových poměrů zahrnující tento alkalický kov. Poměry Na/Fe, Na/Al, Na/Li vykazovaly vysokou úroveň významnosti s hodnotou $F>28$; $P<0,0001$. Pro klasifikaci znojenských vín je tak sodík rozdílovým prvkem. Mezi ostatními moravskými podoblastmi nejsou rozdíly v průměrných koncentracích sodíku tak výrazné. K podobným výsledkům se ve své práci dostal i Škařupa při analýze rozptylu chemických parametrů moravských červených vín z ročníku 2010. Sodík tak jako v případě této disertační práce vykazoval statisticky velmi významné

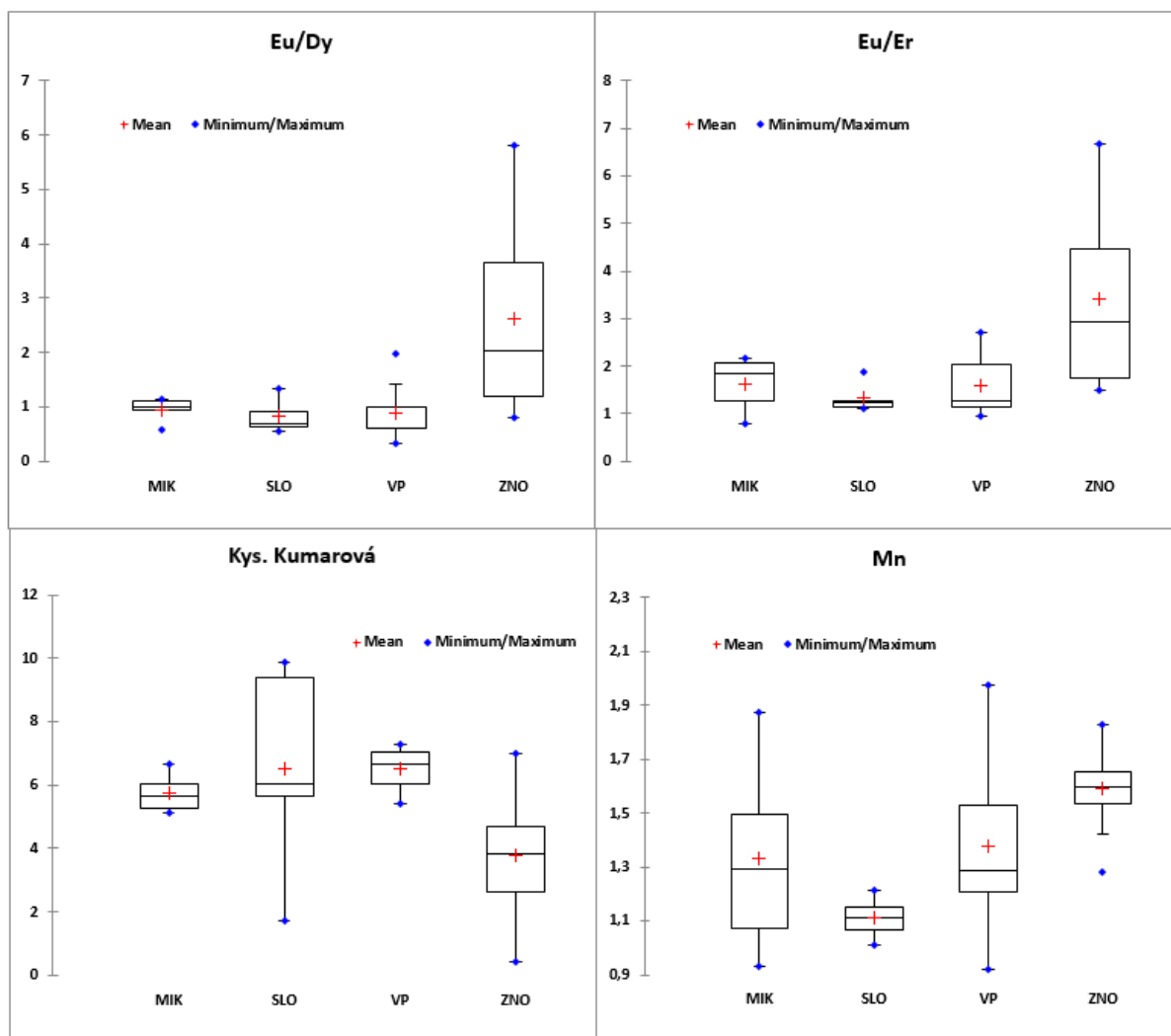
rozdíly mezi podoblastmi, kdy nejvyšší průměrné hodnoty byly pozorovatelné u vín ze znojemské vinařské podoblasti (Škařupa 2012).

Další statisticky významné rozdíly mezi podoblastmi s $F > 2,9$ a $P < 0,05$ byly analýzou rozptylu stanoveny u prvků Fe, Mo, Mn, Pr, Sb a poměrů Mn/Fe, Fe/Ni, Eu/Dy, Eu/Er, Fe/Al a Fe/Co. Molybden je společným diskriminačním znakem jak v případě červených tak i bílých vín. Tento kov je významným rostlinným kofaktorem pro redukci dusičnanů na NH_3 . Nejvyšší průměrné množství tohoto analytu lze pozorovat ve vínech z mikulovské podoblasti (4,4 $\mu\text{g/l}$ v červeném víně), nejnižší poté ve vínech z podoblasti velkopavlovické a znojemské (2,1 a 1,9 $\mu\text{g/l}$). Dále se potvrdil předpoklad vyššího obsahu Fe ve vínech ze znojemské podoblasti. Vinohrady v této podoblasti jsou založeny na spraších obsahující větší množství Fe (Kraus 1999). To se projevilo také na F hodnotě pro proměnné zahrnující Fe, kdy parametr Mn/Fe je šestým ($F = 6,16$) a Fe sedmým ($F = 5,56$) statisticky nejvýznamnějším parametrem v rámci rozdílů mezi moravskými podoblastmi.

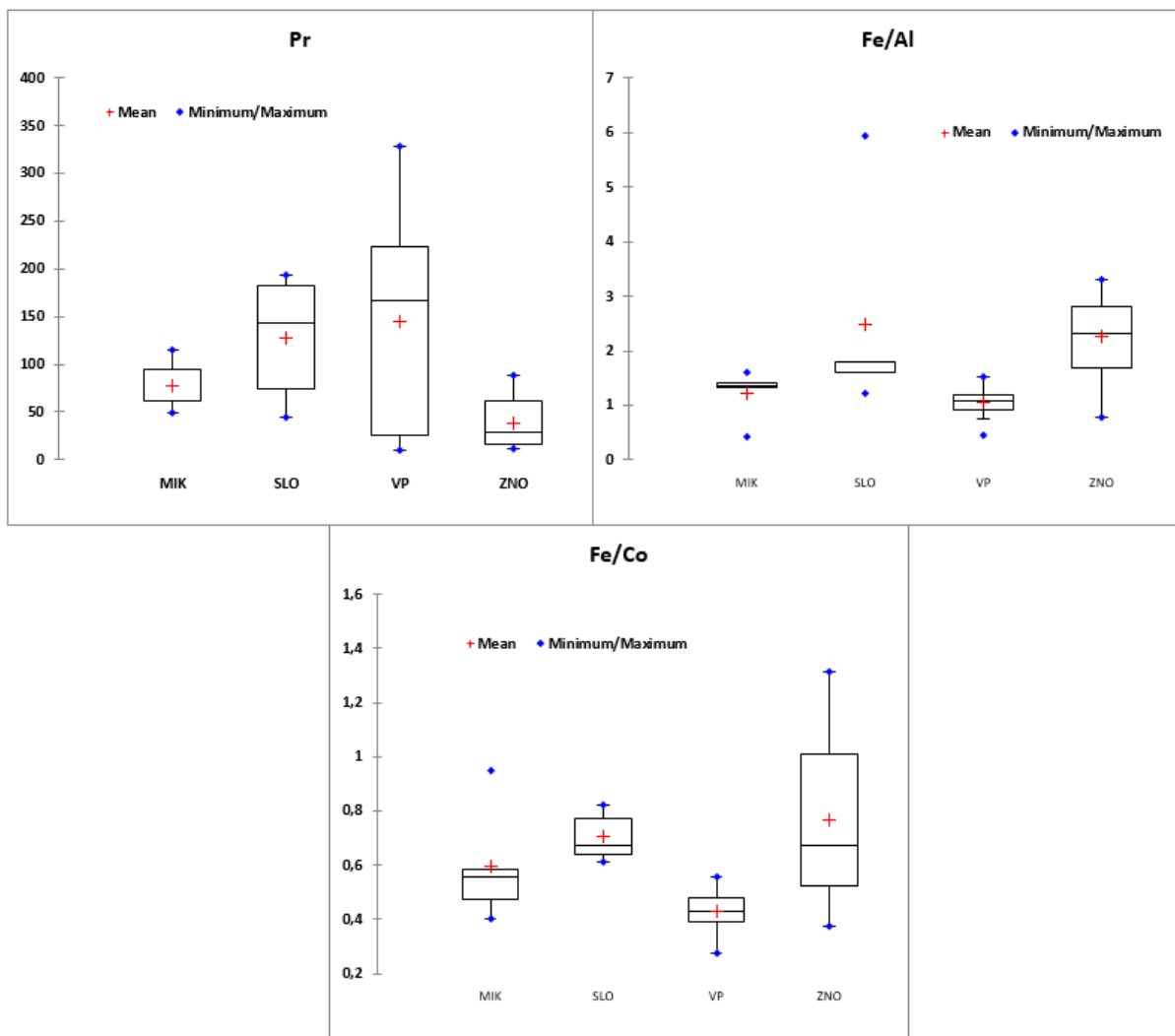
Kromě prvků byly statisticky významné rozdíly mezi podoblastmi zaznamenány také v případě fenolických látek, konkrétně v případě kvercetinu, kyseliny kávové a kumarové. Tyto rozdíly jsou s největší pravděpodobností spjaty s efektem terroiru, tj. odlišnými klimatickými podmínkami a dostupností živin z půd a podloží v jednotlivých vinařských regionech (Bakker a Clarke 2012). Rozdíly mezi koncentracemi fenolových kyselin byly pozorovány i v případě bílých vín. Kvercetin však byl zaznamenán ve všech vzorcích pouze ve vínech červených. Tento žlutý pigment je přítomný ve slupkách hroznů, kdy větší množství těchto polyfenolů přechází do vína v průběhu macerace (Jackson 2008; Michlovský 2014). Nejvyšší průměrná koncentrace kvercetinu byla ve vínech ze Slovácké podoblasti (4 mg/l). Nejnižší ve vínech ze znojemské a mikulovské podoblasti (0,5 mg/l). Největší obsah kyseliny kávové a kumarové měly vína z velkopavlovické podoblasti. Naopak nejnižší vína ze znojemské podoblasti. To je v rozporu s výsledky analýz bílých vín, kdy vína z této podoblasti měly relativně koncentrace nejvyšší. Tyto rozdíly jsou dány odlišnostmi mezi bílými a červenými odrůdami a také jiným způsobem zpracování hroznů. Proto je nutné vytvářet samostatné modely pro bílá a červená vína.



Obr. 43: Krabicové grafy pro Kvercetin (mg/l), Mn/Fe, Fe (mg/l), Mo (µg/l), Kyselinu Kávovou (mg/l) a Fe/Ni



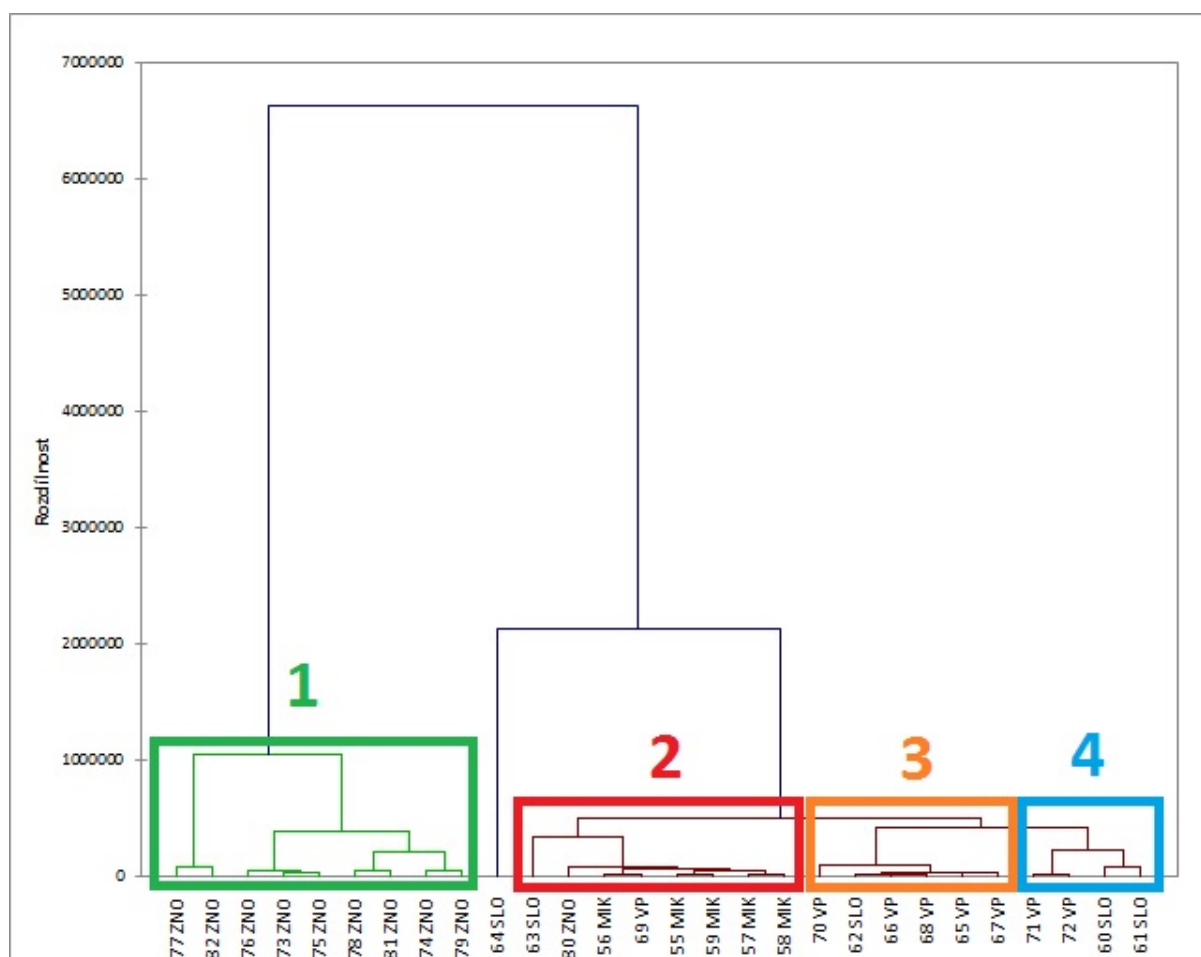
Obr. 44: Krabicové grafy pro poměry Eu/Dy , Eu/Er , kyseliny kumarovou a mangan. Jednotky jsou v mg/l , kromě poměrů, které jsou bezrozměrné



Obr. 45: Krabicové grafy pro poměry Fe/Al, Fe/Co, Pr (ng/l) a Sb (µg/l).

5.3.2.3. Shluková analýza

V této kapitole jsou shrnuty výsledky shlukové analýzy 28 vzorků červených vín ze 4 moravských podoblastí. Vstupní data do analýzy byly založeny na proměnných vybraných analýzou rozptylu. Jako slučovací technika byla zvolena Wardova metoda a jako metrická metoda čtvercových Euklidovských vzdáleností. Primárním výstupem je dendrogram (obr. 46), který vizuálně zobrazuje rozdílnosti a podobnosti mezi jednotlivými vzorky.



Obr. 46: Dendrogram shlukové analýzy červených vín

Z výše prezentovaného dendrogramu jsou na první pohled viditelné dva základní shluky (klastry **1 a 2+3+4**) spojující se na úrovni rozdílnosti 6622848. Stejně jako v případě shlukové analýzy bílých vín byly efektivně odděleny vína ze znojemské podoblasti, které se shlukují v **klustru 1**. Tento klustr zahrnuje až na jednu výjimku všechna testovaná vína z této podoblasti. Znovu se tak potvrdilo, že z této podoblasti pochází vína se specifickými chemickými vlastnostmi a je tak relativně snadné je odlišit na základě prvkového složení v kombinaci s analýzou fenolických látek.

Při bližší analýze dendrogramu je patrný značný rozptyl klasifikace vín ze slovácké podoblasti. Pravděpodobnou příčinou tohoto nepravidelného shlukování je nízký počet vstupních dat způsobený nedostatečným počtem vzorků z této podoblasti. Slovácká vína byla shlukovou analýzou zařazena do **klastrů 2, 3 i 4**. Výjimkou je vzorek 64, který se na základě chemického složení izoloval od všech vytvořených klastrů. Tento modrý portugal pocházel původem z Blatnice pod svatým Antonínkem, tedy z jihovýchodní oblasti slovácké podoblasti blízko Strážnice. Ostatní vzorky ze slovácké podoblasti jsou z okolí Kyjova a tak nedošlo ke sloučení jednotlivých pozorování. Slovácká podoblast je největší na Moravě a efektivní klasifikace by vyžadovala výrazně vyšší množství vzorků pro kompletní pokrytí celého prostoru. Dle starého členění oblastí dle zákona č. 115/1995 Sb. byla Slovácká podoblast dříve členěna na 6 menších zón. Kyjovskou, Mutěnickou, Podluží, Bzeneckou, Uherskohradišťskou a Strážnickou. Pokud by bylo k dispozici alespoň 5 vín z každé z těchto menších zón, byla by klasifikace rozsáhlé slovácké podoblasti, díky rovnoměrnému pokrytí vzorky, realizovatelná. Podobným způsobem by bylo vhodné klasifikovat i ostatní moravské podoblasti.

Podobnosti vín z mikulovské podoblasti se projevily vytvořením **klastru 2** spojující se na úrovni podobnosti 490932 s **klastry 3 a 4**. Podobnou míru podobnosti s mikulovskými víny vykazovaly také vzorky 63 SLO, 80 ZNO a 69 VP. Komerční vzorek 63 byl etiketou zařazen do Slovácké podoblasti, nebyla však konkrétně uvedena vinařská obec ani trať. Přesnost zařazení tohoto vzorku bude dále testována křížovou validací v rámci diskriminační analýzy. Vzorek 80, tj. Rulandské modré z Šanova byl zařazen do shluku s mikulovskými víny pravděpodobně z důvodů geografických. Šanov je vinařská obec na východní hranici znojenské podoblasti, hraničící s podoblastí mikulovskou. Vzorek 69 pochází ze Žabčic, vinařské obce blízko hranice VP a MIK podoblasti. To je pravděpodobný důvod zařazení vzorku 69 k mikulovským vínům. Do **klastrů 3 a 4** se dle Wardovy metody rozdělily vína z velkopavlovické podoblasti, doplněné víny ze slovácké podoblasti. Tato vína ze slovácké mají původ v Hovoranech, v přechodové oblasti mezi VP a SLO.

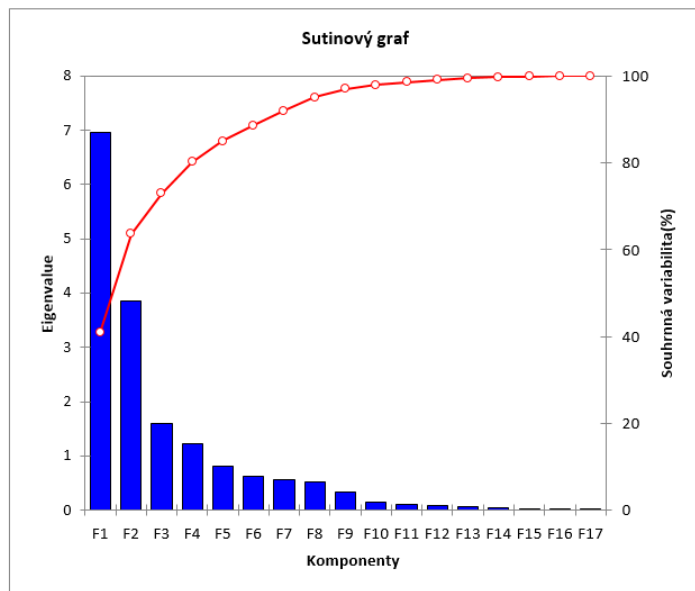
Z těchto výsledků se dá usuzovat, že shluková analýza pro preliminární průzkum vzorků podává uspokojivé výsledky. Podobně jako v případě shlukové analýzy bílých vín byla většina špatně zařazených vzorků z přechodových zón mezi podoblastmi. Rozdělením moravských podoblastí na menší úseky, charakterizované vyšším počtem pozorování, by výrazně vylepšilo klasifikační schopnosti modelu.

5.3.2.4. Analýza hlavních komponent - PCA

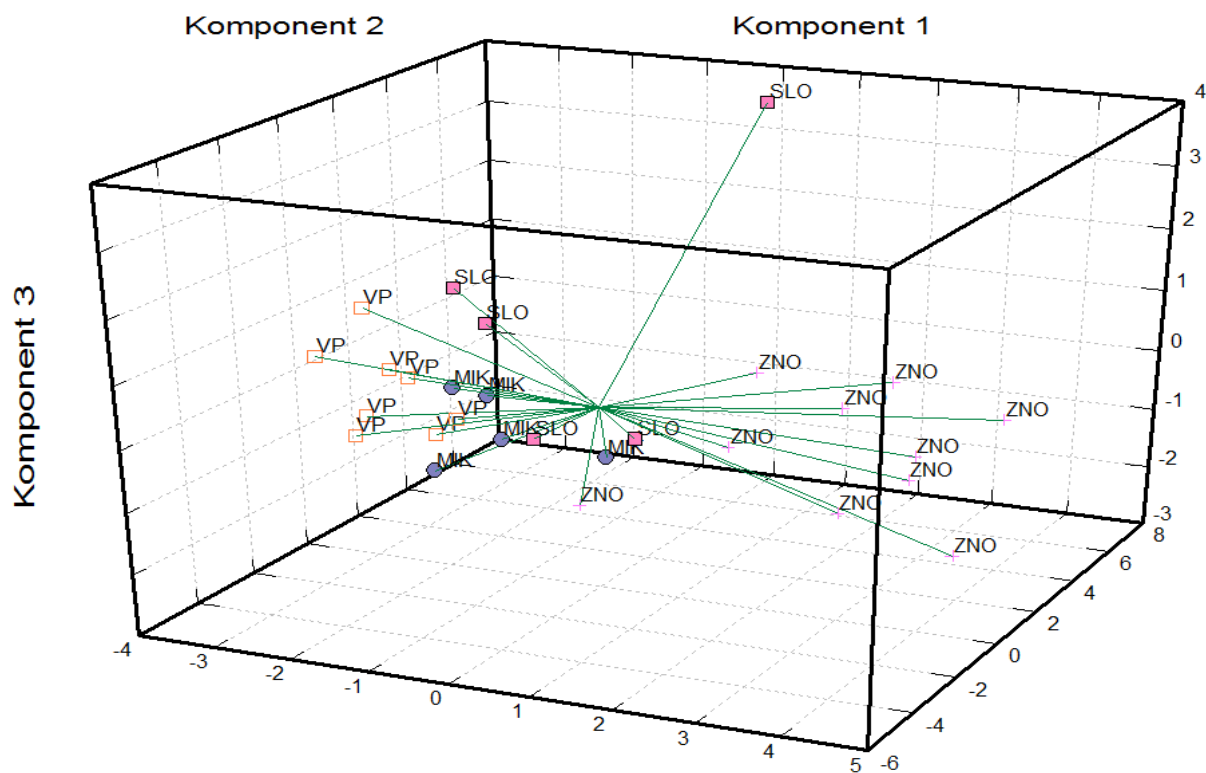
Analýza hlavních komponent moravských červených vín sloužila k vizualizaci a vyhodnocení informací z 16 proměnných vybraných analýzou rozptylu. Hlavním cílem bylo snížení počtu výchozích parametrů a zkoncentrování výchozí informace do menšího počtu komponent. Informace z vybraných 17 parametrů byly pomocí PCA (metoda Pearsonovy korelace, varimax rotace) rozděleny do 17 hlavních komponent. Míra uložené variability v jednotlivých komponentech byla popsána hodnotou eigenvalue. Čím vyšší byla eigenvalue, tím více informací bylo v dané komponentě uloženo. Dle Kaiserova kritéria byly dále vyřazeny všechny komponenty s eigenvalue < 1 , kdy množství informací uložené v takové komponentě odpovídá informaci parametru výchozího, nebo je menší. V tomto případě byly na základě Kaiserova kritéria stanoveny **4 hlavní komponenty** popisující dohromady 80,20% celkové variability (viz tabulka 39 a obr. 47). Na základě hlavních komponent byly sestaveny grafy (obrázek 48, 49 a 50) zobrazující jednotlivé projekce do faktorového prostoru a faktorových rovin.

Tabulka 39: Souhrn hlavních komponent – červená vína

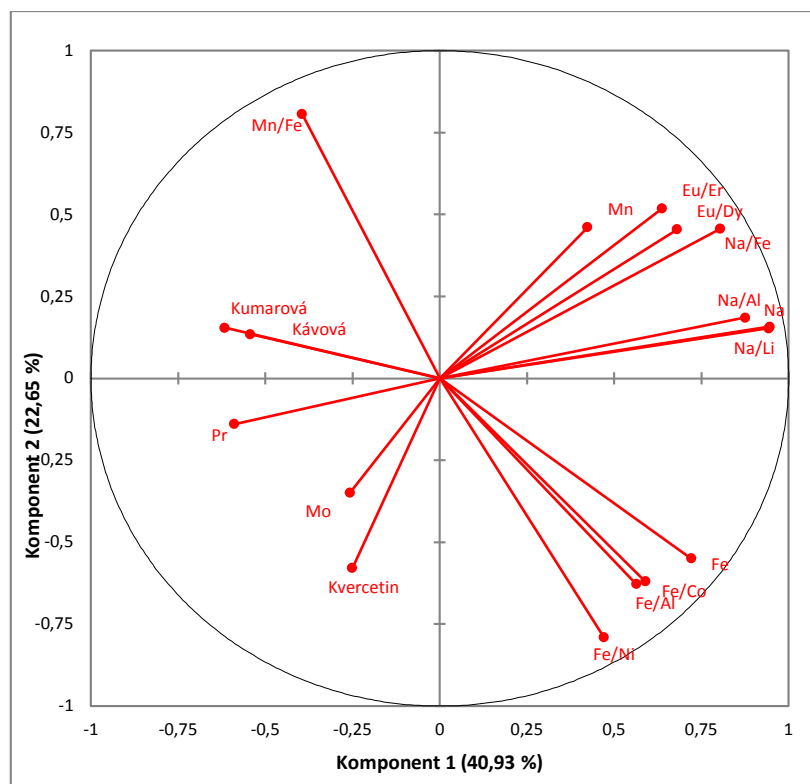
Komponent	Eigenvalue	Variabilita (%)	Souhrnná %
F1	6,9586	40,9328	40,9328
F2	3,8509	22,6523	63,5851
F3	1,5891	9,3475	72,9326
F4	1,2350	7,2645	80,1972
F5	0,8041	4,7297	84,9269
F6	0,6322	3,7189	88,6458
F7	0,5665	3,3326	91,9784
F8	0,5195	3,0557	95,0341
F9	0,3451	2,0301	97,0642
F10	0,1414	0,8320	97,8962
F11	0,1190	0,6999	98,5961
F12	0,0873	0,5135	99,1096
F13	0,0717	0,4215	99,5311
F14	0,0397	0,2334	99,7646
F15	0,0253	0,1486	99,9132
F16	0,0088	0,0518	99,9650
F17	0,0060	0,0350	100,0000



Obr. 47: Sutinový graf demonstrující význam jednotlivých hlavních komponent

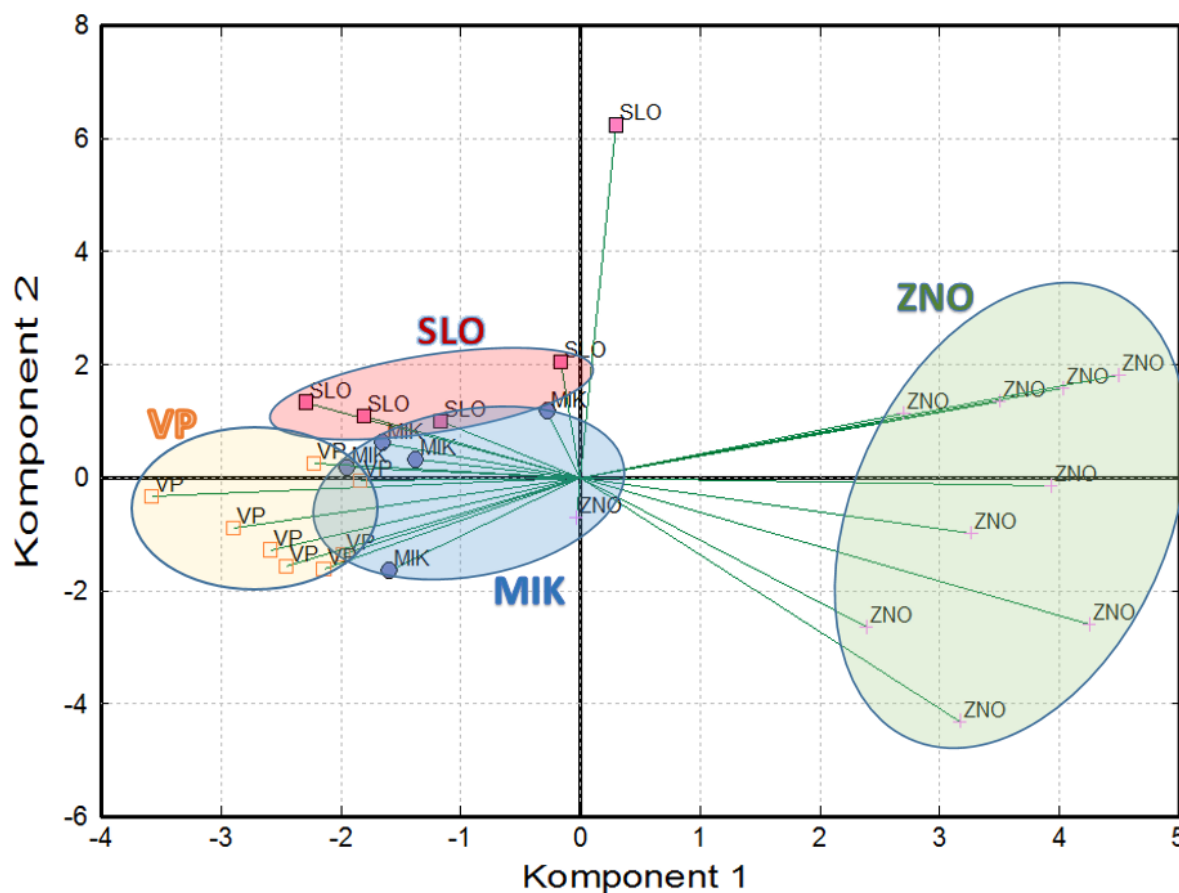


Obr. 48: Projekce vzorků červených vín do faktorového prostoru hlavních komponent 1, 2, 3



Obr. 49: Rozptylový graf - Projekce proměnných do faktorové roviny hlavních komponent 1 a 2

Projekcí vzorků vín do faktorového 3D grafu a následnou rotací os (Obr. 48) bylo stanoveno, že nejlepší rozlišovací schopnost pro jednotlivé podoblasti při projekci do 2D faktorové roviny poskytují komponenty 1 a 2. Komponenty 1 a 2 vysvětlují 63,59% celkové variability. Hlavní komponenty jsou pozitivně nebo negativně korelovány výchozími proměnnými (chemickým složením). Tyto vlivy jsou graficky zobrazeny v rozptylovém grafu 49. **Komponenta 1** byla nejvíce pozitivně korelována proměnnými Na, Na/Li, Na/Al, Fe, Eu/Dy, Eu/Er, Fe/Co a Fe/Al. Naopak nejnegativněji byla korelována proměnnými vycházejícími z koncentrací kyseliny kumarové, kávové, Pr a poměru Mn/Fe. **Komponenta 2** byla nejvíce pozitivně korelována poměry Mn/Fe, Eu/Er, Eu/Dy, Na/Fe a koncentrací Mn. Výrazně negativně pak byla korelována poměrem Fe/Ni, Fe/Al, Fe/Co, koncentrací Fe a kvercetinu. Jednotlivé proměnné dále korelovaly více či méně mezi sebou. Nejsilnější meziparametrové souvislosti bylo možné pozorovat mezi proměnnými závislými na parametru koncentrace Na a Fe. Další silná korelace byla patrná mezi fenolovými kyselinami – kávovou a kumarovou. To je pravděpodobně dané podobnostmi v chemické struktuře těchto dvou látek a příbuzným mechanismu jejich syntézy v rostlině, podobně jako v případě bílých vín, kdy byla tato spojitost také pozorována.



Obr. 50: Projekce vzorků červených vín do faktorové roviny hlavních komponent 1 a 2

Na obrázku 50 je graficky znázorněna disperze jednotlivých pozorování (vzorků vín) do faktorové roviny komponent 1 a 2. Je patrné, že na základě této analýzy došlo k oddělení jednotlivých vzorků vín do 4 zón. Skóre vín ze znojenské podoblasti byly distribuovány do faktorové roviny v rámci 2 a 4 kvadrantu, s výrazně pozitivním skóre u první komponenty a v průměru neutrálním u komponenty 3. Při porovnání s rozptylovým grafem projekce proměnných se dá usuzovat, že tato vína obsahují obecně vyšší koncentrace sodíku, železa (včetně poměrů těchto prvků) a také poměry Eu/Er a Eu/Dy. K podobným výsledkům se dopracoval i Škařupa ve své práci, kdy projekcí vín ze znojenské podoblasti do faktorové roviny hlavních komponent došlo ke korelaci se sodíkem a poměrem Fe/Al (Škařupa 2012). Vína ze znojenské podoblasti naopak obsahovaly, v porovnání s víny z ostatních podoblastí, menší množství fenolových kyselin, praseodymu, molybdenu a kvercetinu. Disperzí pozorování z ostatních moravských podoblastí vznikly 3 těsně oddělené zóny, kdy dochází k částečným překryvům vzorků z jednotlivých podoblastí. Pozorování byla distribuována v záporné hemisféře komponenty 1. Dle rozptylového grafu byla vína ze slovácké podoblasti charakteristická vyšší hodnotou poměru Mn/Fe a relativně nižším obsahem kvercetinu. Vína z mikulovské podoblasti byla dle PCA specifická vyšším obsahem fenolových kyselin. Relativně dobře oddělený shluk velkopavlovických vín byl výrazně pozitivně korelován obsahem praseodymu a nejvíce negativně korelován sodíkem a železem. Jediným značně odlehlým vzorkem byl podobně jako v případě shlukové analýzy identifikován vzorek číslo 64, z východního cípu slovácké podoblasti. I dle PCA se opět projevila slabina dělení moravské vinařské oblasti na pouhé 4 podoblasti. Na vzorku číslo 64 z Blatnice pod svatým Antonínkem s ověřeným původem vína originální certifikace Blatnice, se dá dobře demonstrovat nehomogenita podoblastí. Tento vzorek se svým chemickým složením výrazně odlišuje od slováckých vín z okolí Kyjova, která byla v modelu v převaze. Jediným efektivním řešením je, jak bylo již dříve zmíněno, rozčlenění na menší geografické úseky, v ideálním případě po vzoru Vín originální certifikace, jako jsou kromě blatnických VOC, VOC Znojmo, VOC Mikulov, VOC Modré hory, VOC Pálava, kdy jsou vytvořeny jasně ohraničené oblasti se specifickým terroirem.

Podobně jako při analýze bílých vín, i vína červená bylo možné analýzou hlavních komponent diskriminovat a charakterizovat podle geografického původu hroznů. V rámci 4 vytvořených shluků byly do faktorové roviny nesprávně dispergovány pouze 2 vzorky vín, což je výrazně přesnější výsledek než klasifikace založená na shlukové analýze.

5.3.2.5. Kanonická diskriminační analýza – DA

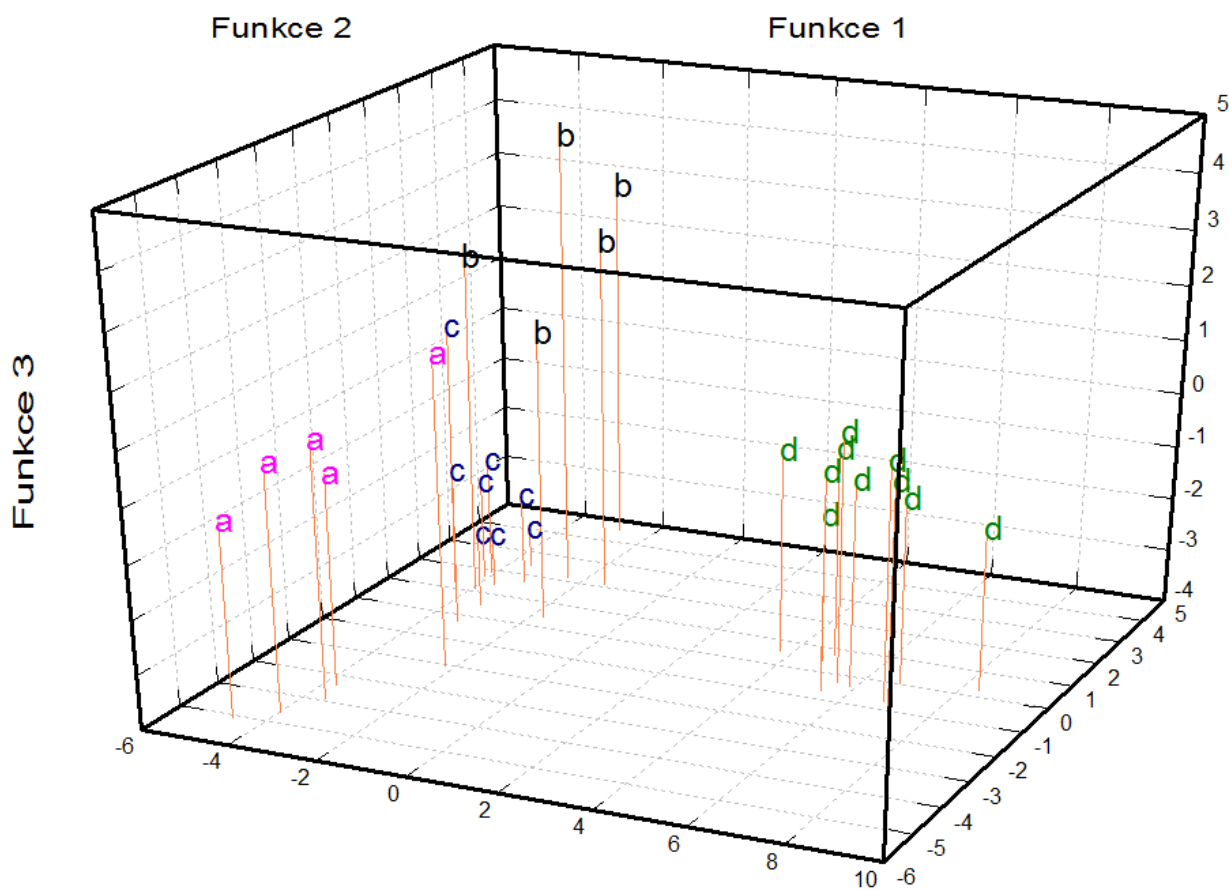
Kanonickou diskriminační analýzou byly rozdělovány a klasifikovány vzorky červených vín dle geografického původu pomocí s pomocí diskriminátorů (moravské vinařské podoblasti). Na rozdíl od shlukové analýzy a analýzy hlavních komponent tato parametrická metoda využívá znalosti o počtu skupin a příslušnosti vzorků k maximalizaci rozdílnosti mezi vinařskými podoblastmi a minimalizaci rozdílností vín patřících do stejné kategorie. Byly vytvořeny diskriminační a klasifikační funkce popisující jednotlivé podoblasti, využitelné k určení původu známých i neznámých vzorků.

Vstupní parametry byly do DA vybrány na základě analýzy rozptylu. Sekundární třídění proměnných dle významu pro přesnost klasifikace bylo prováděno pomocí kritéria Wilksovy lambdy (Tabulka 39). Čím blíže je lambda hodnotě 0, tím významnější vliv má proměnná na klasifikaci. Krokovou dopřednou selekcí byly postupně přidávány do modelu proměnné na základě hodnoty lambda do té doby, dokud rostla přesnost modelu, respektive efektivita rozdělení podoblastí. Nakonec byly do modelu zařazeny všechny proměnné vyselektované analýzou rozptylu ($W. \text{Lambda} < 1$). Byly vypočítány tři statisticky významné diskriminační funkce popisující vnitřní propojení mezi proměnnými a vzorky, kde Na byl nejvýznamnější korelační proměnnou pro funkci 1, kvercetin pro funkci 2 a Fe/Ni pro funkci 3 (Tabulka 39).

Tabulka 39: Diskriminační funkce a Wilksovy lambdy jednotlivých proměnných

Proměnná	Funkce 1	Funkce 2	Funkce 3	Lambda
K. Kávová	-0,4984	0,1063	-0,4482	0,6062
K. Kumarová	-0,5838	0,1753	0,0343	0,6474
Kvercetin	-0,3168	0,5344	0,4402	0,5293
Pr	-0,4935	0,3145	-0,0845	0,6806
Mo	-0,3643	-0,5141	0,2804	0,5997
Mn	0,4723	-0,1534	-0,3837	0,6597
Fe	0,5885	0,0563	0,3219	0,5899
Na	0,9621	-0,0849	-0,0371	0,1059
Na/Fe	0,8922	-0,1492	-0,0696	0,2154
Na/Al	0,8986	-0,0759	-0,0368	0,2203
Fe/Al	0,3853	0,1853	0,4494	0,6825
Na/Li	0,9412	-0,1010	-0,0095	0,1425
Fe/Ni	0,2921	0,1148	0,6356	0,6131
Eu/Er	0,6087	-0,0803	-0,1139	0,6302
Mn/Fe	-0,2421	0,0130	-0,7211	0,5647
Eu/Dy	0,6282	-0,0629	-0,0681	0,6151
Fe/Co	0,4455	-0,0545	0,3898	0,6966

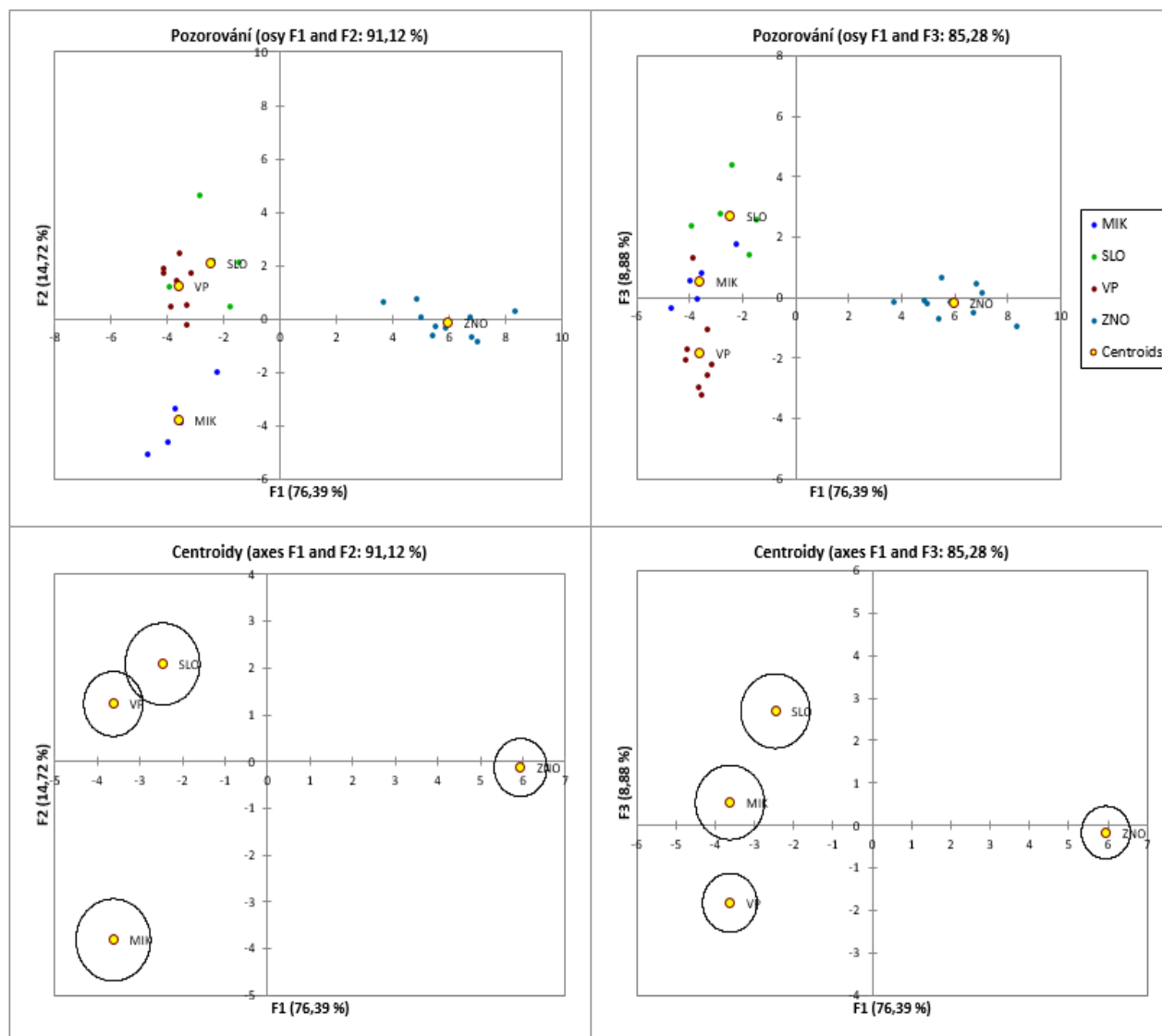
Rozptylové grafy (viz obr 51 a 52) vizualizují rozdělení vzorků do jednotlivých skupin. Dle centroidů a kružnic spolehlivosti (spodní část obrázku 52) je patrné úplné rozdělení moravských podoblastí. Znojemská podoblast, podobně jako u shlukové analýzy a analýzy hlavních komponent, tvoří izolovanou skupinu výrazně vzdálenou od ostatních grup. Zbylé tři podoblasti mají centroidy lokalizované těsněji, ale stále dostatečně mezi sebou rozlišené (viz tabulka 40). Největší vzdálenosti mezi centroidy jednotlivých byly naměřeny k podoblasti znojemské (>9), čímž se potvrdily jak výsledky z analýz bílých vín, tak i shluková analýza a PCA vín červených. V porovnání s bílými víny byly posteriorní vzdálenosti centroidů mezi znojemským regionem a ostatními moravskými regiony dokonce výrazně vyšší. Nejbliže si byly centroidy podoblastí slovácké a velkopavlovické (4,7349). Databáze slováckých vín byla založena převážně na vínech z okolí Kyjova a hraniční oblasti s oblastí velkopavlovickou. Tím se vysvětluje tato nejmenší vzdálenost mezi centroidy. Předchozí analýzy ukázaly problematické zařazení vín ze slovácké podoblasti způsobené malým počtem vzorků a jejich nehomogenním pokrytím regionu. Spolehlivá klasifikace nebyla možná jak s pomocí shlukové analýzy a PCA. S použitím diskriminátorů se již podařilo tato vína správně klasifikovat.



Obr. 51: 3D rozptylový graf klasifikačních funkcí (a – MIK, b – SLO, c – VP, d – ZNO)

Tabulka 40: Klasifikační matice modelu pro červená vína

Centroidy	Vzdálenost mezi centroidy
SLO-VP	4,7349
MIK-VP	5,5730
MIK-SLO	6,3848
SLO-ZNO	9,1534
VP-ZNO	9,8038
MIK-ZNO	10,2754



Obr. 52: Rozptylový graf klasifikačních funkcí včetně zobrazení centroidů a vzorků

Hlavním výstupem kanonické diskriminační analýzy byly vytvořené klasifikační predikční funkce (tabulka 41), matematicky popisující jednotlivé podoblasti. Tyto funkce dále slouží ke klasifikaci vzorků s neznámým původem, kdy na základě dosazení změřených vyselektovaných proměnných lze s určitou pravděpodobností zařadit vzorek do jedné ze 4

podoblastí, nebo konstatovat, nebo že daný vzorek pochází či nepochází z moravské vinařské oblasti. Samotná diskriminace vín byla založena na Mahalanobisových čtvercových vzdálenostech pozorování od centroidů a posteriorních pravděpodobnostech pro každý vzorek a každou skupinu. Vína jsou tak klasifikována do podoblastí na základě výpočtu vzdáleností od modelových centroidů z klasifikačních funkcí. Stanovené funkce umožnily rozdělení **známých** vzorků červených vín dle podoblastí s 96,43% úspěšností (tabulka 42).

Tabulka 41: *Predikční klasifikační funkce pro geografickou klasifikaci červených vín*

	MIK	SLO	VP	ZNO
Intercept	-129,2164	-142,8658	-129,5757	-172,0510
Kyselina kávová	0,3514	-0,5596	0,0718	-0,6187
Kyselina kumarová	7,9845	6,4026	5,5513	1,0320
Kvercetin	-5,1735	5,7799	1,1344	5,9564
Pr	-0,1037	-0,0578	-0,0399	-0,0320
Mo	5,0606	1,2699	1,0381	-0,5687
Mn	3,2398	-33,0655	-29,0879	-39,7374
Fe	51,7480	73,3926	64,2255	65,9116
Na	0,4140	0,4946	0,7310	0,9142
Na/Fe	3,6518	3,9729	3,0982	4,7142
Na/Al	-1,4208	-1,3340	-1,3678	-1,1016
Fe/Al	0,1717	-16,9014	-9,2714	-21,1043
Na/Li	-15,5636	-16,2514	-16,1729	-13,9044
Fe/Ni	471,2978	682,3183	630,2236	812,8696
Eu/Er	22,0103	27,1950	25,9733	39,5842
Mn/Fe	91,6899	142,8226	155,1546	166,1887
Eu/Dy	-25,1480	-27,7829	-27,5378	-42,8996
Fe/Co	-22,7130	-44,1017	-45,8070	-13,3544

Tabulka 42: *Klasifikační matice modelu pro červená vína*

	MIK	SLO	VP	ZNO	Celkem	Správnost zařazení %
MIK	5	0	0	0	5	100,00%
SLO	0	5	0	0	5	100,00%
VP	0	1	7	0	8	87,50%
ZNO	0	0	0	10	10	100,00%
Celkem	5	6	7	10	28	96,43%

Stejně jako v případě bílých vín, i pro červená vína byla pro ověření správnosti modelu provedena křížová validace. Jednalo se o testování vyřazením vždy jednoho konkrétního vzorku z modelu. Predikční schopnosti pak byly ověřeny na nově sestaveném modelu, podle kterého byl konkrétní vyřazený vzorek klasifikován. Výsledkem této validace bylo 100% zařazení

znojenských vín. Relativně vysoká úspěšnost křížové validace byla také vypočítána pro klasifikační modely mikulovských (80%) a velkopavlovických (87,5%) vín. Horší výsledek byl stanoven v případě modelu klasifikujícího červená vína ze slovácké podoblasti. Křížová validace vykazovala neuspokojivé výsledky, kdy bylo správně zpětně klasifikováno pouze 40% vzorků. Při bližším zhodnocení matice křížové validace je patrné, že se vzrůstajícím počtem vzorků v modelu roste i jeho přesnost. Křížová validace umocňuje nepřesnosti modelu způsobené malým množstvím vstupních dat tím, že je založena na mechanismu vyřazování vždy jednoho vzorku z databáze. V případě červených vín z MIK a SLO, kterých bylo k dispozici pouze 5 vín, šlo o propad zdrojových dat modelu o 20% (1 víno z 5). Model mikulovské podoblasti si díky větším posteriorním vzdálenostem centroidů zachoval relativní robustnost a zařadil správně 80% vzorků.

Tabulka 43: Matice křížové validace modelu pro červená vína

	MIK	SLO	VP	ZNO	Celkem	Správnost zařazení %
MIK	4	1	0	0	5	80,00%
SLO	1	2	2	0	5	40,00%
VP	0	1	7	0	8	87,50%
ZNO	0	0	0	10	10	100,00%
Celkem	5	4	8	11	28	82,15%

Nedostatečný predikční potenciál modelu pro slovácká červená vína jen potvrdil výsledky předchozích statistických analýz. Ani pomocí diskriminační analýzy se nepodařilo správně predikovat geografický původ a takto sestavený klasifikační model bude pro tuto podoblast fungovat jen s omezenou přesností. Dá se očekávat, že rozšířením modelu o další geograficky homogenně distribuované vzorky by se funkčnost modelu značně vylepšila. Diskriminační a klasifikační systém pro **bílá vína** zahrnoval 15 vzorků vín ze slovácké podoblasti, což byl dostatečný počet pro 100% efektivní predikci původu.

5.3.3. Odrůdová autenticita

V teoretické části, v kapitolách 1.3.1. a 1.4 byla nastíněna možnost využití prvkové analýzy v kombinaci s organickou analýzou k vytvoření diskriminačního a klasifikačního modelu odrůdové autenticity. Mechanismus diskriminace odrůdových vín je založen na fyziologických rozdílech jednotlivých odrůd révy. Určité rozdíly mezi odrůdami se daly očekávat v příjmu anorganických a organických látek kořenovým systémem a také v charakteristice rostlinných

metabolických drah (v syntéze zejména sekundárních rostlinných metabolických produktů) (Eshel a Beeckman 2013; Gregory 2006). K vytvoření pilotního modelu pro diferenciaci a klasifikaci vín dle odrůd bylo použito stejného datasetu jako v případě modelu pro určení geografického původu vín. Výchozí soubor odrůdových vín čítal 24 bílých vín tří odrůd (VZ, RR, MT), vybraných dle četnosti osázení na moravských vinicích (Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno 2014).

5.3.3.1. *Grubbsův test odlehlých výsledků*

Grubbsův test na přítomnost odlehlých výsledků v rámci vzorků odrůdových bílých vín, řazených do skupin dle odrůd, neodhalil u žádného vzorků extrémní parametry v rámci průměrných hodnot daných odrůdových kategorií. Data vykazovala dle histogramu normální gausovskou distribuci. Všech 24 vzorků bílých vín bylo podrobena dalším statistickým analýzám.

5.3.3.2. *Analýza rozptylu (ANOVA)*

Analýzou rozptylu dat (ANOVA byla nastavena na interval spolehlivosti 90%) z měření chemických parametrů ve vzorcích 24 bílých odrůdových vín bylo prokázáno, že celkem 7 proměnných (10,6% z výchozího počtu 66 parametrů) vykazovalo statisticky významné rozdíly v hodnotách parametrů mezi testovanými odrůdovými skupinami ($P < 0,1$ a $F > F_{crit}$; $F_{crit} = 2,42$). Tyto vybrané proměnné jsou uvedeny v tabulce 44, graficky zobrazené rozptyly jsou demonstrovány na krabicových grafech (obrázky 53 a 54) a seřazeny podle statistické významnosti.

Tabulka 44: *Chemické parametry vybrané pomocí analýzy rozptylu, v rámci diskriminace a klasifikace bílých vín dle odrůd*

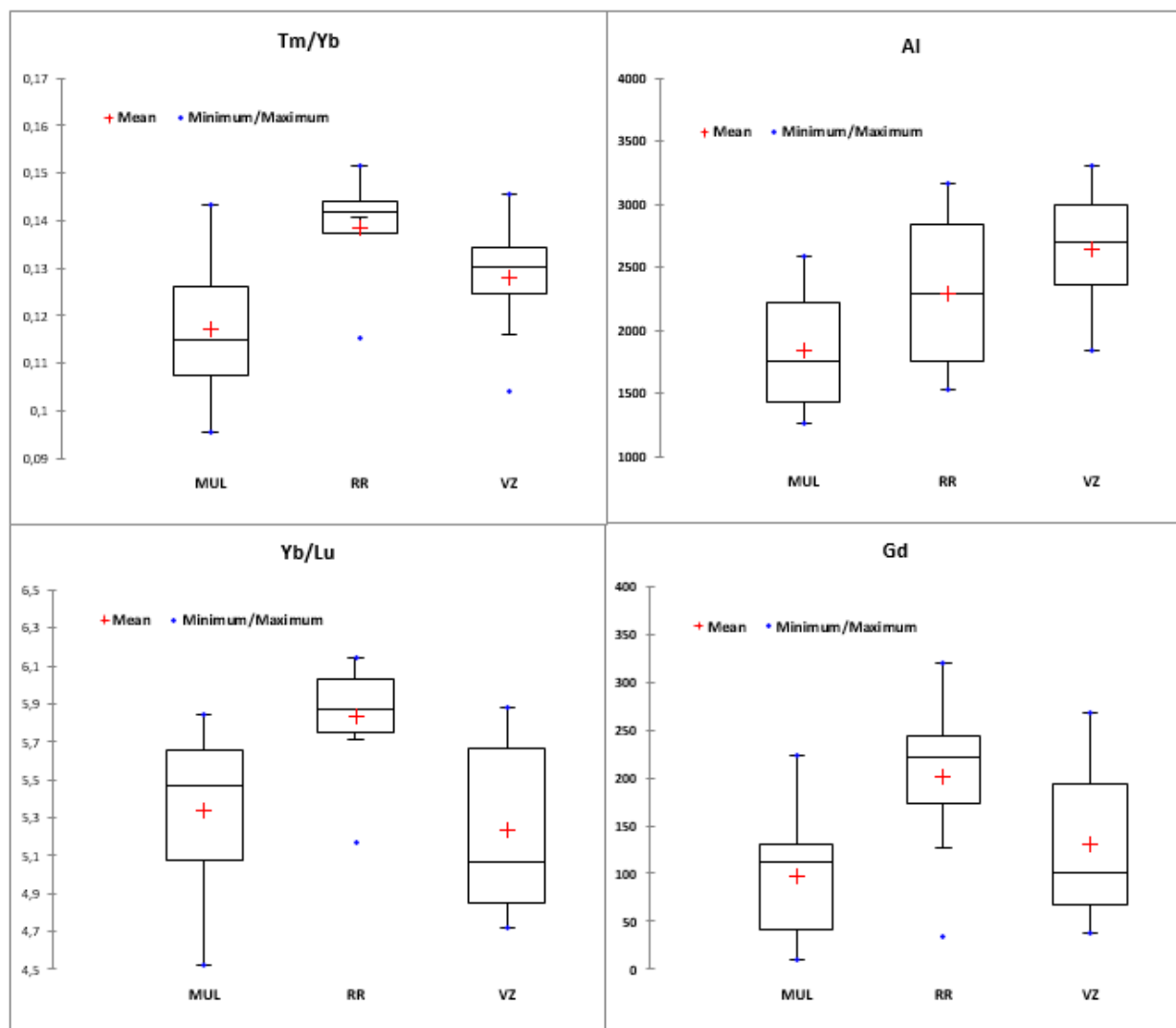
Parametr	F	P
Tm/Yb	5,0668	0,0160
Al	4,3627	0,0260
Yb/Lu	4,3330	0,0266
Gd	3,3261	0,0556
Mo/Sn	3,2413	0,0593
Sn	3,1259	0,0648
Mn/Cr	3,0051	0,0712
Tb	2,6033	0,0977

Jak je patrné z tabulky 44, mezi parametry vykazující statisticky významné rozdíly v průměrných hodnotách mezi odrůdami VZ, RR a MT patří převážně prvky vzácných zemin (REE – rare earth elements) a jejich poměrné koncentrace a kovy Al, Sn a poměry Mo/Sn a Mn/Cr. Analýzou rozptylu dat z měření odrůdových vín byl mezi základními kovy statisticky nejvýznamnějším diskriminátorem určen hliník ($P=0,0260$ a $F=4,3627$). Rostliny mají vyvinutý ochranný mechanismus bránící proti toxickým vlivům Al^{3+} . Citlivost na tyto toxické vlivy se liší mezi rostlinami, stejně tak mezi odrůdami. Tyto rozdíly popsal Foy a kol. (1992) ve své studii. Protektivní mechanismus je založen na uvolňování organických kyselin kořenovým systémem, který způsobuje zakomplexování (imobilizaci) hliníku (Eshel a Beeckman 2013). Tímto tématem se také zabývala skupina vědců vedená Delhaizem (1993, která zkoumala mechanismus tolerance Al u rostlin, a bylo zjištěno, že uvolnění organických kyselin je zprostředkované aktivací kanálů na plazmatické membráně kořenových buněk, iniciované právě ionty Al. Drobné rozdíly ve funkci kořenového systému a genetické výbavě kořenových buněk byly pravděpodobně důvodem vzniku rozdílů v průměrných koncentracích Al ve vínech v rámci tří testovaných odrůd.

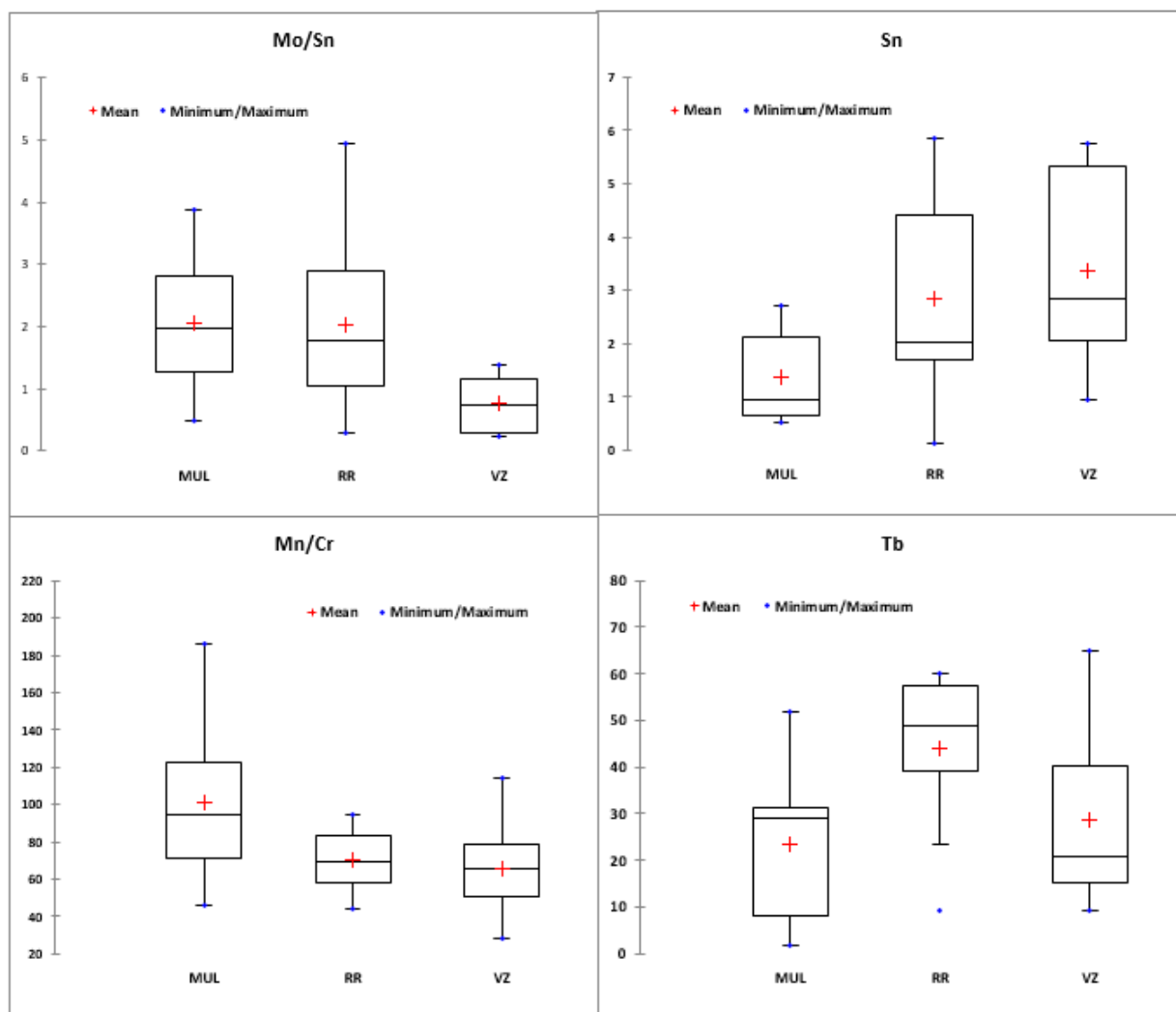
Další statisticky významné prvky pro odrůdovou autenticitu byly analýzou rozptylu naměřených dat rekrutovány ze skupiny přechodných prvků – Mo, Mn a Cr. Všechny tyto prvky mají vysokou tendenci tvorby komplexů s rostlinnými a mikrobiálními organickými ligandy, které zvyšují mobilitu zemina – voda – rostlina (Barker a Pilbeam 2007). Vyskytují se v zemské kůře ve většině případů v úzkém spojení. Především Mn a Cr jsou často vázány v rámci jedné rudy (Bauer a Velde 2014). Pro rostlinu mají tyto elementy význam v netoxických koncentracích, kdy jsou součástí metaloproteinů moderujících oxidačně – redukční děje v rostlině (Heldt 2005). Opět se dá předpokládat, že tyto malé, ale statisticky významné rozdíly mezi třemi testovanými odrůdami jsou způsobeny rozdílnou aktivitou kořenového systému v uvolňování látek ovlivňujících mobilitu prvků v půdě a pórové vodě.

Z hlediska vybraných parametrů REE se jako významné ukázaly být poměry Tm/Yb, Yb/Lu a prvky Gd a Tb. Prvky vzácných zemin se často v zemské kůře vyskytují společně, většinou v minerálech složených z fosfátů, uhličitanů, fluoridů a křemičitanů. Tyto prvky se vyskytují jak v povrchových, tak i v hloubkových zónách litosféry (Alex a kol. 1998). Byly potvrzeny jak pozitivní, tak negativní efekty prvků vzácných zemin na životaschopnost rostlin. Například Fashui a kol. (2002) na základě experimentů vytvořil hypotézu, že REE (v případě této studie konkrétně Ce^{3+}) vstupují do chloroplastů, kde nahrazují Mg^{2+} ionty a vytváří tak Ce-chlorofyl. Tato substituce byla pozorována na špenátu, který vykazoval ve srovnání s kontrolou výraznější růstovou aktivitu. Gadolinium a další prvky patřící do skupiny REE také prokazatelně blokují

kanály uvolňující vápník v endoplazmatickém retikulu (Klusener a kol. 1995; Schwenke a Wagner 1992; Johannes a kol. 1992). Uvedené příklady jsou jen malým výčtem efektů REE na rostlinu. Když pomíneme tyto konkrétní vlivy na fyziologii a biochemii rostlin, z výše uvedeného je patrné, že výskyt REE v rostlinách je běžný a jejich zdrojem je primárně půda a podloží. Transport do rostliny je tak realizován a ovlivňován aktivitami kořenového systému rostlin. Jak bylo zmíněno výše, struktura a funkce kořenového systému je silně závislá na genetické výbavě rostliny a dá se opět očekávat, že odlišné odrůdy révy mohou přijímat REE rozdílným způsobem. Tyto prvky jsou v rostlině distribuovány s klesající koncentrací od kořenů k plodům. Ve vínech jako takových jsou REE obsaženy v ultrastopových koncentracích, nicméně dle ANOVA se dá usuzovat, že tyto malé nuance lze využít k diskriminaci podle odrůd.



Obr. 53: Krabicové grafy pro poměry Tm/Yb a Yb/Lu a prvky Al (μg/l) a Gd (ng/l). Poměry jsou bezrozměrné

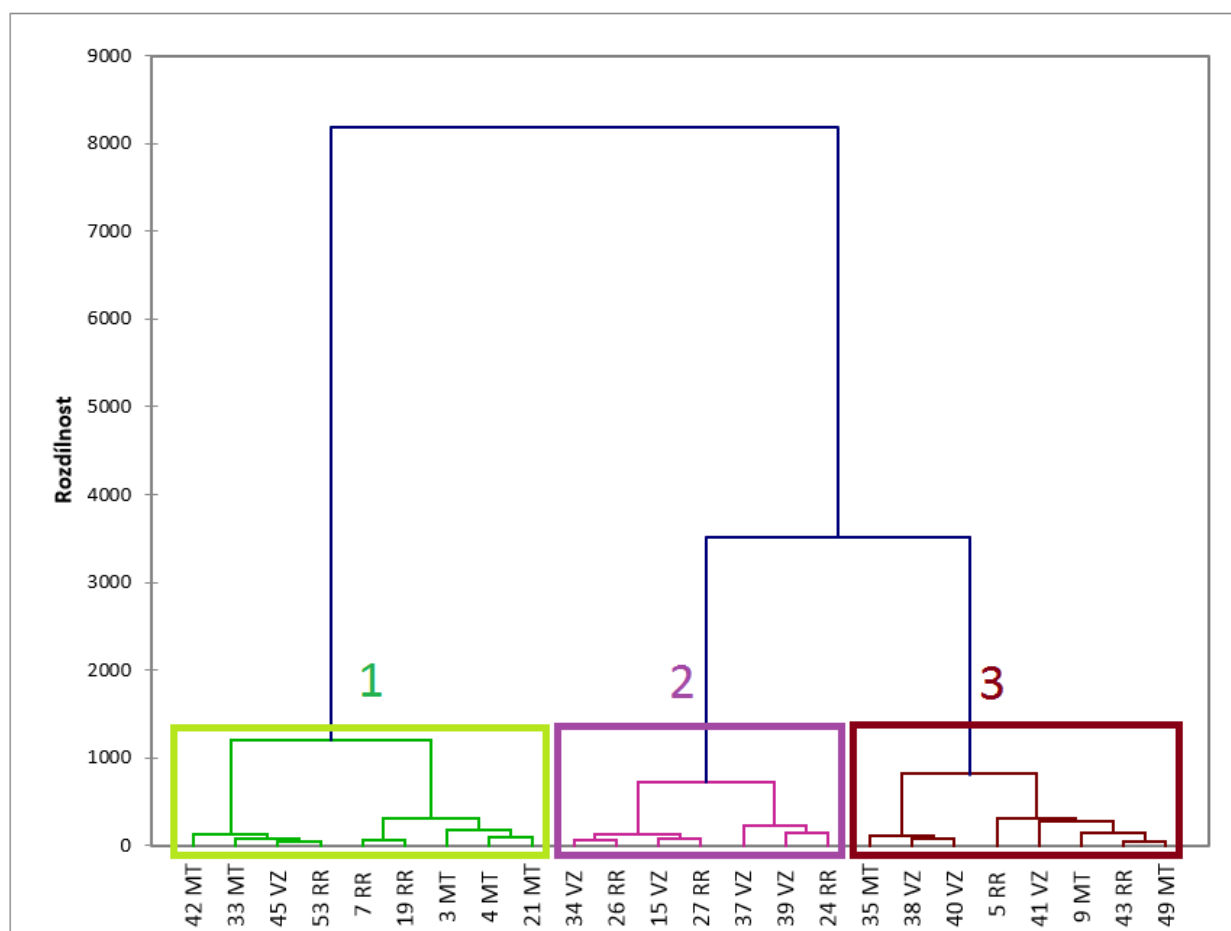


Obr. 54: Krabicové grafy pro poměry Mo/Sn a Mn/Cr a prvky Sn ($\mu\text{g/l}$) a Tb (ng/l). Poměry jsou bezrozměrné

Analýzou naměřených dat se nepotvrdil předpoklad vlivu rozdílných odrůd na obsah polyfenolických látek, alespoň ne na skupinu měřených sloučenin v testovaných vínech. Je pravděpodobné, že v případě vín červených, které obsahují výrazně vyšší množství těchto látek, by mohl význam těchto parametrů vzrůstat.

5.3.3.3. Shluková analýza

V této kapitole jsou shrnuty výsledky shlukové analýzy 24 bílých vín tří odrůd (VZ, RR, MT). Vstupní data do analýzy byly založeny na proměnných vybraných analýzou rozptylu. Jako slučovací technika byla zvolena Wardova metoda a jako metrická metoda Chebychevových vzdáleností. Primárním výstupem je dendrogram (obr. 55), který vizuálně zobrazuje rozdílnosti a podobnosti mezi jednotlivými vzorky odrůdových vín.



Obr. 55: Dendrogram shlukové analýzy bílých odrůdových vín

Jak je viditelné z dendrogramu shlukové analýzy, došlo sice k rozdělení do 3 oddělených shluků, nedošlo však k účinnému shlukování vín stejných odrůd. V jednotlivých majoritních **klastrech 1, 2 a 3** přesto existují určité konexe mezi víny. Vína odrůdy Müller-Thurgau se téměř výhradně vyčlenila v prvním klastru společně s víny odrůdy Ryzlink rýnský. Toto spojení má zřejmě původ v křížení odrůd révy vinné. MT je křížencem právě RR s Madlenkou královskou. Dále jsou vína distribuována v clusterech víceméně bez viditelných propojení. Tento

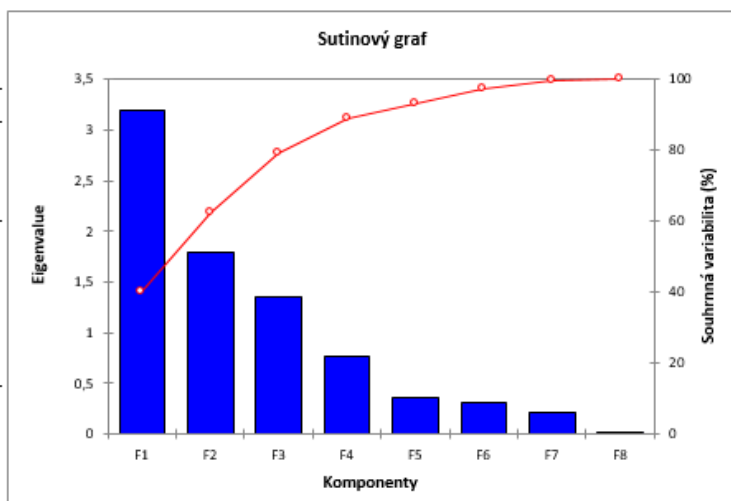
nedostatečný diskriminační výsledek lze přičítat faktu, že shluková analýza nevyužívá k hledání podobností a odlišností diskriminátoru, v tomto případě znalostí o odrůdách vzorků. Rozdíly v parametrech naměřených ve vínech tak nejsou dostatečně výrazné, aby došlo k dokonalému shlukování dle odrůd. K tomu, že se neoddělila ani vína odrůdy Veltlínské zelené pravděpodobně přispívá i to, že je tato odrůda geneticky podobná odrůdám Tramín, ze kterých byl křížením vyšlechtěn RR, který je součástí tohoto testu. Tyto tři testované, v ČR velice populární odrůdy tak sdílejí určitá genetická propojení, ke kterým se váží i fyziologické a metabolické podobnosti (Sedlo a Ludvíková 2014). Existuje zde předpoklad, že odrůdy autochtonní a specifické bude možné diskriminovat s vyšší úspěšností.

5.3.3.4. Analýza hlavních komponent

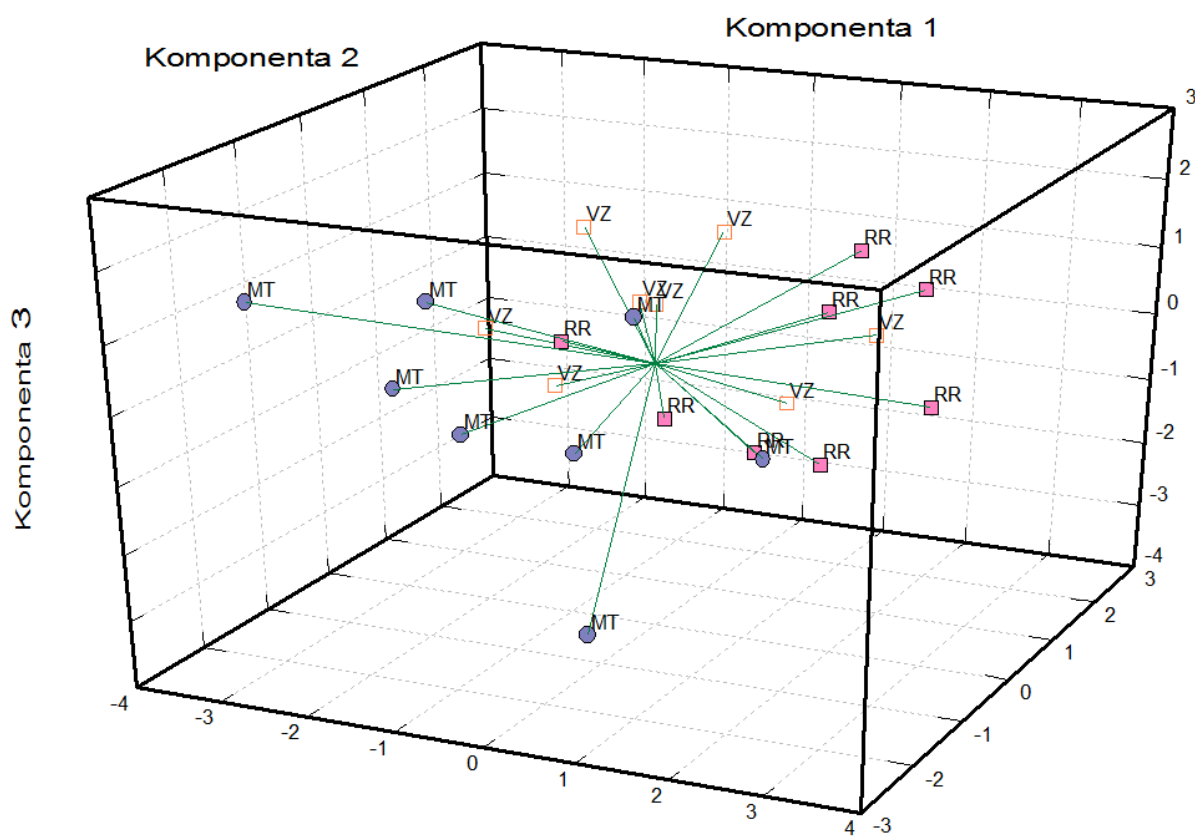
Analýza hlavních komponent bílých odrůdových vín sloužila k vizualizaci a vyhodnocení charakteristik vzorků založených na 8 proměnných vybraných analýzou rozptylu. Hlavním cílem bylo snížení počtu výchozích parametrů a zkoncentrování výchozí informace do menšího počtu komponent. Informace z vybraných 8 parametrů byly pomocí PCA (metoda Pearsonovy korelace, varimax rotace) rozděleny do 8 hlavních komponent. Míra uložené variability v jednotlivých komponentech byla popsána hodnotou eigenvalue. Čím vyšší byla eigenvalue, tím více informací bylo v dané komponentě uloženo. Dle Kaiserova kritéria byly dále vyřazeny všechny komponenty s eigenvalue < 1 , kdy množství informací uložené v takové komponentě odpovídá informaci parametru výchozího, nebo je menší. V tomto případě byly na základě Kaiserova kritéria stanoveny **3 hlavní komponenty** popisujících dohromady 79,29% celkové variability (viz tabulka 45 a obr. 56). Na základě hlavních komponent byly sestaveny grafy (obrázek 57, 58 a 59) zobrazující jednotlivé projekce jak proměnných tak vín do faktorového prostoru a faktorových rovin.

Tabulka 45: Souhrn hlavních komponent – odrůdová vína

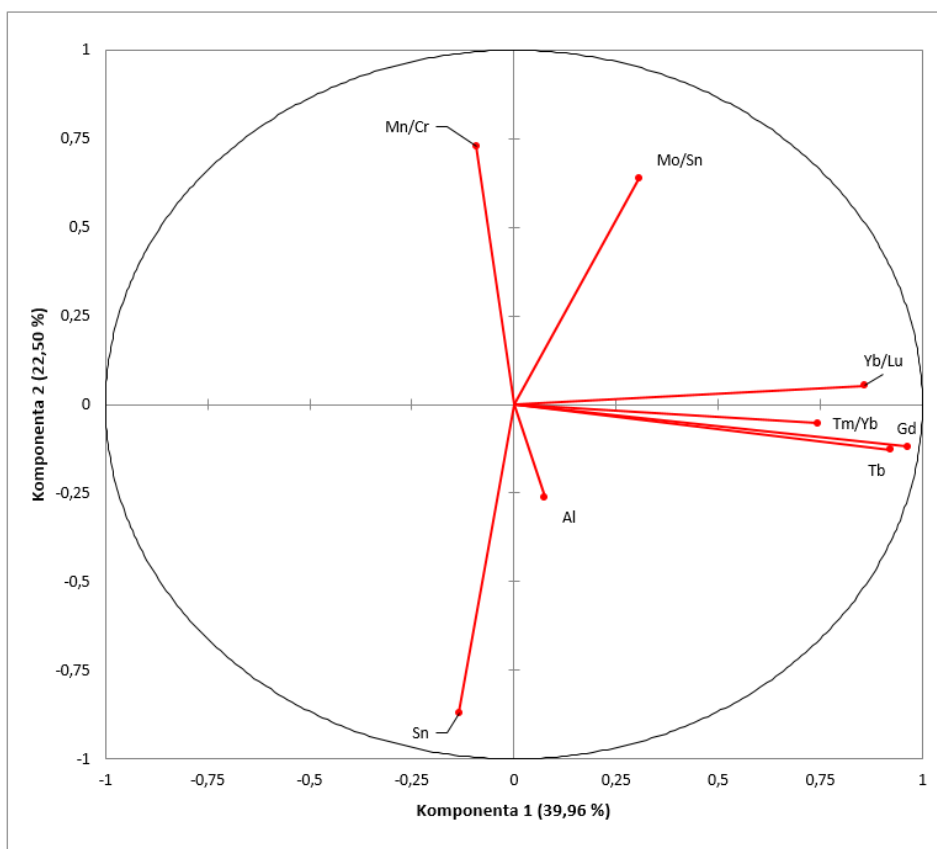
Komponenta	Eigenvalue	Variabilita (%)	Souhrnná %
F1	3,1966	39,9572	39,9572
F2	1,7999	22,4986	62,4558
F3	1,3469	16,8367	79,2926
F4	0,7598	9,4974	88,7899
F5	0,3598	4,4977	93,2876
F6	0,3061	3,8258	97,1134
F7	0,2173	2,7167	99,8301
F8	0,0136	0,1699	100,0000



Obr. 56: Sutinový graf demonstrující význam jednotlivých hlavních komponent



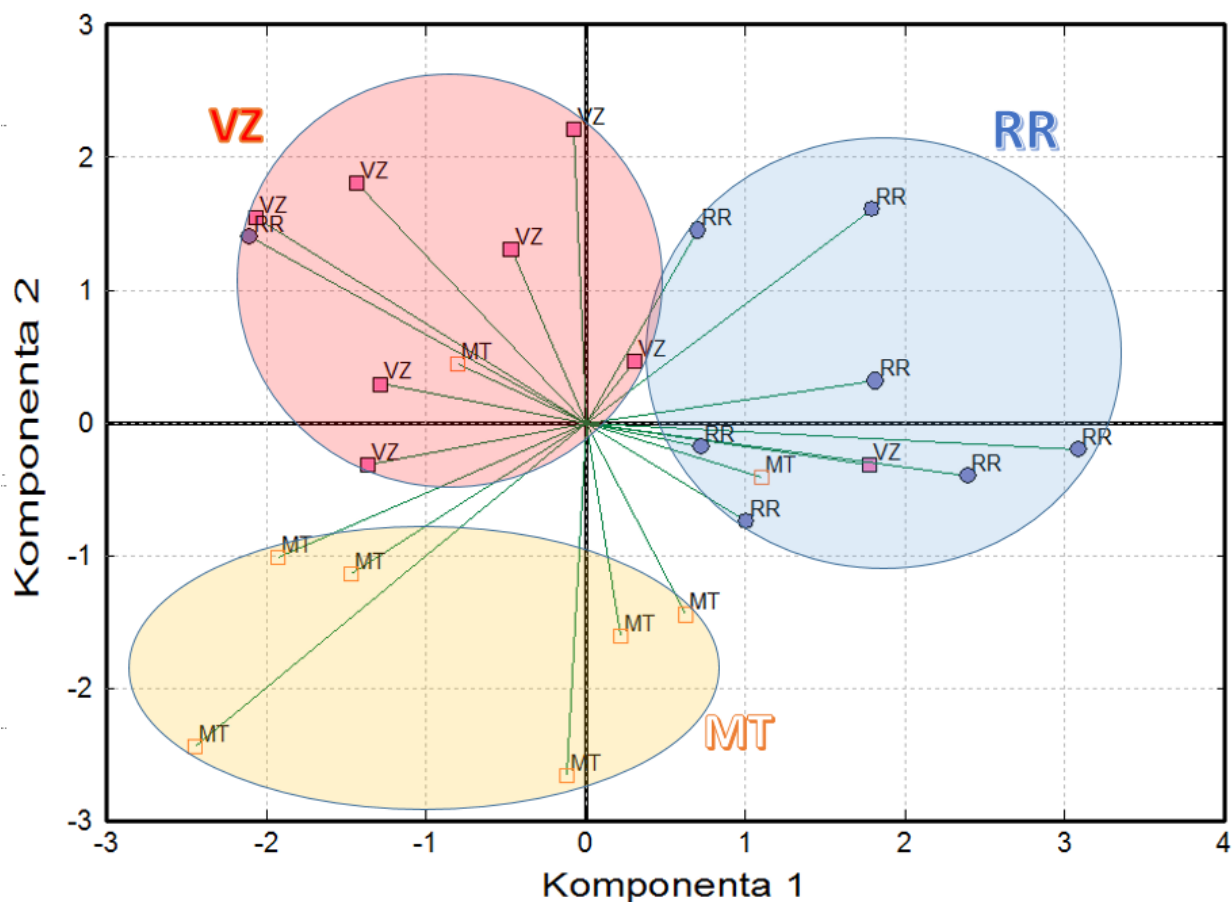
Obr. 57: Projekce vzorků vín do faktorového prostoru hlavních komponent 1,2 a 3



Obr. 58: Rozptylový graf – Projekce proměnných do faktorové roviny 1 a 2

Disperzí faktorových skóre jednotlivých odrůdových vín do faktorového 3D grafu (Obrázek 57) a následnou varimax rotací os bylo stanoveno optimální dvourozměrné zobrazení faktorové roviny komponent 1 a 2. Komponenty 1 a 2 zahrnují 62,45% celkové variability z původního souboru dat. Tyto komponenty jsou pozitivně a negativně korelovány výchozími proměnnými (chemickým složením odrůdových vín). Tyto vlivy jsou graficky definovány v rozptylovém grafu (obrázek 58). **Komponenta 1** byla nejvíce korelována prvky vzácných zemin a jejich poměry. Naopak mírná negativní souvztažnost byla pozorována s Sn a poměrem Mn/Cr. **Komponenta 2** byla výrazně korelována poměry Mn/Cr a Mo/Sn a silně negativně cínem. Slabá negativní korelace druhé hlavní komponenty s proměnnými také byla s parametrem Al.

Jednotlivé proměnné dále korelovaly více či méně mezi sebou. Nejsilnější meziparametrové propojení se dle předpokladů dalo pozorovat u prvků vzácných zemin. Tyto prvky mají vzájemně velice podobné chemické a fyzikální vlastnosti. Další významné meziparametrové souvztažnosti již nebyly patrné.



Obr. 59: *Projekce vzorků odrůdových vín do faktorové roviny komponent 1 a 2*

Z grafického zobrazení disperze PCA skóre jednotlivých odrůdových vín, do faktorové roviny hlavních komponent 1 a 2, je na první pohled zřejmé rozdělení pozorování do 3 oblastí sdružující až na několik výjimek vína vždy jedné odrůdy. Skóre jednotlivých vzorků vín odrůdy Veltlínské zelené byly zařazeny do 1. kvadrantu faktorové roviny s pozitivním skóre u druhé komponenty, Ryzlink rýnský do 2. a 4. kvadrantu s pozitivním skóre jak u první, tak u druhé komponenty a relativně široká oblast grafu v 3. a 4. kvadrantu v byla obsazena pozorováními z kategorie vín Müller Thurgau v zóně negativního skóre 1. i 2. komponenty. Propojením 2D rozptylových grafů **proměnných a vzorků** lze vyhodnotit (obrázek 58 a 59), v čem jsou jednotlivé odrůdy specifické relativně k ostatním studovaným. Vzorky vín odrůdy RR mají pozitivní skóre pro komponentu 1, což znamená, že obsahují v průměru vyšší koncentrace prvků vzácných zemin, než vína MT a VZ. Vína odrůdy MT mají záporné skóre jak pro první tak i druhou komponentu, které jsou v této oblasti korelovány koncentrací Sn. To znamená, že vína MT v průměru obsahují vyšší množství cínu relativně k ostatním testovaným odrůdám. Z pozice v rozptylovém grafu lze také vyčíst, že tato vína obsahují relativně menší množství

RRE než vína RR. To stejné platí pro vína odrůdy VZ. Ty jsou dále oproti ostatním analyzovaným odrůdám dle PCA charakteristické vyšší průměrnou hodnotou poměru Mn/Cr.

Při podrobnějším studiu PCA faktorové roviny lze dále pozorovat, že ne vždy došlo k úplnému rozdělení vzorků do skupiny, kam dle označení patří. Do zóny vín Veltlínské zelené byl na základě PCA zařazen i jeden vzorek Ryzlinku rýnského a jeden vzorek Müller Thurgau. Podobné prolínání špatně zařazených vín bylo pozorováno i do izolované oblasti PCA grafu odpovídající vínům odrůdy Ryzlink rýnský. Jak již bylo zmíněno v diskusi v kapitole 4.3.3.2., rozdíly mezi těmito třemi odrůdami nejsou, co se týče prvkového složení, příliš velké. Kromě faktorů ovlivňujících prvkové složení vína mohou do výsledného faktorového skóre PCA promluvit i malé chyby při analýze v laboratoři. PCA i shluková analýza charakterizují vína a jejich vzájemné podobnosti a rozdílnosti bez použití diskriminátoru, tedy bez znalosti skupiny, do které vzorek patří. Nepřikládají tak větší či menší váhu proměnným, aby maximalizovaly pravděpodobnost správného zařazení, všechny původní proměnné mají vždy shodný význam. Pomocí PCA tak nedošlo k dokonalé diskriminaci všech analyzovaných vín, přesto byla úspěšnost na úrovni 83,3%.

5.3.3.5. Kanonická diskriminační analýza

Diskriminační analýzou byly diskriminovány a klasifikovány vzorky vín dle odrůdy révy vinné, kdy klasifikačním diskriminátorem byly právě jednotlivé vybrané odrůdy (Müller thurgau, Veltlínské zelené a Ryzlink rýnský). Na rozdíl od shlukové analýzy a analýzy hlavních komponent tato parametrická metoda využívá znalosti o počtu skupin a příslušnosti vzorků k maximalizaci rozdílnosti mezi odrůdami a minimalizaci rozdílností vín stejné odrůdy. Byla provedena diskriminace bílých vín dle odrůd a vytvořeny diskriminační a klasifikační funkce popisující matematicky vlastnosti jednotlivých odrůd a jsou využitelné k určení odrůdy známých i neznámých vzorků.

Vstupní parametry byly do DA vybrány na základě analýzy rozptylu. Sekundární třídění proměnných dle významu pro přesnost klasifikace bylo prováděno pomocí kritéria Wilksovy lambdy (Tabulka 46). Čím blíže je lambda hodnotě 0, tím významnější vliv má proměnná na klasifikaci. Krokovou dopřednou selekcí byly postupně přidávány do modelu proměnné na základě hodnoty lambda do té doby, dokud rostla přesnost modelu, respektive efektivita rozdělení podoblastí. Nakonec byly do modelu zařazeny všechny proměnné vyselektované analýzou rozptylu. Byly vypočítány dvě statisticky významné diskriminační funkce popisující

vnitřní propojení mezi vzorky vín a proměnnými. Podíl Mo/Sn bylo nejvýznamnější korelační proměnnou pro funkci 1 a poměr Yb/Lu pro funkci 2 (Tabulka 46).

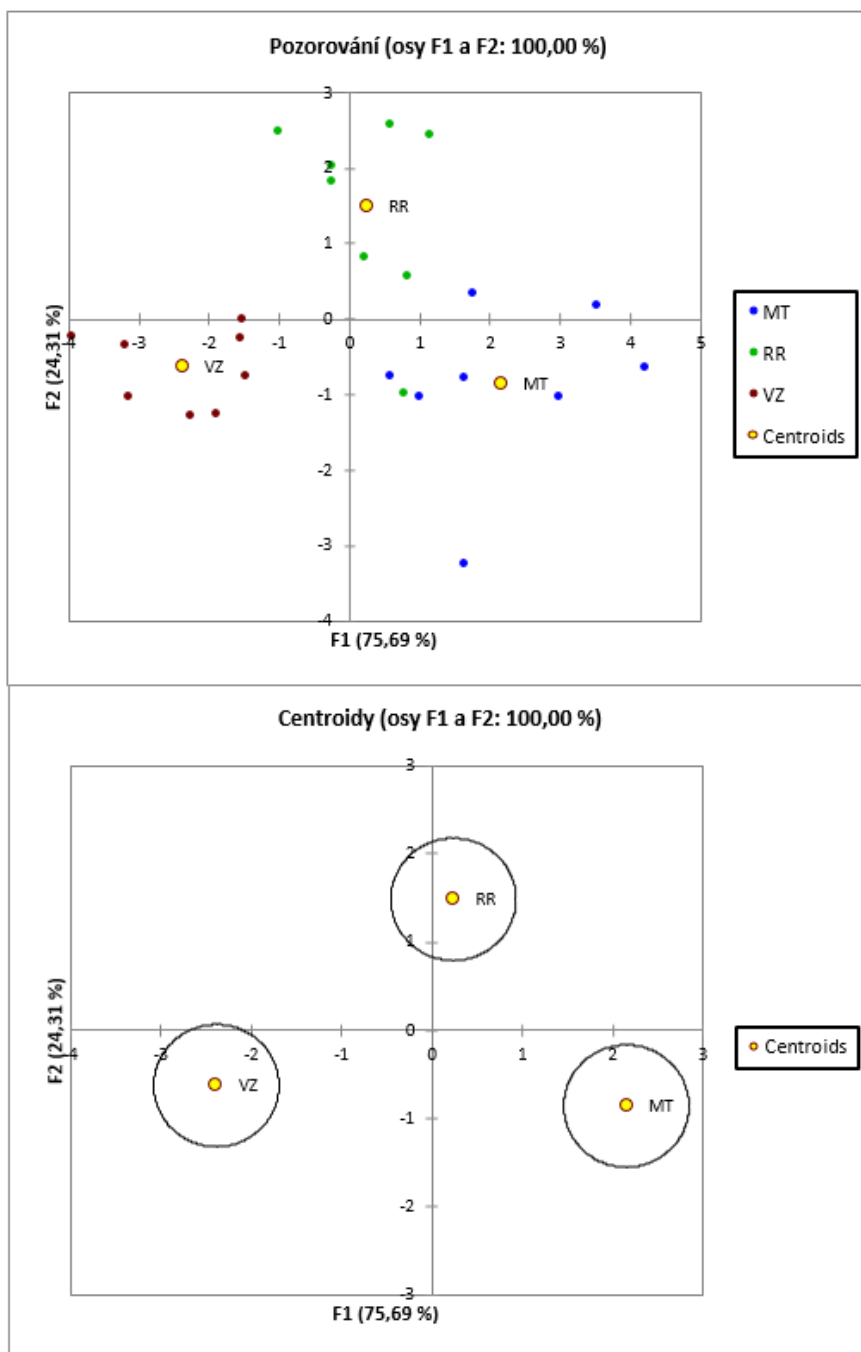
Tabulka 46: Diskriminační funkce a Wilksovy Lambdy jednotlivých proměnných z modelu

Proměnná	Funkce 1	Funkce 2	W. Lambda
Sn	-0,5019	0,2249	0,7706
Gd	-0,1227	0,6390	0,7594
Al	-0,5973	0,1251	0,7065
Mn/Cr	0,4605	-0,3084	0,7775
Mo/Sn	0,4950	0,2681	0,7641
Tm/Yb	-0,2693	0,6914	0,6745
Yb/Lu	0,1519	0,6992	0,7079
Tb	-0,0745	0,5891	0,8013

Rozptylový graf (obr. 60) vizualizuje rozdělení vzorků do jednotlivých skupin podle diskriminačních funkcí. Dle centroidů a kružnic spolehlivosti (spodní část obrázku 60) je patrné téměř úplné rozdělení testovaných odrůd. Všechny tři grupy jsou dostatečně mezi sebou rozlišené se vzdáleností centroidů > 3 (tabulka 47). Největší vzdálenost mezi centroidy jednotlivých odrůdových skupin byla stanovena mezi Veltlínským zeleným a Müller thurgau (4,55). Nejbližší jsou si v modelu grupy zahrnující pozorování vín odrůd RR a MT. Jak již bylo dříve zmíněno v kapitole o shlukové analýze odrůdových vín (4.3.3.3.), odrůda MT má genetického předka právě RR, který byl křížen s odrůdou Madlenka Královská (Sedlo a Ludvíková 2014). Toto křížení bylo pravděpodobně hlavním důvodem relativně malých vzdáleností mezi centroidy v modelu.

Tabulka 47: Vzdálenost mezi centroidy jednotlivých odrůd

Centroidy	Vzdálenost mezi centroidy
RR - MT	3,0258
VZ - RR	3,3693
VZ - MT	4,5452



Obr. 60: Rozptylový graf klasifikačních funkcí včetně zobrazení centroidů a vzorků

Primárním výstupem diskriminační analýzy jsou vytvořené klasifikační predikční funkce (tabulka 48), matematicky popisující jednotlivé podoblasti. Tyto funkce slouží ke klasifikaci vzorků známého původu i vzorků s neznámým původem, kdy na základě dosazení změřených vyselektovaných proměnných lze s určitou pravděpodobností zařadit vzorek do jedné z 3 odrůdových skupin, nebo konstatovat, nebo že daný vzorek pochází či nepochází z dané odrůdy hroznů révy vinné. Samotná diskriminace a klasifikace vín byla založena na Mahalanobisových čtvercových vzdálenostech pozorování od centroidů a posteriorních

pravděpodobnostech pro každý vzorek a každou skupinu. Vína jsou tak klasifikována do skupin na základě výpočtu vzdáleností od modelových centroidů z klasifikačních funkcí. Stanovené funkce umožnily klasifikaci známých vzorků vín dle odrůd se 95,83% úspěšností (tabulka 49).

Tabulka 48: *Predikční klasifikační funkce pro odrůdová vína*

	MT	RR	VZ
Intercept	-214,5646	-244,6373	-218,0577
Sn	1,9640	2,7521	1,5888
Gd	-0,7181	-0,7268	-0,7679
Al	0,0008	0,0042	0,0133
Mn/Cr	-0,2186	-0,2683	-0,2238
Mo/Sn	7,1596	6,6215	1,6538
Tm/Yb	1047,3139	1270,7157	1295,0912
Yb/Lu	62,9148	62,4405	53,2910
Tb	1,7782	1,8392	2,1929

Tabulka 49: *Klasifikační matice modelu pro odrůdová vína*

Odrůda	MT	RR	VZ	Celkem	Správnost zařazení %
MT	8	0	0	8	100,00%
RR	1	7	0	8	87,50%
VZ	0	0	8	8	100,00%
Celkem	9	7	8	24	95,83%

Pro ověření správnosti klasifikačního modelu bylo třeba provést křížovou validaci. Jedná se o testování vyřazením vždy jednoho konkrétního vzorku z modelu, který se poté chová jako neznámý vzorek. Predikční schopnosti jsou po té ověřeny na nově sestaveném modelu, podle kterého je konkrétní vyřazený vzorek klasifikován. Výsledkem této validace bylo zařazení „neznámých“ vzorků se 70,83% úspěšností. Snižující se predikční schopnost modelu oproti základní klasifikaci, která byla téměř stoprocentní, je způsobena dvěma faktory. Vyřazený neznámý vzorek není klasifikován s pomocí diskriminátoru konkrétní odrůdy. Druhým významným vlivem je fakt, že křížovou validací se vždy z modelu vyřadí jeden vzorek. V případě, že je model postavený na 3x 8 vzorcích odrůdových vín, vždy dojde při jednotlivých krocích křížové validace k poklesu modelových dat o 12,5% v rámci skupiny ze které je vzorek odebrán. V absolutním počtu vín se jedná o 7 nesprávně zařazených vzorků z 24. Stejně jako v případě autentifikace vín dle geografického původu se dá očekávat, že rozšířením databáze by se zvyšovala robustnost klasifikačního modelu.

Tabulka 50: *Matice křížové validace modelu pro bílá vína*

Odrůda	MT	RR	VZ	Celkem	Správnost zařazení %
MT	5	3	0	8	62,50%
RR	2	6	0	8	75,00%
VZ	0	2	6	8	75,00%
Celkem	7	11	6	24	70,83%

Existuje celá řada publikací (viz. teoretická část) zabývající se klasifikací odrůdových vín. Žádná však nemodeluje systém pouze pomocí parametrů s prvkové analýzy. Ve většině se případů se jedná o hybridní model z parametrů elementární analýzy a kupříkladu NMR nebo organické analýzy. Tematicky nejbližší studií k této dizertační práci je publikace vypracovaná Charltonem a kol. (2010), kteří aplikovali vícerozměrné diskriminační systémy ke klasifikaci vín dle odrůd a ročníků. Experimenty prováděli na vzorcích vín z České republiky, Maďarska, Rumunska a Jihoafrické republiky. Skupina vín z České republiky zahrnovala stejné odrůdy jako tato dizertační práce, čili MT, RR a VZ. Pracovali však s výrazně vyšším počtem vzorků a to celkem se 151 vzorky z ČR. Data zpracovávali pomocí alternativních klasifikačních technik – technikou klasifikačního a regresního stromu (CART) a parciální diskriminace nejmenších čtverců (DPLS). Jako prvkové parametry pro rozdělení vín dle odrůd byly určeny Ca, Li, Fe a Si a z organických parametrů kyselina šikimová a etanolamin. Na základě CART analýzy byli schopni klasifikovat vína s přibližně 65% úspěšností a pomocí DPLS analýzy byli úspěšní téměř na 100 %.

Z výsledků této dizertační práce i z výsledků různých studií z tohoto oboru je zřejmé, že autentifikace dle odrůd je možná a že existuje celá řada rozdílných přístupů k vytvoření klasifikačních modelů. Současný model postavený pouze na elementárním profilu bude třeba rozšířit o organické látky různých druhů. Především těkavé látky vytvářející charakteristický aromatický profil specifických odrůd by mohly být silným diskriminačním parametrem.

5.3.4. Vyhodnocení možností využití prvkové analýzy a analýzy celkové antioxidační aktivity k určení systému produkce hroznů

Srovnání vlivu jednotlivých agrotechnik na prvkové složení a antioxidační vlastnosti vín a révy je základním předpokladem k vytvoření autentifikačního modelu sloužícího ke klasifikaci vín vyráběných z hroznů z odlišných zemědělských produkčních systémů. V podkapitolách budou postupně prezentovány výsledky porovnání bio agrotechniky a integrované produkce hroznů v rámci vlivu na prvkové složení révy a vína. Kromě prvkového složení byl zhodnocen vliv

rozdílných přístupů při pěstování révy na antioxidační aktivitu vín z hroznů z experimentálního vinohradu.

5.3.4.1. Prvková analýza

Výsledky srovnání agrotechnik, zahrnující průměrné koncentrace vybraných prvků v listech, bobulích a vínech jsou shrnuty v tabulkách 51, 52 a 53. Porovnávání vlivu produkčního systému na prvkové složení bylo prováděno za předpokladu, že všechny vzorky listů a bobulí byly odebírány z keřů velice blízkého stáří na vinohradech s téměř identickými vlastnostmi půdy, podloží a stejnými klimatickými podmínkami růstu. To platí i pro vzorky vín vyrobených z hroznů ze stejné produkce. Všechny tyto zmíněné vlivy tak byly vyřazeny a jakékoliv statisticky významné rozdíly v prvkovém složení byly přisouzeny rozdílům v produkčních systémech. Pro vyloučení vlivu odrůdy byly testy na rostlinných vzorcích prováděny separátně na dvou odrůdách a to Rulandském modrém (RM) a Sauvignonu (SAU).

Tabulka 51: Průměrné koncentrace stanovovaných prvků ve vzorcích listů v $\mu\text{g/g}$

Izotop	RM Bio	RM IP	SAU Bio	SAU IP
²³ Na	42,2 ± 5,4	52,2 ± 2,8	81,3 ± 2,8	46,6 ± 12,8
²⁴ Mg	2635 ± 93	1679 ± 39	2238 ± 31	2611 ± 174
²⁷ Al	60,9 ± 5,1	54,0 ± 1,7	98,2 ± 9,1	39,2 ± 1,5
³⁹ K	13716 ± 638	12469 ± 398	12079 ± 1177	14242 ± 1992
⁴⁸ Ca	14952 ± 412	18307 ± 411	17913 ± 1070	18245 ± 988
⁵⁵ Mn	58,6 ± 2,7	150 ± 8	93,4 ± 5,5	110 ± 4
⁵⁶ Fe	136 ± 6	146 ± 4	135 ± 8	112 ± 7
⁵⁹ Co	0,095 ± 0,002	0,104 ± 0,003	0,15 ± 0,01	0,102 ± 0,005
⁶⁰ Ni	8,48 ± 1,88	10,8 ± 0,6	28,9 ± 7,1	5,79 ± 0,24
⁶⁵ Cu	325 ± 19	170 ± 5	713 ± 61	104 ± 5
⁶⁶ Zn	12,9 ± 0,7	26,4 ± 0,8	19,0 ± 1,2	27,14 ± 1,6
⁷⁵ As	0,773 ± 0,03	0,820 ± 0,024	1,075 ± 0,036	0,736 ± 0,010
⁸⁸ Sr	83,9 ± 2,3	80,9 ± 2,1	81,8 ± 5,8	84,1 ± 3,9
⁹⁵ Mo	0,318 ± 0,018	0,219 ± 0,005	0,174 ± 0,014	0,628 ± 0,23
¹¹¹ Cd	0,031 ± 0,004	0,037 ± 0,002	0,06 ± 0,005	0,026 ± 0,002
¹³⁷ Ba	9,38 ± 0,41	23,5 ± 0,5	14,3 ± 1,5	13,2 ± 0,3
²⁰⁸ Pb	0,500 ± 0,036	0,615 ± 0,067	0,77 ± 0,09	0,382 ± 0,023

Hodnoty jsou průměry ± směrodatná odchylka 36 separátně připravených vzorků (18 odběrových míst. Vzorky připraveny v duplikátech)

Tabulka 52: Průměrné koncentrace stanovovaných prvků ve vzorcích bobulí v $\mu\text{g/g}$

Izotop	RM Bio	RM IP	SAU Bio	SAU IP
²³ Na	6,65 ± 0,79	5,2 ± 0,73	4,13 ± 0,40	7,18 ± 1,91
²⁴ Mg	413 ± 6	434 ± 9	274 ± 6	351 ± 5
²⁷ Al	45,7 ± 3,4	72,1 ± 0,8	44,4 ± 0,9	46,7 ± 7,2
³⁹ K	13399 ± 1095	13854 ± 392	12429 ± 296	12756 ± 373
⁴⁸ Ca	657 ± 33	783 ± 18	527 ± 10	575 ± 33
⁵⁵ Mn	1,73 ± 0,02	2,12 ± 0,09	2,86 ± 0,066	3,6 ± 0,4
⁵⁶ Fe	17,3 ± 1,2	11,6 ± 1,0	12,4 ± 0,29	12,1 ± 3,5
⁵⁹ Co	0,002 ± 0,0002	0,004 ± 0,0005	0,002 ± 0,0004	0,007 ± 0,002
⁶⁰ Ni	<LOD	3,24 ± 0,37	<LOD	<LOD
⁶⁵ Cu	7,81 ± 0,38	4,45 ± 0,33	4,56 ± 0,22	2,85 ± 0,14
⁶⁶ Zn	1,6 ± 0,08	2,29 ± 0,25	1,15 ± 0,015	1,77 ± 0,17
⁷⁵ As	0,024 ± 0,003	0,031 ± 0,0003	0,016 ± 0,001	0,17 ± 0,027
⁸⁸ Sr	3,11 ± 0,12	2,86 ± 0,06	1,55 ± 0,04	2,19 ± 0,07
⁹⁵ Mo	0,045 ± 0,005	0,038 ± 0,003	0,013 ± 0,001	0,12 ± 0,009
¹¹¹ Cd	0,028 ± 0,004	0,018 ± 0,003	<LOD	<LOD
¹³⁷ Ba	0,467 ± 0,022	1,16 ± 0,03	0,64 ± 0,034	0,461 ± 0,020
²⁰⁸ Pb	<LOD	0,033 ± 0,006	<LOD	<LOD

Hodnoty jsou průměry ± směrodatná odchylka 36 separátně připravených vzorků (18 odběrových míst. Vzorky připraveny v duplikátech)

Tabulka 53: Průměrné koncentrace stanovovaných prvků ve vzorcích vín v $\mu\text{g/l}$

Izotop	SAU Bio	SAU IP
²⁴ Mg	68550 ± 300	73775 ± 2975
³⁹ K	713 ± 11	618 ± 25
⁴⁸ Ca	169 ± 8	172 ± 6
⁵⁵ Mn	311 ± 21	380 ± 15
⁵⁶ Fe	321 ± 9	312 ± 11
⁵⁹ Co	0,882 ± 0,425	0,873 ± 0,043
⁶⁰ Ni	18,7 ± 0,19	22,1 ± 0,10
⁶⁵ Cu	931 ± 37	354 ± 24
⁶⁶ Zn	508 ± 6	567 ± 24
⁷⁵ As	22,3 ± 4,6	27,3 ± 0,18
⁸⁸ Sr	162 ± 0,6	135 ± 4,5
⁹⁵ Mo	<LOD	<LOD
¹¹¹ Cd	<LOD	<LOD
¹³⁷ Ba	30,2 ± 0,2	35,0 ± 1,1
²⁰⁸ Pb	2,353 ± 0,048	2,18 ± 0,045

Hodnoty jsou průměr ± směrodatná odchylka 5 měření. K a Ca jsou uvedeny v mg/l .

Nejvýraznější rozdíly byly pozorovány v reziduální koncentraci mědi ve všech typech vzorků. Průměrná koncentrace mědi v listech, hroznech a víně byla statisticky významně vyšší ($P < 0,05$) ve vzorcích z ekologické produkce. Průměrná koncentrace v listech z bioprodukce byla 325 ± 19 ug/g Cu pro odrůdu Rulandské modré a 713 ± 61 ug/g Cu pro Sauvignon. V listech z révy ošetřované způsobem integrované produkce hroznů byly naměřeny koncentrace 170 ± 5 ug/g Cu (Rulandské modré) a 104 ± 5 ug/g Cu (Sauvignon). Průměrná koncentrace mědi v bobulích byla výrazně nižší než v listech. Ve srovnání s listy mají bobule podstatně nižší postřikovou záchytnou plochu v poměru s hmotností. Měď je také významnou součástí metaloproteinů a enzymů zodpovědných za redox procesy v rostlinných buňkách a tyto látky jsou převážně přítomny v listech (Barker a Pilbeam 2007). Porovnání průměrných koncentrací mědi v bobulích opět ukázalo vyšší podíl ve vzorcích z Ekologické produkce hroznů. Bio bobule obsahovaly $7,81 \pm 0,38$ ug/g Cu (Rulandské modré) a $4,56 \pm 0,22$ ug/g Cu (Sauvignon) mezitím co bobule z Integrované produkce obsahovaly průměrně $4,45 \pm 0,33$ ug/g Cu (Rulandské modré) a $2,85 \pm 0,14$ ug/g Cu (Sauvignon). Tento významný rozdíl byl nakonec potvrzen i ve vzorcích vína, kdy bio Sauvignon vykazoval téměř 3x vyšší koncentraci mědi než Sauvignon vyrobený z hroznů z Integrované produkce (931 ± 37 ug/l proti 354 ± 24 ug/l). Residuum mědi v těchto biovíněch bylo velice blízko limitu 1 mg/l stanoveného legislativou. Vysoké koncentrace mědi mohou způsobit svíravou chuť vína a mohou být zdrojem vzniku zákalů, převážně ve vínech s vyšším podílem taninů v prostředí vyššího pH (Peynaud 1987; Kment a kol. 2005).

Tyto výsledky odpovídají dříve publikovaným poznatkům. Vrček a kol. (2011) stanovili vyšší koncentraci mědi v chorvatských biovíněch v porovnání s víny z konvenční produkce. Vína splňovala limitní koncentraci 1 mg/l. Martins a kol. (2014) vyhodnocovali dopad aplikace bordeaux směsi ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca(OH)}_2$) na obsah mědi v hroznech a moštu. Množství a aplikační dávky byly založeny na standardním postupu ošetřování bio vinic. Bobule z révy ošetřované bordeaux směsí vykazovaly 7 – 14x vyšší koncentraci mědi než v kontrolních vzorcích a testovaný mošt obsahoval 4x vyšší koncentraci než v kontrole. Fakt, že ekologický způsob ošetřování révy může zapříčinit relativně zvýšený obsah mědi v rostlině a následně ve víně je pravděpodobně způsoben legislativním povolením vyšších dávek fungicidů na bázi mědi (ve srovnání s IP). Pro Bio produkci je legislativně stanoven limit 6 kg/ha čisté mědi oproti 2 kg/ha v rámci IP. Tento zvýšený limit je kompenzací zákazu ostatních účinných syntetických fungicidů, které je využívat v IP. Měď je tak jediným účinným prostředkem proti plísním na biovinicích.

Je důležité zmínit, že aplikační dávka fungicidů na bázi mědi není jediným faktorem ovlivňující zbytkovou koncentraci mědi v révě a ve víně. Garcia-Esparza a kol. (2006) studovali vliv počtu jednotlivých aplikací, celkové dávky a času mezi posledním postřikem a sklizní na obsah mědi v bobulích a vínech. Objevili korelaci mezi obsahem mědi a dobou mezi posledním postřikem a sklizní. Průměrná koncentrace mědi v hroznech se zvyšovala v závislosti na zkracujícím se intervalu mezi poslední aplikací a sklizní. Tento výsledek podporuje data z této dizertační práce. Poslední aplikace Cu fungicidu Kocide 2000 na bio vinici v Ivaňi byla 32 dní před sběrem hroznů oproti 41 dnům na vinici ošetřované systémem IP.

Kromě významných rozdílů v koncentracích mědi byly odlišné přístupy v ošetřování révy odzrcadleny také v koncentraci zinku a manganu. Relativně vyšší koncentrace těchto prvků byly pozorovány ve vzorcích z IP. Kontrast v koncentracích zinku a manganu mezi Bio a IP vzorky nebyl tak výrazný jako v případě mědi, ale byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$). Průměrné koncentrace zinku v listech bio révy byly $12 \pm 0,7$ ug/g (Rulandské modré) a $19 \pm 1,2$ ug/g (Sauvignon). V porovnání, listy révy z IP obsahovaly $26,4 \pm 0,8$ ug/g Zn (Rulandské modré) a $27,14 \pm 1,6$ ug/g Zn (Sauvignon). Bobule z EP obsahovaly průměrné množství $1,6 \pm 0,17$ ug/g Zn (Rulandské modré) a $1,15 \pm 0,015$ ug/g Zn (Sauvignon), mezitím co bobule z IP vykazovaly koncentrace $2,29 \pm 0,25$ ug/g (Rulandské modré) a $1,77 \pm 0,17$ ug/g (Sauvignon). Vína vyrobená z těchto hroznů obsahovala v průměru 508 ± 6 ug/l (Bio Sauvignon) a 567 ± 24 ug/g (IP Sauvignon) zinku. Obvykle vína obsahují 200 – 500 ug/l zinku, kdy zvýšená koncentrace tohoto prvku může způsobovat trpkou chuť, která se však projevuje až v koncentracích nad 5 mg/l, což je také limit daný legislativou (Michlovský 2014).

Co se týče obsahu manganu, průměrná koncentrace v listech bio révy byla $58,6 \pm 2,7$ ug/g (Rulandské modré), $93,4 \pm 5,5$ ug/g (Sauvignon), mezitím co listy z révy ošetřované systémem IP byly stanoveny koncentrace 150 ± 8 ug/g (Rulandské modré) a 110 ± 4 ug/g (Sauvignon). Bobule z bio hroznů obsahovaly $1,73 \pm 0,02$ ug/g (Rulandské modré) a $2,86 \pm 0,066$ ug/g (Sauvignon), ve srovnání s $2,12 \pm 0,09$ ug/g (Rulandské modré) a $3,57 \pm 0,7$ ug/g (Sauvignon). Bio Sauvignon v průměru obsahoval 311 ± 21 ug/l manganu – méně než v IP Sauvignonu, který vykazoval v průměru koncentraci 380 ± 15 ug/l. Mangan ve víně se obvykle pohybuje v koncentracích v rozsahu od 300 do 400 ug/l. Kromě kontaminace ochrannými prostředky je koncentrace výrazně závislá na obsahu tohoto prvku v půdě. Například půdy ve Francouzské oblasti Beaujolais jsou velmi bohaté na mangan, což se projevuje i na vínech z této lokality, kdy koncentrace manganu dosahuje až úrovní 4 mg/l (Michlovský 2014).

Relativně vyšší koncentrace zinku a manganu ve vzorcích z Integrované produkce hroznů jsou pravděpodobně spojeny s aplikací ochranného prostředku Ridomil Gold MZ 68

WP, což je fungicid na bázi *dithiokarbamátu mancozeb* $[C_4H_6N_2S_4Mn]_x(Zn)_y$, obsahující zinek a mangan v komplexní formě. V Ekologickém vinohradnictví je použití těchto látek striktně zakázáno.

La pera a kol. (2008) ve své publikaci došli k podobným závěrům. Zabývali se vlivem použití fungicidů na bázi mancozebu, zoxamidu a oxichloridu měďnatého na koncentraci Mn, Zn, Cu, Cd a Pb v Italských vínech a bobulích. Vzorky z oblastí testovacího vinohradu ošetřovaných mancozebem vykazovaly podstatně vyšší koncentrace zinku v hroznech a vínech z nich vyrobených v porovnání s neošetřovanými vzorky. Koncentrace zinku se podobně jako v případě mědi zvyšovala se zkracujícím se intervalem mezi postřikem a sklizní. Mangan vykazoval podobný trend. Aplikace výše zmíněných prostředků bylo reflektováno zvýšením koncentrace Pb a Cd jak ve vzorcích bobulí, tak i ve víně. Tento výsledek nebyl potvrzen.

Obsah ostatních naměřených elementů v listech, bobulích a ve vínech v některých případech odhalil drobné rozdíly mezi testovanými agrotechnikami, ale po hlubším rozboru již nebyly nalezeny smysluplné propojení. Koncentrace dalších, potenciálně toxických prvků nepřesáhly v testovaných vínech limity stanovené legislativou.

Z výsledků je patrné, že stanovení prvkového profilu vín má potenciál k vytvoření modelu ke klasifikaci biovín, případně k diferenciaci vín na základě rozdílného procesu produkce hroznů. Koreňovská a Suhaj (2012) s úspěchem využili prvkovou analýzu k diskriminaci slovenských biovín a vín z konvenční produkce. Analýza byla založena na měřeních 10 bílých a 5 červených biovín a 17 bílých a 10 červených vínech z konvenční produkce. Krokovou diskriminační analýzou určili jako nejvýznamnější diskriminační parametr koncentraci Fe, Cu, Ag a K. Kanonická diskriminační analýza v rámci testovaných vzorků vykazovala efektivitu 92,9% správně zařazených vzorků biovín a vín z konvenční produkce. Je patrné, že i menší počet vzorků může postačit k formaci diskriminačního modelu. Konvenční způsob ošetřování hroznů, jak bylo v teoretickém úvodu zmíněno, je ale na ústupu a je třeba se zaměřit místo na konvenční vína na vína z Integrované produkce hroznů, které již v současnosti tvoří většinu z kvalitní produkce na trhu. Dá se očekávat, že diskriminace této agrotechniky od ekologické bude pouze na základě prvkového složení obtížnější, protože oba dva systémy vyznávají podobnou filosofii minimalizace aplikací ochranných prostředků. Možnosti se otevírají v oblasti analýz organických konstituentů, kdy větší rozdíly obou agrotechnik jsou v přístupu ke hnojení a úpravě samotného vinohradu. To se projevuje na životaschopnosti révy, respektive na obsahu organických konstituentů. Spojením elementární analýzy s vhodnou separační technikou by tak mohlo být cestou k vytvoření fungujícího kontrolního mechanismu.

5.3.4.2. Celková antioxidační aktivita

Výsledky srovnání antioxidační aktivity vín vyráběných z hroznů pěstovaných odlišným způsobem jsou prezentovány v tabulce 54. Průběh kinetiky reakce roztoku DPPH s vínem vykazoval více než 50% úbytek DPPH radikálů během prvních 3 minut experimentu.

Tabulka 54: Průměrná relativní koncentrace DPPH v čase $t = 25$ min po smíchání roztoku radikálu s vínem v % a konverze na TEAC (Ekvivalent troloxu) v mmol/L troloxu.

	Bio Sauvignon	IP Sauvignon
Relativní koncentrace DPPH [%]	14,34 ± 0,65	16,3 ± 1,1
TEAC [mmol/l troloxu]	1,1 ± 0,05	1,08 ± 0,07

Hodnoty jsou průměr ± směrodatná odchylka 5 měření

Z výsledků je zjevné, že oba testované typy vín vykazují téměř identickou schopnost terminovat volné radikály. Antioxidační aktivita Sauvignonu z bioprodukce byla stanovena na $1,1 \pm 0,05$ mmol/l TEAC, zatímco Sauvignon z Integrované produkce $1,08 \pm 0,07$ mmol/l TEAC. Celková antioxidační aktivita je obvykle závislá na odrůdě a standardně se u bílých vín pohybuje v rozmezí od 0,3 – 1,2 mmol/l TEAC (Staško a kol. 2008). Na základě tohoto rozsahu se dá usoudit, že oba testované vzorky vykazují relativně vysokou antioxidační aktivitu.

Přestože nebyly pozorovány významné rozdíly v antioxidačních vlastnostech testovaných vín, existuje několik studií na téma vlivu různých způsobů pěstování révy na tvorbu látek s antioxidačními vlastnostmi. Tunttunen a Lehtonen (2001) porovnávali biovína s víny z konvenční produkce a zaměřili se na koncentraci trans-resveratrolu. Biovína v průměru obsahovala 2x vyšší obsah tohoto stilbenoidu. Vrček a kol. (2011) na základě experimentů poukázali na pozitivní vliv ekologického vinohradnictví na tvorbu kyseliny gallové, 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoové, chlorogenové, flavonoidů a resveratrolu v bobulích. Tyto výsledky také korelovaly s výsledky analýz vína z bioprodukce. Vyšší produkce těchto látek je pravděpodobně spojena s problematikou využívání ochranných prostředků při ošetřování révy. Syntetické pesticidy jsou v ekologickém zemědělství zakázané a rostlina je tak více závislá na vlastní produkci phytoalexinů. Například jedním z přírodních phytoalexinů je právě resveratrol, který má protiplísňové účinky. Syntéza polyfenolů je také ovlivněna dostupností základních živin rostlině. Bylo prokázáno, že vyšší dostupnost fosforu a dusíku v půdách z biofarem ovlivňuje míru tvorby flavonoidů v rostlinách (Mitchel a kol. 2007).

Výsledky analýz antioxidantů z této dizertační práce neprokázaly rozdílný vliv testovaných agrotechnik na antioxidační vlastnosti vín. Na rozdíl od studií citovaných výše však nebyla porovnávána ekologická produkce hroznů s konvenční, ale s integrovanou produkcí hroznů, která využívá podobných, environmentálně přívětivých přístupů k pěstování. Byla také testována pouze bílá vína odrůdy Sauvignon. Rozdíly v antioxidační aktivitě by mohly být výraznější u červených vín, které obsahují výrazně vyšší množství látek s antioxidačními účinky, převážně na polyfenolické bázi (Jackson 2008). Toto je oblast, do které by mohl být směřován další výzkum rozvíjející možnosti diskriminace biovín. Parametry antioxidační aktivity a koncentrace látek s antioxidačními vlastnostmi by mohly ve spojení například s prvkovou analýzou tvořit funkční klasifikační systém.

6. ZÁVĚR

Na základě analýz vybraných moravských vín byly s využitím vícerozměrných statistických technik (Shluková analýza, PCA, DA) vytvořeny diskriminační a klasifikační modely pro autentifikaci vín podle geografického původu a odrůdy. Databáze vzorků se sestávala z 53 bílých a 27 červených odrůdových vín. Vzorky byly vybrány tak, aby rovnoměrně pokrývaly všechny moravské vinařské podoblasti. Pro stanovení odrůdové autenticity byly vybrány vzorky nejčastěji zastoupených odrůd v ČR. Pro zvýšení robustnosti modelu bylo třeba do modelu zařadit vína z různých ročníků pro minimalizaci vlivů stárnutí vína a rozdílných klimatických podmínek v jednotlivých obdobích. Nejvíce zastoupené ročníky v modelu byly 2011 a 2012, nejstarším vínem bylo Rulandské modré z Dolních Dunajovic z roku 2006, nejmladší vína byla z produkce 2013.

Největší část zdrojových dat byla tvořena výsledky prvkové analýzy vín (stanovené pomocí ICP-MS a ICP-OES), doplněná o data z analýz vybraných polyfenolických látek (stanovené pomocí HPLC). Byly zpracovány dva separátní modely pro určení geografického původu moravských vín, pro bílá a červená vína. Analýzou rozptylu naměřených chemických parametrů byly vybrány statisticky významné proměnné pro diskriminaci a klasifikaci vín dle geografického původu. Pro bílá vína bylo vybráno celkem 16 parametrů a pro červená parametrů 17. Pomocí kanonické diskriminační analýzy poté byly vypočítány diskriminační a klasifikační funkce. Klasifikační model pro bílá vína umožnil rozdělení známých vzorků vín do podoblastí se 100% úspěšností. Křížovou validací modelu poté byla určena predikční efektivita modelu na 95%. Model pro červená vína vykazoval o něco horší výsledky s 96,43 % správně zařazených známých vzorků a 82,15% úspěšností predikce původu neznámých vzorků. Při bližším zhodnocení matice křížové validace bylo patrné, že se vzrůstajícím počtem vzorků v modelu roste i jeho přesnost. Model pro bílá vína byl postaven na 53 vzorcích, zatímco model pro červená pouze na 27, což se projevilo na predikční úspěšnosti. Dalším významným faktorem, který výrazně ovlivňoval robustnost modelu, byla homogenita rozložení vzorků v podoblasti. Jednotlivé moravské vinařské podoblasti jsou zóny, které mají určitá specifika ve složení půd, podloží a klimatických podmínkách. Samotné vinařské regiony se ale skládají z vinařských obcí, které mohou být i v rámci jedné podoblasti vzdálené desítky kilometrů. Pokud není celá podoblast homogenně pokryta vzorky ze všech úseků, nebude ani predikční model fungovat spolehlivě při určování původu neznámých vzorků. Řešením je rozčlenění na menší geografické úseky, v ideálním případě po vzoru Vín originální certifikace, jako jsou

kromě blatnických VOC, VOC Znojmo, VOC Mikulov, VOC Modré hory, VOC Pálava, kdy jsou vytvořeny jasně ohraničené oblasti se specifickým terroirem.

Kromě autentifikace geografického původu vín byl také zpracován model pro diskriminaci a klasifikaci odrůdových vín. Mechanismus diskriminace odrůdových vín byl založen na fyziologických rozdílech jednotlivých odrůd révy. Určité rozdíly mezi odrůdami se daly očekávat v příjmu anorganických a organických látek kořenovým systémem a také v charakteristice rostlinných metabolických drah. Výchozí soubor dat čítal 24 bílých vín tří odrůd – Veltlínské zelené, Ryzlink rýnský a Müller Thurgau. Analýzou rozptylu bylo určeno celkem 7 statisticky významných parametrů pro rozdělení vín dle odrůd. Jednalo se čistě o parametry z prvkového složení, rozdíly v obsahu stanovovaných organických látek mezi odrůdami v tomto případě nebyly zaznamenány. Klasifikační model z kanonické diskriminační analýzy pracoval s úspěšností 95,83% správně zařazených známých vzorků podle odrůdy. Predikční schopnosti pro zařazení neznámých vzorků byly testovány pomocí křížové validace. Zde model prokázal neuspokojivou správnost zařazení – 70,83%. Je patrné, že současný model postavený pouze na prvkovém složení bude třeba rozšířit o organické látky různých druhů. Především těkavé látky vytvářející charakteristický aromatický profil specifických odrůd by mohly být silným diskriminačním parametrem.

Poslední oblast, do které byl směřován výzkum v rámci této dizertační práce bylo vyhodnocení možností využití prvkové analýzy a analýzy celkové antioxidační aktivity vín k určení systému produkce hroznů. Byl srovnáván vliv dvou odlišných agrotechnik (bio a integrovaná produkce hroznů) na prvkové složení révy a vína a na antioxidační aktivitu vín. Výsledky naznačily, že množství a způsob aplikace pesticidů je velice významný faktor ovlivňující prvkový profil v révě vinné (listy a bobule) i ve víně. Réva pěstovaná na stejné vinici obdělávané odlišným způsobem se lišila hlavně v obsahu Cu, Mn, Zn. Byla vytvořena hypotéza, že obsah těchto prvků by mohl být základním kamenem ke zkonstruování klasifikačního modelu pro stanovení zemědělského systému produkce hroznů. Stejný trend byl potvrzen i ve vínech. Rozdílný vliv obou agrotechnik na antioxidační aktivitu vín nebyl pozorován.

7. SEZNAM LITERATURY

AJVAZJAN, Sergej Artem'jevič, Zinaida Ivanovna BEŽAJEVA a Oleg Vasil'jevič STAROVEROV. 1981. *Metody vícerozměrné analýzy*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981, 252 s.

ALEX, Pamela, A.K. SURI a C.K. GUPTA. 1998. Processing of xenotime concentrate. *Hydrometallurgy*. **50**(3): 331-338. DOI: 10.1016/S0304-386X(98)00052-8. ISSN 0304386x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304386X98000528>

ALMEIDA, C. Marisa a M. Teresa S. D. VASCONCELOS. 2001. ICP-MS determination of strontium isotope ratio in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **16**(6): 607-611. DOI: 10.1039/B100307K. ISSN 02679477. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b100307k>

ALMEIDA, C. Marisa R. a M. Teresa S. D. VASCONCELOS. 2003. Multielement Composition of Wines and Their Precursors Including Provenance Soil and Their Potentialities As Fingerprints of Wine Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(16): 4788-4798. DOI: 10.1021/jf034145b. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf034145b>

ALMEIDA, Cristina Marisa Ribeiro a Maria VASCONCELOS. 2003. Multi-element composition and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ of wines and their potentialities as fingerprint of wine provenance. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. (18, no. 1, pp. 15-27).

ANDĚL, Jiří. 2003. *Statistické metody*. Vyd. 3. Praha: Matfyzpress, 299 s. ISBN 80-867-3208-8.

ANDĚL, Jiří. 2005. *Základy matematické statistiky*. Vyd. 1. Praha: Matfyzpress, 358 s. ISBN 80-867-3240-1.

ANGUS, N.S., T.J. O'KEEFFE, K.R. STUART a G.M. MISKELLY. 2006. Regional classification of New Zealand red wines using inductively-coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **12**(2): 170-176. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00057.x. ISSN 1322-7130. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00057.x>

ARSHADY, Reza. 1991. Beaded polymer supports and gels. *Journal of Chromatography A*. **586**(2): 181-197. DOI: 10.1016/0021-9673(91)85124-X. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739185124X>

ARVANITOYANNIS, I. 1999. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science*. **10**(10): 321-336. DOI: 10.1016/S0924-2244(99)00053-9. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224499000539>

ARVANITOYANNIS, Ioannis S., Demetrios LADAS a Athanasios MAVROMATIS. 2006. Wine waste treatment methodology. *International Journal of Food Science and Technology*. **41**(10): 1117-1151. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.01112.x. ISSN 0950-5423. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2005.01112.x>

BAKKER, Jokie a Ronald CLARKE. 2012. *Wine flavour chemistry*. 2. Wiley. ISBN 978-1-4443-3042-7.

BARBASTE, M, B MEDINA, L SARABIA, M.C. ORTIZ a J.P PÉREZ-TRUJILLO. 2002. Analysis and comparison of SIMCA models for denominations of origin of wines from de Canary Islands (Spain) builds by means of their trace and ultratrace metals content. *Analytica Chimica Acta*. **472**(1-2): 161-174. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00979-0. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267002009790>

BARKER, Allen V a D PILBEAM. 2007. *Handbook of plant nutrition: A tutorial for beginners*. 2. Boca Raton, FL: CRC/Taylor, 613 p. ISBN 978-082-4759-049.

BARNARD, Hans, Alek N. DOOLEY, Gregory ARESHIAN, Boris GASPARYAN a Kym F. FAULL. 2011. Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *Journal of Archaeological Science*. **38**(5): 977-984. DOI: 10.1016/j.jas.2010.11.012. ISSN 03054403. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305440310004115>

BAUER A., BD. VELDE. 2014. *Geochemistry at the Earth's Surface*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-642-31358-5.

BAXTER, Malcolm, Helen M. CREWS, M. JOHN DENNIS, Ian GOODALL a Dorothy ANDERSON. 1997. The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chemistry*. **60**(3): 443-450. DOI: 10.1016/S0308-8146(96)00365-2. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814696003652>

BECKER, Johanna Sabine. 2007. *Inorganic Mass Spectrometry*. Chichester: Wiley. ISBN 978-0-470-01200-0.

BOSS, Charles a Kenneth FREEDEN. 1997. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. 2. Perkin Elmer.

BOWES B., MAUSETH J. a D. PILBEAM. 2008. *Plant structure: a colour guide*. 2nd ed. London: Manson Publ, 613 p. ISBN 978-184-0760-927.

BRANDT, Kirsten a Jens Peter MOLGAARD. 2001. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **81**(9): 924-931. DOI: 10.1002/jsfa.903. ISSN 0022-5142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.903>

BRÉAS, Olivier, Fabiano RENIERO, Giorgio SERRINI, G. J. MARTIN a A. ROSSMANN. 1994. Isotope ratio mass spectrometry: Analysis of wines from different european countries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **8**(12): 967-970. DOI: 10.1002/rcm.1290081212. ISSN 0951-4198. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1290081212>

BRERETON, Richard. 2003. *Chemometrics data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester (West Sussex, England): Wiley, 2003. ISBN 978-047-1489-788.

BREZOVÁ, Vlasta, Martin POLOVKA a Andrej STAŠKO. 2002. The influence of additives on beer stability investigated by EPR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **58**(6): 1279-1291. DOI: 10.1016/S1386-1425(01)00717-X. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138614250100717X>

BROSSAUD, F, V CHEYNIER, C ASSELIN a M MOUTOUNET. 1999. Flavonoid Compositional Differences of Grapes Among Site Test Plantings of Cabernet franc. *American journal of enology and viticulture*. (50, no. 3, pp. 277-284).

CASTIÑEIRA, Maria del Mar, Ingo FELDMANN, Norbert JAKUBOWSKI a Jan T. ANDERSSON. 2004. Classification of German White Wines with Certified Brand of Origin by Multielement Quantitation and Pattern Recognition Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**(10): 2962-2974. DOI: 10.1021/jf035120f. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf035120f>

COETZEE, Paul P., Francois E. STEFFENS, Riette J. EISELEN, Ockert P. AUGUSTYN, Lieve BALCAEN a Frank VANHAECKE. 2005. Multi-element Analysis of South African Wines by ICP-MS and Their Classification According to Geographical Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**(13): 5060-5066. DOI: 10.1021/jf048268n. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf048268n>

COWELL, S. a R CLIFT. 1995. Life cycle assessment for food production systems. *The fertiliser society proceedings*. (375).

CZOCHANSKA, Zofia, Lai Yeap FOO, Roger H. NEWMAN, Lawrence J. PORTER, Wayne A. THOMAS a William T. JONES. 1979. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. (8): 375-383. DOI: 10.1039/C39790000375. ISSN 0022-4936. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c39790000375>

DE LA PRESA-OWENS, Christina, Rosa Ma LAMUELA-RAVENTOS, Susana BUXADERAS a Ma Carmen DE LA TORRE-BORONAT. 1995. Characterization of Macabeo, Xarel.lo, and Parellada White Wines from the Penedès Region. II. *American journal of enology and viticulture*. **46**(4, pp. 529-541).

DELHAIZE E., PR. RYAN a PJ. RANDALL. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) 2. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol* **103**:695–702.

DERDE, M. P., D. L. MASSART, W. OOGHE a A. DE WAELE. 1983. Use of pattern-recognition display techniques to visualize the data contained in complex data-bases. A case study. *The Journal of Automatic Chemistry*. **5**(3): 136-145. DOI: 10.1155/S1463924683000346. ISSN 0142-0453. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/jamc/1983/195270/abs/>

DÍAZ, Carlos, José Elías CONDE, Daniel ESTÉVEZ, Sergio Javier PÉREZ OLIVERO a Juan Pedro PÉREZ TRUJILLO. 2003. Application of Multivariate Analysis and Artificial Neural Networks for the Differentiation of Red Wines from the Canary Islands According to the Island of Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(15): 4303-4307. DOI: 10.1021/jf0343581. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0343581>

DUFOUR, É., A. LETORT, A. LAGUET, A. LEBECQUE a J.N. SERRA. 2006. Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. **563**(1-2): 292-299. DOI: 10.1016/j.aca.2005.11.005. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005018623>

ECKSCHLAGER, Karel. 1991. *Chemometrie*. 1. vyd. Praha: Universita Karlova, 156 s. ISBN 80-706-6487-8.

ESHEL, Amram a Tom BEECKMAN. 2013. *Plant roots: the hidden half*. 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1 v. (various pagings). ISBN 14-398-4649-9.

ETIÉVANT, Patrick, Pascal SCHLICH, Jean-Claude BOUVIER, Patrick SYMONDS a Alain BERTRAND. 1988. Varietal and geographic classification of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998. **45**(1): 25-41. DOI: 10.1002/jsfa.2740450105. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740450105>

ETIÉVANT, Patrick, Pascal SCHLICH, Roger CANTAGREL, Main BERTRAND a Jean-Claude

BOUVIER. 1989. Varietal and geographic classification of french red wines in terms of major acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **46**(4): 421-438. DOI: 10.1002/jsfa.2740460405. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740460405>

FABANI, María P., Ruth C. ARRÚA, Fabio VÁZQUEZ, María P. DIAZ, María V. BARONI a Daniel A. WUNDERLIN. 2010. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chemistry*. **119**(1): 372-379. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.085. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609007869>

FASHUI, Hong, Wang LING, Meng XIANGXUAN, Wei ZHENG a Zhao GUIWEN. 2002. The Effect of Cerium (III) on the Chlorophyll Formation in Spinach. *Biological Trace Element Research*. **89**(3): 263-276. DOI: 10.1385/BTER:89:3:263. ISSN 0163-4984. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1385/BTER:89:3:263>

FERREIRA, Vicente, Purificación FERNÁNDEZ, Cristina PEÑA, Ana ESCUDERO a Juan F CACHO. 1995. Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **67**(3): 381-392. DOI: 10.1002/jsfa.2740670316. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740670316>

FOY, C. D., J. A. DUKE a T. E. DEVINE. 1992. Tolerance of soybean germplasm to an acid Tatum subsoil. *Journal of Plant Nutrition*. **15**(5): 527-547. DOI: 10.1080/01904169209364339. ISSN 0190-4167. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904169209364339>

FRÍAS, S. 2003. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta*. **59**(2): 335-344. DOI: 10.1016/S0039-9140(02)00524-6. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914002005246>

GAMBELLI, L a G.P SANTARONI. 2004. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis*. **17**(5): 613-618. DOI: 10.1016/j.jfca.2003.09.010. ISSN 08891575. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157503001492>

GARCIA-ALONSO, Maria, Gerald RIMBACH, Masaaki SASAI, Meiko NAKAHARA, Seiichi MATSUGO, Yuzo UCHIDA, Julian C. RIVAS-GONZALO a Sonia DE PASCUAL-TERESA. 2005. Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Molecular Nutrition*. **49**(12): 1112-1119. DOI: 10.1002/mnfr.200500100. ISSN 1613-4125. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200500100>

GARCÍA-ESPARZA, M. A., E. CAPRI, P. PIRZADEH a M. TREVISAN. 2006. Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Additives and Contaminants*. **23**(3): 274-280. DOI: 10.1080/02652030500429117. ISSN 0265-203x. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030500429117>

GARCÍA-JARES, C M, M S GARCÍA-MARTIN, N CARRO-MARIÑO a R CELA-TORRIJOS. 1995. GC-MS identification of volatile components of Galician (Northwestern Spain) white wines. Application to differentiate Rías Baixas wines from wines produced in nearby geographical regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **69**(2): 175-184. DOI: 10.1002/jsfa.2740690207. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740690207>

GARNIER, Nicolas, Pascale RICHARDIN, Véronique CHEYNIER a Martine REGERT. 2003. Characterization of thermally assisted hydrolysis and methylation products of polyphenols from modern and archaeological vine derivatives using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **493**(2): 137-157. DOI: 10.1016/s0003-2670(03)00869-9. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267003008699>

GIMÉNEZ-MIRALLES, J.E., GUARDIOLA, V., SALAZAR, D. a SOLANA, I. 1995. Characterization of valencian varietal grape musts by natural abundance deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Acta Horticulturae* (ISHS) 1995, vol. 388, pp. 53-58

GREENOUGH, J, L MALLORY-GREENOUGH a B FRYER. 2005. Geology and Wine 9: Regional Trace Element Fingerprinting of Canadian Wines. *Geoscience Canada*. **32**(3).

GREENOUGH, J.D., H.P. LONGERICH a S.E. JACKSON. 1997. Element fingerprinting of Okanagan Valley wines using ICP-MS: Relationships between wine composition, vineyard and wine colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **3**(2): 75-83. DOI: 10.1111/j.1755-0238.1997.tb00118.x. ISSN 1322-7130. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00118.x>

GREGORY, Peter. 2006. *Plant Roots: Growth, Activity and Interaction with Soils*. 1. Blackwell Publishing. ISBN 978-1-4051-1906-1.

GRINDLAY, Guillermo, Juan MORA, Luis GRAS a Margaretha T.C. DE LOOS-VOLLEBREGT. 2011. Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. *Analytica Chimica Acta*. **691**(1-2): 18-32. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.050. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011002753>. DOI: 663.2:543.421.

GROUSSET, Francis E., Christophe R. QUETEL, Bertrand. THOMAS, Patrick. BUAT-MENARD, Olivier F. X. DONARD a Alain. BUCHER. 1994. Transient Pb Isotopic Signatures in the Western European Atmosphere. *Environmental Science*. **28**(9): 1605-1608. DOI: 10.1021/es00058a011. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00058a011>

HAIR, Joseph F. 1998. *Multivariate data analysis*. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 1 v. (various pagings). ISBN 01-389-4858-5.

HASLAM, Edwin. 2005. *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. 1st paperback ed. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 978-052-1675-598.

HELDT H. 2005. *Plant Biochemistry*. 3. Elsevier. ISBN 0-12-088391-033.

HENDL, Jan. 2006. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. Vyd. 2., opr. Praha: Portál, 583 s. ISBN 80-736-7123-9.

HERNÁNDEZ-ORTE, Purificación, Juan F. CACHO a Vicente FERREIRA. 2002. Relationship between Varietal Amino Acid Profile of Grapes and Wine Aromatic Composition. Experiments with Model Solutions and Chemometric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**(10): 2891-2899. DOI: 10.1021/jf011395o. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf011395o>

CHARLTON, A. J., M. S. WROBEL, I. STANIMIROVA, M. DASZYKOWSKI, H. H. GRUNDY a B. WALCZAK. 2010. Multivariate discrimination of wines with respect to their grape varieties and vintages. *European Food Research and Technology*. **231**(5): 733-743. DOI: 10.1007/s00217-010-1299-2. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007>

IGLESIAS, Mònica, Emili BESALÚ a Enriqueta ANTICÓ. 2007. Internal Standardization? Atomic Spectrometry and Geographical Pattern Recognition Techniques for the Multielement Analysis and Classification of Catalonian Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**(2): 219-225. DOI: 10.1021/jf0629585. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0629585>

ILAND, P. 2012. *Monitoring the winemaking process From grapes to wine: techniques and concepts*. 2nd ed. Campbelltown, S. Aust: Patrick Iland Wine Promotions. ISBN 978-095-8160-568.

IZENMAN, Alan Julian. 2008. *Modern multivariate statistical techniques: regression, classification, and manifold learning*. New York: Springer, xxv, 731 s. ISBN 978-0-387-78188-4.

JACKSON, Ronald S. 2008. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. ISBN 978-012-3736-468.

JAKUBOWSKI, N., R. BRANDT, D. STUEWER, H. R. ESCHNAUER a S. GÖRTGES. 1999. Analysis of wines by ICP-MS: Is the pattern of the rare earth elements a reliable fingerprint for the provenance? *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **364**(5): 424-428. DOI: 10.1007/s002160051361. ISSN 0937-0633. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007>

JARVIS, K.E. a A.L. GRAY. 1990. *Handbook of ICP-MS*. Glasgow: Blackie. ISBN 02-169-2912-1.

JOHANNES, E., J. M. BROSANAN a D. SANDERS. 1992. Calcium Channels in the Vacuolar Membrane of Plants: Multiple Pathways for Intracellular Calcium Mobilization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **338**(1283): 105-112. DOI: 10.1098/rstb.1992.0134. ISSN 0962-8436. Dostupné také z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1992.0134>

JOHNSON, Hugh a Jancis ROBINSON. 2009. *Světový atlas vína*. Vyd. 2., upr., V Euromedia Group 1. Překlad Eva Císlerová. Praha: Knižní klub, 400 s. ISBN 978-80-251-1704-0.

KASIMATIS, A. a VILAS, E. 1985. Sampling for degree Brix in vineyard plots. *Am J Enol Viticult* **36**:207-213.

KLUSENER B., G. BOHEIM G, ENGELBERTH L. a WEILER E.W. 1995. Gadolinium-sensitive, voltage-dependent calcium-release channels in the endoplasmic reticulum of a higher-plant echanoreceptor organ. *Embo J*. **14**: 2708–2714.

KMENT, Petr, Martin MIHALJEVIČ, Vojtěch ETTLER, Ondřej ŠEBEK, Ladislav STRNAD a Ladislava ROHLOVÁ. 2005. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry*. **91**(1): 157-165. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.06.010. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604004595>

KOREŇOVSKÁ, Mária, Milan SUHAJ. 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.

KRAUS, Vilém. 1999. *Réva a víno v Čechách a na Moravě*. Vyd. 1. Praha: Radix, 280 s. Tradice a současnost (Radix). ISBN 80-860-3123-3.

KRAUS, Vilém. 2008. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, 2 v. ISBN 97880867670932.

LA PERA, L., G. DUGO, R. RANDO, G. DI BELLA, R. MAISANO a F. SALVO. 2008. Statistical study of the influence of fungicide treatments (mancozeb, zoxamide and copper oxychloride) on heavy metal concentrations in Sicilian red wine. *Food Additives*. **25**(3): 302-313. DOI: 10.1080/02652030701329603. ISSN 1944-0049. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030701329603>

LATORRE, Maria J., Carmen GARCIA-JARES, Bernard MEDINA a Carlos HERRERO. 1994. Pattern Recognition Analysis Applied to Classification of Wines from Galicia (Northwestern Spain) with Certified Brand of Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **42**(7): 1451-1455. DOI: 10.1021/jf00043a012. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00043a012>

LEES, Michèle. 2003. *Food authenticity and traceability*. Boca Raton, FL: CRC Press, xvii, 612 p. ISBN 08-493-1763-0.

LERNER, K a Brenda Wilmoth LERNER. 2006. *World of forensic science*. Detroit: Thomson/Gale, 2 v. (812 p.). ISBN 14144029612.

LI, Xiangdong a Iain THORNTON. 1993. Arsenic, antimony and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England. *Environmental Geochemistry and Health*. **15**(2-3): 135-144. DOI: 10.1007/BF02627831. ISSN 0269-4042. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02627831>

LINHART, Pavel, Miloš SUK a Vratislav VÁLEK. 2007. *Vinařský atlas území České republiky: Weinatlas des Gebietes der Tschechischen Republik*. 1. vyd. Brno: Moravské zemské muzeum, 226 s. ISBN 978-807-0283-110.

LUYKX, Dion M.A.M. a Saskia M. VAN RUTH. 2008. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*. **107**(2): 897-911. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.038. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607009533>

MAKRIS, Dimitris P., Stamatina KALLITHRAKA a Andreas MAMALOS. 2006. Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta*. **70**(5): 1143-1152. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.03.024. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006002086>

MARENGO, Emilio a Maurizio ACETO. 2003. Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. *Food Chemistry*. **81**(4): 621-630. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00564-2. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602005642>

MARHOLD, Karel. 2001. *Analýza multivariačních dat v taxonomii (fenetické metody)*. Praha. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

MARCHIONNI, Sara, Eleonora BRASCHI, Simone TOMMASINI, Andrea BOLLATI, Francesca CIFELLI, Nadia MULINACCI, Massimo MATTEI a Sandro CONTICELLI. 2013. High-Precision ⁸⁷Sr/ ⁸⁶Sr Analyses in Wines and Their Use as a Geological Fingerprint for Tracing Geographic Provenance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**(28): 6822-6831. DOI: 10.1021/jf4012592. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf4012592>

MARTIN, Alexander E., R. John WATLING, Garry S. LEE, Andrea BOLLATI, Francesca CIFELLI, Nadia MULINACCI, Massimo MATTEI a Sandro CONTICELLI. 2012. The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. *Food Chemistry*. **133**(3): 1081-1089. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.013. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612001781>

MARTINS, Viviana, António TEIXEIRA, Elias BASSIL, Eduardo BLUMWALD a Hernâni GERÓS. 2014. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiology and Biochemistry*. **82**: 270-278. DOI:10.1016/j.plaphy.2014.06.016. ISSN 09819428. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814002046>

MATEO, J.J a M JIMÉNEZ. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*. **881**(1-2): 557-567. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01342-4. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399013424>

MCGOVERN, Patrick E., Donald L. GLUSKER, Lawrence J. EXNER a Mary M. VOIGT. 1996. Neolithic resinated wine. *Nature*. **381**(6582): 480-481. DOI: 10.1038/381480a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/381480a0>

MEDINA, B. 1996. Wine authenticity. BLACKIE ACADEMIC AND PROFESSIONAL. *Food authentication*. Londýn, (pp. 60-107).

MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. 2004. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2. uprav. rozš. Praha: ACADEMIA, 953 s. ISBN 80-200-1254-0.

MICHLOVSKÝ, Miloš. 2014. *Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře*. Vyd. 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 262 s. ISBN 978-80-905319-2-5.

MITCHEL, AE., Y.J. HONG, E. Koh, D.M. BARETT, D.R. BRYANT, RF DENISON a S KAFFKA. 2007. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *J Agr Food Chem*. 55(15): 6154-6159. Doi: 10.1021/jf070344+

MITIĆ, Milan N., Mirjana V. OBRADOVIĆ, Zora B. GRAHOVAC a Aleksandra N. PAVLOVIĆ. 2010. Antioxidant Capacities and Phenolic Levels of Different Varieties of Serbian White Wines. *Molecules*. 15(3): 2016-2027. DOI: 10.3390/molecules15032016. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/3/2016/>

MORRIS, Carol a Michael WINTER. 1999. Integrated farming systems: the third way for European agriculture? *Land Use Policy*. 16(4): 193-205. DOI: 10.1016/S0264-8377(99)00020-4. ISSN 02648377. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264837799000204>

MORRISON, Donald F. 1967. *Multivariate statistical methods*. New York: McGraw-Hill. ISBN 978-007-0431-850.

NĚMEC, František *Paleobotanika*. [1. vyd.]. Praha: Nakl. Československé akademie věd 1959-75

NICOLINI, G, R LARCHER, P PANGRAZZI a L BONTEMPO. 2004. Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis*. (43, no.1, pp. 41-45).

Nollet L., a Fidel Toldrá. 2013. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 978-143-9830-857.

Ochrana révy vinné v ekologickém vinohradnictví před hlavními chorobami a škůdci. 1. vyd. Olomouc: Bioinstitut, 2007, 16 s. ISBN 978-80-87080-12-2.

PAVLOUŠEK, Pavel. 2007. *Encyklopedie révy vinné*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 316 s. ISBN 978-80-7084-982-8.

PAVLOUŠEK, Pavel. 2011. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, 333 s. ISBN 978-80-247-3314-2.

PÉREZ TRUJILLO, Juan P., José E. CONDE, María L. PÉREZ PONT, J. CÂMARA a José C. MARQUES. 2011. Content in metallic ions of wines from the Madeira and Azores archipelagos. *Food Chemistry*. **124**(2): 533-537. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.06.065. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610007752>

PÉREZ-TRUJILLO, Juan-Pedro, Mireille BARBASTE a Bernard MEDINA. 2003. Chemometric Study of Bottled Wines with Denomination of Origin from the Canary Islands (Spain) Based on Ultra-Trace Elemental Content Determined by ICP-MS. *Analytical Letters*. **36**(3): 679-697. DOI: 10.1081/AL-120018257. ISSN 0003-2719. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/AL-120018257>

PETRISOR D, DAMIAN G., SIMON S., SCHMUTZER G., HOSU A. a MICLAUS V. 2007. EPR investigation of antioxidant characteristics of some irradiated natural extracts. *J Optoelectron Adv Mater* **9**:760-763.

PEYNAUD, E. 1987. *The taste of wine: the art and science of wine appreciation*. San Francisco, CA: Wine Appreciation Guild. ISBN 978-093-2664-648.

POLOVKA, Martin, Vlasta BREZOVÁ a Andrej STAŠKO. 2003. Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophysical Chemistry*. **106**(1): 39-56. DOI: 10.1016/S0301-4622(03)00159-5. ISSN 03014622. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462203001595>

POLOVKA, Martin, Vlasta BREZOVÁ, Andrej STAŠKO, Milan MAZÚR, Milan SUHAJ a Peter ŠIMKO. 2006. EPR investigations of gamma-irradiated ground black pepper: An EPR spin trapping study. *Radiation Physics and Chemistry*. **75**(2): 309-321. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2005.07.007. ISSN 0969806x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X05002240>

PYTELA, Oldřich. 2003. *Chemometrie pro organické chemiky*. Vyd. 4. Pardubice: Univerzita Pardubice, 211 s. ISBN 80-719-4539-0.

RAPISARDA, Paolo, Maria Luisa CALABRETTA, Gabriella ROMANO a Francesco INTRIGLILOLO. 2005. Nitrogen Metabolism Components as a Tool To Discriminate between Organic and Conventional Citrus Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **53**(7): 2664-2669 [cit. 2015-03-19]. DOI: 10.1021/jf048733g. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf048733g>

ROSSMANN, Andreas. 2001. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Reviews International*. **17**(3): 347-381. DOI: 10.1081/FRI-100104704. ISSN 8755-9129. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-100104704>. DOI: 61:506-511.

ŘEZANKOVÁ, Hana, Dušan HÚSEK a Václav SNÁŠEL. 2009. *Shluková analýza dat*. 2., rozš. vyd. Praha: Professional Publishing, 218 s. ISBN 978-80-86946-81-8.

ŘEZANKOVÁ, Hana. 2007. *Shluková analýza dat*. 1. vyd. Praha: Professional Publishing, 196 s. ISBN 978-80-86946-26-9.

SALVO, Francesco, Lara LA PERA, Giuseppa DI BELLA, Mariano NICOTINA a Giacomo DUGO. 2003. Influence of Different Mineral and Organic Pesticide Treatments on Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) Contents Determined by Derivative Potentiometric Stripping Analysis in Italian White and Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(4): 1090-1094. DOI: 10.1021/jf020818z. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020818z>

SASS-KISS, A. a Gy. HAJÓS. 2005. Characteristic biogenic amine composition of Tokaj aszú-wines. *Acta Alimentaria*. **34**(3): 227-235. DOI: 10.1556/AAlim.34.2005.3.4. ISSN 0139-3006. Dostupné také z: <http://www.akademiai.com/openurl.asp?genre=article>

SASS-KISS, Agnes, Judit KISS, Bence HAVADI a Nóra ADÁNYI. 2008. Multivariate statistical analysis of botrytised wines of different origin. *Food Chemistry*. **110**(3): 742-750. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.02.059. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608002458>

SEDLO, Jiří a Ivana LUDVÍKOVÁ. 2014. *Přehled odrůd révy 2014*. Velké Bílovice: Svaz vinařů ČR ve spolupráci s ÚKZÚZ, 175 s. ISBN 978-80-903534-7-3.

SHIMODA, Mitsuya., Takayuki. SHIBAMOTO a Ann C. NOBLE. 1993. Evaluation of headspace volatiles of cabernet sauvignon wines sampled by an on-column method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**(10): 1664-1668. DOI: 10.1021/jf00034a028. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00034a028>

SCHWENKE, H. a E. WAGNER. 1992. A new concept of root exudation¹. *Plant, Cell and Environment*. **15**(3): 289-299. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb00976.x. ISSN 0140-7791. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.1992.tb00976.x>

SIDDIQUE, K. H. M., R. K. BELFORD a D. TENNANT. 1990. Root: shoot ratios of old and modern, tall and semi-dwarf wheats in a mediterranean environment. *Plant and Soil*. **121**(1): 89-98. DOI: 10.1007/BF00013101. ISSN 0032-079x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00013101>

Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno: Duben 2007. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2007. ISBN 978-80-7084-575-2.

Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno: Duben 2008. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2008. ISBN 978-80-7084-689-6.

Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno: Duben 2009. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2009. ISBN 978-80-7084-793-0.

Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno: Duben 2010. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2010. ISBN 978-80-7084-895-1.

Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno: Červenec 2011. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2011. ISBN 978-80-7084-982-8.

Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno: Duben 2014. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2014. ISBN 978-80-7434-176-2

SIVERTSEN, Hanne K, Borge HOLEN, Frithjof NICOLAYSEN a Einar RISVIK. 1999. Classification of French red wines according to their geographical origin by the use of multivariate analyses. *Science of food and agriculture*. (79).

Směrnice integrované produkce hroznů. In: 2010. Available from: www.ekovin.cz

SMITH, Lindsay. 2002. *A tutorial on Principal Components Analysis*. Dostupné také z: http://www.sccg.sk/~haladova/principal_components.pdf

SOLEAS, George J., Judy DAM, Michelle CAREY a David M. GOLDBERG. 1997. Toward the Fingerprinting of Wines: Cultivar-Related Patterns of Polyphenolic Constituents in Ontario Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45**(10): 3871-3880. DOI: 10.1021/jf970183h. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970183h>

SOUFLEROS, E a A BERTRAND. Evaluation of an HPLC method adapted for the determination of amino acids in wine. *Vitis / herausgegeben im Auftrage der Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof*. 1998, 37, pp. 43-53. ISSN 0042-7500.

STAFFORD, H. A. Distribution of tartaric acid in the leaves of certain angiosperms. *American Journal of Botany*. 1959, no. 46, pp. 347-352

STAŠKO, A., M. LIPTÁKOVÁ, F. MALÍK a V. MIŠÍK. 2002. Free radical scavenging activities of white and red wines: An EPR spin trapping study. *Applied Magnetic Resonance*. **22**(1): 101-113. DOI: 10.1007/BF03170526. ISSN 0937-9347. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF03170526>

STAŠKO, Andrej, Martin POLOVKA, Vlasta BREZOVÁ, Stanislav BISKUPIČ a Fedor MALÍK. 2006. Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study): An EPR spin trapping study. *Food Chemistry*. **96**(2): 185-196. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.02.022. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460500169X>

STAŠKO, Andrej, Vlasta BREZOVÁ, Milan MAZÚR, Milan ČERTÍK, Michal KALIŇÁK a Georg GESCHEIDT. 2008. A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. *LWT - Food Science and Technology*. **41**(10): 2126-2135. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.11.021. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643807004136>

SUHAI, M. a M. KORENOVSKÁ. 2005. Application of elemental analysis for identification of wine origin. *Acta Alimentaria*. **34**(4): 393-401. DOI: 10.1556/AAlim.34.2005.4.7. ISSN 0139-3006. Dostupné také z: <http://www.akademiai.com/doi/abs/10.1556/AAlim.34.2005.4.7>

SUHAI, Milan, Jana RÁCOVÁ, Martin POLOVKA, Vlasta BREZOVÁ a Fedor MALÍK. 2006. Effect of γ -irradiation on antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.): An EPR spin trapping study. *Food Chemistry*. **97**(4): 696-704. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.048. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605004425>

SUK, Miloš. 1995. *Geologie a víno*. Ilustrace Jan Steklík. Brno: Nadace Litera, 68 s. ISBN 80-702-8067-0.

SUN, Da-Wen. 2008. *Modern techniques for food authentication*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. ISBN 978-012-3740-854.

ŠKAŘUPA, Přemysl. *Možnosti určení původu vína z prvkového složení*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 117 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

ŠPERKOVÁ, J a M SUCHÁNEK. 2005. Multivariate classification of wines from different Bohemian regions (Czech Republic). *Food Chemistry*. **93**(4): 659-663. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.044. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604007988>

ŠTAVÍKOVÁ, Lenka. 2010. *Charakterizace vlastností extraktů z hroznových bobulí pomocí moderních analytických metod*. Brno. Dizerzační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Jiřina Omelková.

THIEL, Gabriela, Georg GEISLER, Ines BLECHSCHMIDT a Klaus DANZER. 2004. Determination of trace elements in wines and classification according to their provenance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **378**(6): 1630-1636. DOI: 10.1007/s00216-003-2444-6. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>

THOMAS, Robert. 2008. *Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners*. 2. CRC Press. ISBN 978-1-4200-6786-6.

TINTTUNEN, Soili a P. LEHTONEN. 2001. Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. *European Food Research and Technology*. **212**(3): 390-394. DOI: 10.1007/s002170000265. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170000265>

TUSSEAU, D, M VALLADE a M VIRION. *Controle de l'origine et de la nature des vins de champagne. Congrès Mondial de la Vigne et du Vin OIV 72eme Assemblée Générale, Madrid, 18-26 Mai*.

VERGARA, C, D VON BAER, C MARDONES, L GUTIÉRREZ, I HERMOSÍN-GUTIÉRREZ a N CASTILLO-MUÑOZ. 2011. Flavonol profiles for varietal differentiation between carménère and merlot wines produced in chile: hplc and chemometric analysis. *Journal of the Chilean Chemical Society*. **56**(4): 827-832. DOI: 10.4067/S0717-97072011000400001. ISSN 0717-9707. Dostupné také z: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext

VRČEK, Ivana Vinkovič, Mirza BOJIČ, Irena ŽUNTAR, Gordana MENDAŠ a Marica MEDIČ-ŠARIČ. 2011. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chemistry*. **124**(1): 354-361. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.118. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610007016>

WEHRENS, Ron. 2011. *Chemometrics with R: multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences*. Heidelberg: Springer. ISBN 978-364-2178-405.

WEIL, John a James BOLTON. 2007. *Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and practical applications*. 2. Hoboken: Wiley. ISBN 978-0471-75496-1

WOESE, Katrin, Dirk LANGE, Christian BOESS a Klaus BÖGL. 1999. A Comparison of Organically and Conventionally Grown Foods—Results of a Review of the Relevant Literature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **74**(281–293). DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3r/>: -. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010.

WWW odkaz 1: Discriminant Function Analysis. *StatSoft* [online]. [cit.2011-10-02]. Dostupné z: <http://www.statsoft.com/textbook/discriminant-function-analysis/>

WWW odkaz 2: A Powerful Classification Technique. Data Mining - Discriminant Analysis (part – III) [online]. Dostupné z http://analytics-anjanita.blogspot.cz/2010/11/powerful-classification-technique-in_21.html

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS – Atomová absorpční spektrometrie

ANOVA – Analýza rozptylu

DA – diskriminační analýza

DAD – diodové pole

EHS – Evropské hospodářské společenství

ESI - electrospray

FLD – fluorescenční detektor

GC – Plynová chromatografie

HPLC – Vysokotlaká kapalinová chromatografie

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IRMS – hmotnostní spektrometrie pro stanovení izotopických poměrů

LIT – Litoměřická vinařská podoblast

MIK – Mikulovská vinařská podoblast

MS – hmotnostní spektrometrie

MT – Müller Thurgau

m/z – poměr hmotnosti a náboje

NMR – spektroskopie nukleární magnetické rezonance

PCA – analýza hlavních komponent

PCR – Polymerázová řetězová reakce

RM – Rulandské modré

RR – Ryzlink rýnský

SAHN – Sekvenční aglomerativní hierarchická metoda

SAU - Sauvignon

SLO – Slovácká vinařská podoblast

UV – ultrafialová část spektra

VIS – viditelná část spektra

VP – Velkopavlovická vinařská podoblast

VZ – Veltlínské zelené

ZNO – Znojemská vinařská podoblast

9. SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

Publikace v impaktovaných časopisech

DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J.; VESPALCOVÁ, M.; MATĚJÍČEK, A.; KAPLAN, J. Elemental composition of fruits from different Black elder (*Sambucus nigra* L.) cultivars grown in the Czech Republic. JOURNAL OF ELEMENTOLOGY, 2015, roč. 20, č. 3, s. 549-557. ISSN: 1644- 2296.

CETKOVSKÁ, J.; DIVIŠ, P.; VESPALCOVÁ, M.; POŘÍZKA, J. a kol. Basic nutritional properties of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars grown in the Czech Republic. ACTA ALIMENTARIA, 2015, roč. 44, č. 3, s. 357-364. ISSN: 0139- 3006.

Publikace v recenzním řízení v impaktovaných časopisech 2015

POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OLŠOVCOVÁ, Z.; OMELKOVÁ, J. Impact of different viticulture systems on elemental composition of *Vitis Vinifera* and wine and on total antioxidant activity of wine. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin

Publikace v recenzovaných časopisech

KŘENOVÁ, A.; MATĚJÍČEK, A.; DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J. Antioxidační aktivita vybraných odrůd černých rybízů. Vědecké práce ovocnářské 24, 2015 v tisku. ISSN: 0231-6900.

KŘENOVÁ, A.; MATĚJÍČEK, A.; DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J. aktivita vybraných odrůd červených a bílých rybízů. Vědecké práce ovocnářské 24, 2015 v tisku. ISSN: 0231-6900.

VOSYNEK, P.; NÁVRAT, T.; PEČ, M.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P. How the Decrease of Collagen or Mineral Affect the Fracture in the Turkey Long Bones. World Academy of Science, Engineering and Technology, 2014, roč. 8, č. 12, s. 1753-1756. ISSN: 1307- 6892.

SUCHÝ, R.; POŘÍZKA, J.; WASSERBAUER, J.; KALINA, L. Reduction of efflorescence in the alkali activated systems. Advanced Materials Research, 2014, roč. 2014, č. 1000, s. 318-321. ISSN: 1022-6680.

KOUTNÝ, O.; OPRAVIL, T.; POŘÍZKA, J. Application of Metakaoline in Autoclaved Aerated Concrete Technology. Advanced Materials Research, 2014, roč. 2014, č. 1000, s. 174-177. ISSN: 1022-6680.

Konferenční příspěvky v podobě abstraktu

POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OMELKOVÁ, J. Influence of the different farming systems on elemental content of *Vitis vinifera* and on antioxidant properties of wine. European symposium on atomic spectrometry 2012 - Book of abstracts. 2012. s. 181-181. ISBN: 978-80-223-3292- 7.

POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OMELKOVÁ, J. Elemental composition and total antioxidant capacity of Czech wines deriving from grapes grown by different agriculture methods. Chemické listy. 2011. s. s1025 (s1025 s.)ISSN: 0009- 2770.

POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OMELKOVÁ, J. Influence of the agriculture on elemental content of vineyard components and total antioxidant activity of Czech wines (pilot study). 2nd International ISEKI_ Food Conference. Milan, Italy: ISEKI Food Association, 2011. s. 232-232. ISBN: 978-88-905-9890- 6.

SÁSKOVÁ, D.; POŘÍZKA, J.; ŠPANOVÁ, A.; DIVIŠ, P.; KULICH, P.; RITTICH, B. Silver nanoparticles production with probiotic bacteria. Chemistry and life 2015, Book of abstracts. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015. s. 42-43. ISBN: 978-80-214-5228- 2.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; DINGOVÁ, T.; BENEŠOVÁ, P.; POŘÍZKA, J.; MÁROVÁ, I. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates on various lignocellulose- based agricultural wastes. Chemistry and Life 2015, Book of Abstracts. 1. Brno: Fakulta chemická VUT v Brně, 2015. s. 38-39. ISBN: 978-80-214-5228- 2.

KRATOCHVÍLOVÁ, R.; KLUČÁKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; POŘÍZKA, J.; STRÍTEŽSKÁ, S. Superabsorbent Polymers with the Function of Controlled Release. NANOCON 2014 Conference proceedings. 1. 2014. s. 159-159. ISBN: 978-80-87294-55- 0.

KRATOCHVÍLOVÁ, R.; KLUČÁKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; POŘÍZKA, J.; STRÍTEŽSKÁ, S. Superabsorbent Polymers for Agricultural Usage. 6th International Conference on Polymer Behaviour, Programme and Abstract Booklet. 2014. s. 47-47.

DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J.; ŠKAŘUPA, P. Application of ICP- MS and chemometrics for determination of the wine origin. European symposium on atomic spectrometry 2012 - Book of abstracts. 2012. s. 124-124. ISBN: 978-80-223-3292- 7.

DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J. Prvková analýza moravských vín a její využití v praxi. In Mikroelementy 2012. 2012. s. 100-106. ISBN: 978-80-86380-63- 6.

CETKOVSKÁ, J.; VESPALCOVÁ, M.; POŘÍZKA, J. Determination of some important nutritive compounds in various cultivars of cornelian cherry fruit. In Studentská odborná konference Chemie a Společnost 2011/12, Sborník příspěvků. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 49-53. ISBN: 978-80-214-4425- 6.

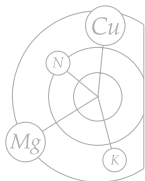
DVOŘÁK, M.; GREGUŠOVÁ, B.; ŠURANSKÁ, H.; TURKOVÁ, K.; POŘÍZKA, J.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. Optimization of the capillary zone electrophoresis method with indirect photometry detection for monitoring of selected organic acid in biotechnological processes. In Studentská odborná konference Chemie je život 2012 - Sborník příspěvků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 271-275. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

CETKOVSKÁ, J.; VESPALCOVÁ, M.; DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J. Analysis of non traditional fruits (Hippophae Rhamnoides and Cornus Mas). Chemické listy. 2011. s. s1002 (s1002 s.)ISSN: 0009-2770.

CETKOVSKÁ, J.; VESPALCOVÁ, M.; POŘÍZKA, J.; ŘEZNÍČEK, V. Cornelian cherry (Cornus mas) as a good source of antioxidants. 11th International Nutrition & Diagnostics Conference; Book of Proceedings. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. s. 104-104. ISBN: 978-80-7395-378- 2.

10. PŘÍLOHY

V dodatku této dizertační práce jsou připojeny dva články z impaktovaných časopisů a jeden manuskript v recenzním řízení v impaktovaném časopise Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.



Diviš P., Pořízka J., Vespalcová M., Matějčíček A., Kaplan J. 2015. *Elemental composition of fruits from different Black elder (Sambucus nigra L.) cultivars grown in the Czech Republic*. J. Elem., 20(3): 549-557. DOI: 10.5601/jelem.2015.20.1.758

ORIGINAL PAPERS

ELEMENTAL COMPOSITION OF FRUITS FROM DIFFERENT BLACK ELDER (*SAMBUCUS NIGRA* L.) CULTIVARS GROWN IN THE CZECH REPUBLIC*

Pavel Diviš¹, Jaromír Pořízka¹, Milena Vespalcová¹,
Aleš Matějčíček², Jiří Kaplan²

¹Department of Food Chemistry and Biotechnology
Brno University of Technology, Faculty of Chemistry

²Research and Breeding Institute of Pomology, Holovousy Ltd.

Abstract

Black elder is a deciduous shrub widely used in medicine, pharmacy and food industry. This study presents a comparison of the elemental composition of fruits (berries) from the Black elder (*Sambucus nigra* L.) cultivars Albida, Bohatka, Dana, Heidegg13, Mammot and Sambo, grown in the Czech Republic and harvested in two seasons (2011 and 2013). The fruits were collected at full maturity from an experimental orchard at the Research and Breeding Institute of Pomology, Holovousy Ltd. The raw material was decomposed using hot nitric acid and the determination of the elemental content (Ca, K, P, Zn, Cu, Mn, Na, Mg) was performed by inductively coupled atomic emission spectrometry in accordance with a valid ISO standard.

Concentration of all the analyzed elements in the various *Sambucus nigra* cultivars was different, and the differences were statistically significant ($p < 0.05$). All the investigated cultivars were a good source of major and trace elements. The concentration of the analyzed elements in *Sambucus nigra* decreased in the following order $K > Ca > P > Mg > Na > Fe > Mn > Zn > Cu$. The results demonstrated that *Sambucus nigra* fruits can be used as functional food in prevention and treatment of diseases associated with deficiency of elements in the human diet. On average, 100 g of *Sambucus nigra* fruits can cover about 20% of the recommended dietary allowance of main elements for women and men. In terms of the content of individual elements, the cultivars Albida and Sambo have proven to be most promising. The chemical composition of *Sambucus nigra* varied with the year of harvest, but the variation in the elemental content did not exceed 20% in most cases.

Keywords: *Sambucus nigra*, elderberry, fruit, major and minor metals, spectrometry.

assoc. prof. Pavel Diviš, PhD, Department of Food Chemistry and Biotechnology, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic, e-mail: divis@fch.vutbr.cz

* This work was supported by project NP MZe CR 206553/2011-17253 and infrastructure of the projects CZ.1.05/2.1.00/03.0116 and CZ.1.05/2.1.00/01.0012 was used during this work.

INTRODUCTION

Black elder (*Sambucus nigra* L.) is one of the neglected crops in the Czech Republic, but with great potential for use. From a total of approximately 25 species of the genus *Sambucus* naturally widespread or introduced in all regions around the world, only *Sambucus nigra* bearing edible fruit which has a natural range of occurrence covering the Czech Republic.

Sambucus nigra is a tall, tree-like shrub, native to Europe, Asia and North Africa, and naturalized in the USA. In the USA, it is known as *Sambucus nigra* L. ssp. *canadiensis* (CHARLEBOIS et al. 2010). The shrub blooms during the early summer with small, white flowers creating flat, compound umbels that develop into shiny, purplish-black berries by late summer and early fall (ATKINSON, ATKINSON 2002, CHARLEBOIS et al. 2010). Elder flowers and fruits have been known for centuries for their healing properties. Elder flowers and berries are rich in beneficial ingredients such as flavonoids, polyphenolic compounds, different organic acids, anthocyanins or ascorbic acid, which help to prevent or treat cancer, cardiovascular diseases or neurodegenerative disorders (MA, WU 2012, CAVERO et al. 2013, FOLMER et al. 2014). Elder flowers are used mainly for preparation of extracts rich in flavonoids and phenolic compounds (CHRISTENSEN et al. 2008); other than that, elder berries are also widely used in food industry to produce elderberry jam, yoghurt, juice or wine (KAACK, AUSTED 1998, KAACK et al. 2008, CHARLEBOIS et al. 2010, SCHMITZER et al. 2010). Owing to the high content of anthocyanins, elderberry juice is also used as a natural food colouring agent (ZAFRILLA et al. 1998, HUBBERMANN et al. 2006).

Whereas the composition of elder berries in terms of organic matter is very well described by many authors (JAKOBEK et al. 2007, MRATINIC, FOTIRIC 2007, LEE, FINN 2007, OCHMIAN et al. 2009, VEBERIC et al. 2009), there is a shortage of studies dealing with the elemental composition of elder berries, although some of the metals they contain play an important role in the human body. Therefore, this study's aim has been to investigate the elemental composition of Black elder (*Sambucus nigra* L.) berries from six different *Sambucus nigra* cultivars grown in the Czech Republic.

MATERIAL AND METHODS

For the calibration of an ICP-OES instrument, certified solutions of the target metals (1 g dm⁻³, Astasol, Analytika, Czech Republic) were used. Nitric acid (Analpure, Analytika) served for digestion of *Sambucus nigra* samples. All water used in this study was ultrapure water prepared in an ELGA station (Veolia Watter systems Ltd., UK). Quality control material (QCM) METRANAL No. 3 containing different metals in strawberry leaves matrix

(Analytika) was used to verify the proper function of the ICP-OES instrument.

All the analyzes were performed on an ICP-OES (Ultima 2, Horiba Jobin Yvon, France) equipped with a Mainhard-type nebuliser and a cyclonic spray chamber. Before the analyses, the ICP-OES operating conditions were optimised by measuring the ratio of the intensities of the magnesium 280 and 285 nm spectral lines and by measuring the ratio of signal and background (SBR). The optimal wavelengths were chosen from the international standard ČSN EN ISO 11885 in order to achieve sufficient sensitivity and the least interference. The optimal conditions for the ICP-OES analysis were: peristaltic pump rotation 20 rpm, nebuliser pressure 0.29 MPa and generator power 1200 W. The chosen wavelength and the results from the analyses on QCM are summarized in Table 1. For sample weighing, an analytical balance AND HA-202M (A&D Company, Japan) was used. Samples were shaken in a GFL 3006 shaker (Gesellschaft für Laborortechnik mbH, Germany) and heated on a Gerhardt heating plate (Gerhardt Bonn, Germany).

All of the *Sambucus nigra* cultivars were grown in the Czech Republic, at the Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd. (50°22'29" N, 15°34'38" E, 321 m alt.), in an experimental orchard established in autumn 2008. The soil in the experimental orchard is heavy loamy clay soil with the minimum thickness of 60-80 cm. The bedrock consists of clay stone. The average annual temperature in the locality is 8.14°C. The average annual rainfall is 655 mm and the average rainfall during the plant growing period is 379 mm. No pesticides were used during the cultivation. The *Sambucus nigra* berries were harvested at full maturity, at the end of August 2011 and 2013, and stored at -18°C prior to the analyses, which

Table 1

An overview of the wavelengths used for sample analyses on an ICP-OES and results from the analysis of quality control material Metranal 3 (arithmetic mean \pm standard deviation)

Element	ICP-OES wavelength (nm)	QCM certified value (mg kg ⁻¹)	QCM Real value (mg kg ⁻¹)	Recovery (%)
Zn	206.191	27.1 \pm 1.8	24.4 \pm 1.6	90
Mn	257.610	187 \pm 18	174 \pm 21	93
Fe	259.940	912 \pm 90	866 \pm 55	95
Mg	285.213	4210 \pm 420	4294 \pm 379	102
Cu	324.750	8.68 \pm 0.76	8.33 \pm 0.69	96
P	213.618	n.a.	*	*
Ca	422.673	n.a.	*	*
Na	588.900	n.a.	*	*
K	766.490	21200 \pm 2100	22472 \pm 1932	106

n.a. – not available

were performed as soon as possible. The analyzed cultivars of *Sambucus nigra* were: Albida, Bohatka, Dana, Heidegg13, Mammut and Sambo. Basic characterisation of the cultivars is given in Table 2.

Table 2
Characterization of *Sambucus nigra* cultivars examined in this study

Cultivars	Fruit mass* (g)	Dry mass (%)	Reducing sugars (%)	Titrateable acidity** (g kg ⁻¹)
Albida	22.2	16.1	5.2	27.2
Bohatka	38.5	14.3	4.9	25.7
Dana	39.6	13.6	5.2	22.8
Heidegg 13	39.6	15.3	3.0	32.7
Mammut	39.3	14.5	5.4	30.4
Sambo	39.4	14.6	2.8	44.0

* – infructescences mass, ** – expressed as citric acid – all values are expressed as an average

Approximately one gram of *Sambucus nigra* berries was weighed out on an analytical balance and each sample was transferred to a 0.05 dm⁻³ Erlenmayer flask. A total amount of 0.02 dm⁻³ of nitric acid was added to each sample and the samples were shaken overnight. After shaking, the Erlenmayer flasks with the samples were transferred on a heating plate and heated for 60 min until complete decomposition of the samples. After cooling down, the samples were transferred into 0.1 dm⁻³ volumetric flasks and filled up with deionised water. Each of the *Sambucus nigra* cultivar was decomposed and analyzed three times. The same procedure was applied to prepare quality control material samples.

All concentrations were expressed as means and the standard deviation. The concentrations in mg kg⁻¹ were calculated from the equation 1:

$$c_m = c_s V / m,$$

where c_m is the concentration of a given element in mg kg⁻¹, c_s – the concentration of this element in the analyzed solution (mg dm⁻³), V – the volume of the analyzed solution (dm³) and m – the weight of the sample used for the analysis (kg). The data were further analyzed with the XLStat and Microsoft Excel software. Testing for the significance of mean effects and interactions on all variables was accomplished using Anova analysis of variance and the Tukey's test. Statistical significance was set at $P = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The results from the analyses of *Sambucus nigra* cultivars harvested in 2011 are summarized in Table 3. The content of all the elements, except cop-

Table 3

Mineral content in *Sambucus nigra* cultivars harvested in 2011 (mg kg⁻¹ fresh weight)

Element	Cultivar					
	Albida	Bohatka	Dana	Heidegg13	Mammut	Sambo
Ca	1008±32 ^{bc}	1080±64 ^b	885±12 ^c	906±20 ^c	938±15 ^c	1528±30 ^a
K	4979±68 ^b	4461±211 ^c	4397±50 ^c	4673±114 ^{bc}	4924±50 ^b	5494±62 ^a
Na	53±1 ^b	18.8±0.8 ^d	34±1 ^c	146±5 ^a	20±1 ^d	19.0±0.9 ^d
P	872±23 ^b	735±21 ^c	823±17 ^b	818±31 ^{bc}	1077±5 ^a	1131±36 ^a
Mg	575±13 ^b	448±11 ^c	419±1 ^d	408±6 ^d	572±5 ^b	739±6 ^a
Mn	9.5±0.4 ^a	5.9±0.5 ^b	4.7±0.3 ^{bc}	3.6±0.4 ^c	3.9±0.4 ^c	3.8±0.4 ^c
Fe	17.6±0.4 ^{bc}	19±1 ^b	17.7±0.6 ^{bc}	14±0.6 ^d	29.8±0.4 ^a	16.1±0.4 ^{cd}
Zn	11.3±0.5 ^a	5.1±0.4 ^d	6.6±0.4 ^{bc}	5.4±0.3 ^{cd}	6.4±0.4 ^{bcd}	7.1±0.4 ^b
Cu	1.81±0.22 ^a	1.9±0.3 ^a	1.7±0.4 ^a	1.8±0.4 ^a	2.0±0.5 ^a	1.9±0.4 ^a

Values in the same row with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

per, varied between the cultivars, and the differences were statistically significant ($p < 0.05$). All of the analyzed cultivars had high concentrations of potassium, calcium, magnesium and phosphorus. The highest content of these elements was found in the cultivar Sambo. The concentration of sodium in Heidegg13 was approximately 7 times higher (146 mg kg⁻¹) than the amount of sodium in the other five cultivars. The cultivar Mammut contained the highest concentration of iron (29.8 mg kg⁻¹). The highest concentrations of zinc (11.3 mg kg⁻¹) and manganese (9.5 mg kg⁻¹) were found in cv. Albida. In comparison with the other analyzed elements, the concentration of copper in all *Sambucus nigra* cultivars was low, 1.9 mg kg⁻¹ on average.

The results from the analyses of *Sambucus nigra* berries harvested in 2013 are summarized in Table 4. Similarly to the data obtained from the

Table 4

Mineral content in *Sambucus nigra* cultivars harvested in 2013 (mg kg⁻¹ fresh weight)

Element	Cultivar					
	Albida	Bohatka	Dana	Heidegg13	Mammut	Sambo
Ca	977±23 ^{ab}	885±25 ^b	944±45 ^{ab}	585±38 ^c	574±28 ^c	1009±33 ^a
K	3165±34 ^{cd}	2953±7 ^d	3199±101 ^c	3863±8 ^b	4201±53 ^a	4221±86 ^a
Na	35±3 ^a	13.0±0.4 ^c	18.3±0.6 ^b	13.7±0.3 ^c	13.4±0.4 ^c	13.1±0.5 ^c
P	1230±19 ^b	997±16 ^d	1085±16 ^c	983±17 ^d	1337±21 ^a	1234±12 ^b
Mg	636±3 ^a	403±5 ^d	426±2 ^c	396±5 ^d	526±2 ^b	533±1 ^b
Mn	8.1±0.4 ^a	6.3±0.4 ^b	6.2±0.4 ^b	4.7±0.4 ^c	5.4±0.4 ^{bc}	6.7±0.4 ^b
Fe	21±2 ^c	16.5±0.5 ^d	84.7±0.6 ^a	46.6±0.8 ^b	12.4±0.4 ^e	44.3±0.7 ^b
Zn	3.3±0.4 ^a	3.4±0.4 ^a	2.86±0.22 ^b	1.9±0.3 ^c	2.0±0.4 ^c	1.9±0.4 ^c
Cu	1.9±0.4 ^a	1.8±0.5 ^a	2.4±0.4 ^b	1.9±0.4 ^a	2.9±0.4 ^b	1.7±0.3 ^a

Values in the same row with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

2011 season samples, the elemental concentrations were significantly different ($p < 0.05$) between the cultivars. The highest concentrations of potassium (4221 mg kg^{-1}) and calcium (1009 mg kg^{-1}) were found in Sambo cultivar and the highest concentration of phosphorous was detected in Mammut (1337 mg kg^{-1}). Fruits of cv. Albida contained the highest concentration of magnesium (575 mg kg^{-1}), sodium (53 mg kg^{-1}) and manganese (9.5 mg kg^{-1}), while fruits of cv. Dana contained the highest concentration of iron (84.7 mg kg^{-1}). Concentrations of copper were comparable in all the cultivars, 2 mg kg^{-1} on average. A higher concentration of zinc was found in Albida and Bohatka (3.4 mg kg^{-1}).

Comparing berries from the different cultivars of *Sambucus nigra* harvested in 2011 and 2013, it was found that the average content of zinc, magnesium, calcium, sodium and potassium was higher in the 2011 season. The berries of *Sambucus nigra* cultivars harvested in 2013 had higher average concentrations of manganese, iron, phosphorus and copper than harvested in 2011. The climatic conditions for the harvest years are summarized in Figure 1. The average monthly temperature and precipitation were comparable in both harvest years. The average monthly duration of sunshine, however, was higher in 2011. The higher average monthly duration of sunshine in 2011 probably supported the photosynthetic processes in *Sambucus nigra*, which could have affected the content of some elements in *Sambucus nigra* fruits (ATKINSON et al. 2006).

In the present literature, there is scarcity of information on the elemental composition of *Sambucus nigra*. This study has shown that *Sambucus nigra* is an important source of macro- and microelements, especially magne-

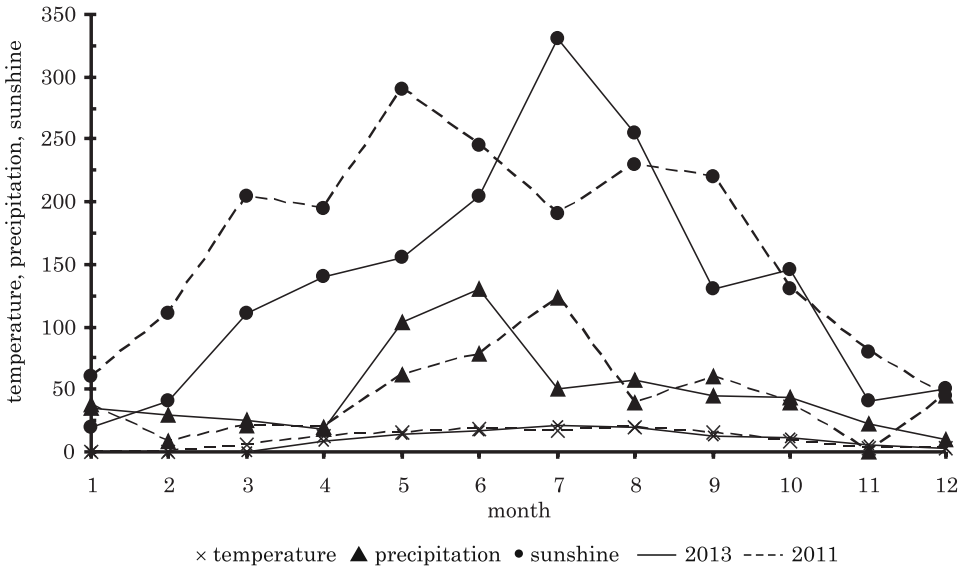


Fig. 1. Temperature ($^{\circ}\text{C}$), precipitation (mm) and sunshine (h) during the cultivation of *Sambucus nigra* (data from the Czech Hydrometeorological Institute)

sium, phosphorous, manganese, iron and copper. Magnesium, iron, phosphorous and manganese are needed in human nutrition for healthy teeth, normal blood clotting, proper nervous system functioning, energy metabolism and formation of haemoglobin (LUKASKI 2004, PRENTICE et al. 2006, TAKEDA et al. 2012), while copper is present in a large variety of enzymes with many functions, and is important for proper brain function (SCHEIBER et al. 2014, SIERPINSKA et al. 2014). On average, 100 g of *Sambucus nigra* fruits can cover 10% recommended dietary allowance for women and men (RDA) of potassium and calcium, 0.2% RDA of sodium, 15% RDA of phosphorous and magnesium, 30% RDA of manganese, 20% RDA of iron, 2% RDA of zinc and 25% RDA of copper. CHIRIGIU et al. (2012) analyzed copper, zinc and iron in *Sambucus ebulus* L. The concentration of iron and zinc in *Sambucus ebulus* was significantly higher than in *Sambucus nigra* cultivars analyzed in this study; however, the concentration of copper was comparable in both elderberry species. KOLODZIEJ et al. (2012) found a higher concentration of potassium, calcium and magnesium in *Sambucus nigra* compared to *Sambucus nigra* cultivars investigated in this study, while the concentrations of iron, manganese, copper and zinc were comparable to the average concentrations of those elements in *Sambucus nigra* cultivars determined in this study. Significantly lower concentrations of calcium and phosphorous in *Sambucus nigra* compared to this study were published by CHARLEBOIS et al. (2010).

CONCLUSION

This study revealed that Black elder fruits, in addition to being a good source of organic compounds, can also supply consumers with major and trace elements. Consumption of 100 g of Black elder fruits covers about 0.2–30% of the recommended dietary allowance of calcium, potassium, sodium, phosphorous, magnesium, manganese, iron, zinc and copper for women and men. The highest concentration of these elements was found in the cultivars Albida and Sambo. The elemental composition of Black elder fruits can differ with the year of harvest; however, the observed deviation in the mineral composition was usually less than 20%. The results of this research can create additional criteria for selection of suitable cultivars grown by farmers for processing by the food industry as well as for local production and home processing.

REFERENCES

- ATKINSON A.D., ATKINSON E. 2002. *Sambucus nigra* L. J. Ecol., 90: 895-923. DOI: 10.1046/j.1365-2745.2002.00698.x
- ATKINSON C.J., DODDS P.A.A., FORD Y.Y., LE MIERE J., TAYLOR J.M., BLAKE P.S., PAUL N. 2006. *Effects of cultivar, fruit number and reflected photosynthetically active radiation on Fragaria × ananassa productivity and fruit ellagic acid and ascorbic acid concentrations*. Ann. Bot., 97(3): 429-441. DOI: 10.1093/aob/mcj046

- CAVERO R.Y., AKERRETA S., CALVO M.I. 2013. *Medicinal plants used for dermatological affections in Navarra and their pharmacological validation*. J. Ethnopharmacol., 149: 533-542. DOI: 10.1016/j.jep.2013.07.012
- CHARLEBOIS D., BYERS P.L., FINN CH.E., THOMAS A.L. 2010. *Elderberry: botany, horticulture, potential*. Hort. Rev., 37: 213-280.
- CHIRIGIU L., POPESCU R., BUBULICA M.V., POPESCU A. 2012. *Determination of chromium, copper, iron, zinc, cadmium and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry in seven phytopharmaceutical products*. Rev. Chim., 63: 874-876.
- CHRISTENSEN L.P., KAACK K., FRETTE X.C. 2008. *Selection of elderberry (Sambucus nigra L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids*. Eur. Food Res. Technol., 227: 293-305. DOI: 10.1007/s00217-007-0723-8
- FOLMER F., BASAVARAJU U., JASPARS, M., HOLD G., EL-OMAR, E., DICATO, M., DIEDERICH, M. 2014. *Anticancer effects of bioactive berry compounds*. Phytochem. Rev., 13: 295-322. DOI: 10.1007/s11101-013-9319-z
- HUBBERMANN E. M., HEINS A., STOECKMANN H., SCHWARZ K. 2006. *Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates*. Eur. Food Res. Technol., 223: 83-90. DOI: 10.1007/s00217-005-0139-2
- JAKOBEK L. SERUGA M. NOVAK I. MEDVIDOVIC-KOSANOVIC M. 2007. *Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits*. Deut. Lebensm.-Rundsch., 103: 369-378.
- KAACK K., AUSTED T. 1998. *Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (Sambucus nigra L.) during juice processing*. Plant Food Hum. Nutr., 52: 187-198. DOI: 10.1023/A:1008069422202
- KAACK K., FRETTE X.C., CHRISTENSEN L.P., LANDBO A.K., MAYER A.S. 2008. *Selection of elderberry (Sambucus nigra L.) genotypes best suited for the preparation of juice*. Eur. Food Res. Technol., 226: 843-855. DOI: 10.1007/s00217-007-0605-0
- KOŁODZIEJ B., MAKSYMIEC N., DROZDZAL K., ANTONKIEWICZ J. 2012. *Effect of traffic pollution on chemical composition of raw elderberry (Sambucus nigra L.)*. J. Elem., 17: 67-78. DOI: 10.5601/jelem.2012.17.1.06
- LEE J., FINN CH.E. 2007. *Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (Sambucus canadensis) and European elderberry (S. nigra) cultivars*. J. Sci. Food Agri., 87: 2665-2675. DOI: 10.1002/jsfa.3029
- LUKASKI H.C. 2004. *Vitamin and mineral status: Effects on physical performance*. Nutrition, 20: 632-644. DOI: 10.1016/j.nut.2004.04.001
- MA Y., WU H. 2012. *Chemical constituents of Sambucus L*. Chinese J. Org. Chem., 32: 2063-2072. DOI: 10.6023/cjoc.201204025
- MARTINIC E., FOTIRIC M. 2007. *Selection of black elderberry (Sambucus nigra L.) and evaluation of its fruits usability as biologically valuable food*. Genetika, 39: 305-314.
- OCHMIAN I., OSZMIANSKI J., SKUPIEN K. 2009. *Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits*. J. Appl. Bot. Food Qual., 83: 64-69.
- PRENTICE A., SCHOENMAKERS I., LASKEY M.A., DE BONO S., GINTY F., GOLDBERG G.R. 2006. *Nutrition and bone growth and development*. P. Nutr. Soc., 65: 348-360. DOI: 10.1079/PNS2006519
- SCHIEBER I.F., MERCER J.F.B., DRINGEN R. 2014. *Metabolism and functions of copper in brain*. Prog. Neurobiol. 116: 33-57. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2014.01.002
- SCHMITZER V., VEBERIC R., SLATNAR A., STAMPAR F. 2010. *Elderberry (Sambucus nigra L.) Wine: A product rich in health promoting compounds*. J. Agric. Food Chem., 58: 10143-10146. DOI: 10.1021/jf102083s
- SIERPINSKA T., KONSTANTYNOWICZ J., ORYWAL K., GOLEBIEWSKA M., SZMITKOWSKI M. 2014. *Copper deficit as a potential pathogenic factor of reduced bone mineral density and severe tooth wear*. Osteoporosis Int., 25: 447-454. DOI: 10.1007/s00198-013-2410-x

-
- TAKEDA E., YAMAMOTO H., YAMANAKA-OKUMURA H., TUKETANI Y. 2012. *Dietary phosphorus in bone health and quality of life*. *Nutr. Rev.*, 70: 311-321. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2012.00473.x
- VEBERIC R., JAKOPIC J., STAMPAR F., SCHMITZER V. 2009. *European elderberry (Sambucus nigra L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols*. *Food Chem.*, 114: 511-515. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.080
- ZAFRILLA P., VALERO A., GARCIA-VIGUERA C. 1998. *Stabilization of strawberry jam colour with natural colourants*. *Food Sci. Technol. Int.*, 4: 99-105. DOI: 10.1177/108201329800400204

See discussions, stats, and author profiles for this publication at:
<http://www.researchgate.net/publication/273222909>

Basic nutritional properties of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars grown in the Czech Republic

ARTICLE *in* ACTA ALIMENTARIA · JUNE 2015

Impact Factor: 0.27 · DOI: 10.1556/AAlim.2014.0013

READS

35

5 AUTHORS, INCLUDING:



[Milena Vespalcova](#)

Brno University of Technology

5 PUBLICATIONS 17 CITATIONS

SEE PROFILE



[Jaromír Pořízka](#)

Brno University of Technology

5 PUBLICATIONS 0 CITATIONS

SEE PROFILE

BASIC NUTRITIONAL PROPERTIES OF CORNELIAN CHERRY (*CORNUS MAS* L.) CULTIVARS GROWN IN THE CZECH REPUBLIC

J. CETKOVSKÁ^a, P. DIVIŠ^{a*}, M. VESPALCOVÁ^a, J. POŘÍZKA^a and V. ŘEZNIČEK^b

^a Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology,
Purkyňova 118, Brno, Czech Republic

^b Mendel University in Brno, Faculty of Horticulture, Department of Breeding and Propagation of Horticultural
Plants, Valtická 337, Lednice, Czech Republic

(Submitted: 30 April 2013; accepted: 25 June 2013)

The ascorbic acid, total polyphenols, total anthocyanins and mineral content, together with antioxidant activity, was determined in five Czech, two Ukrainian and two Austrian cultivars of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) widely grown in the Czech Republic. Ascorbic acid content varied between 199–433 mg kg⁻¹, total polyphenols between 2174–6143 mg kg⁻¹, and total anthocyanins between 61–253 mg kg⁻¹. All fruits were good sources of major metals (K, Ca, Mg, Fe, and Mn) and trace elements (Cu, Zn, and Cr). The antioxidant activity was determined by EPR and DPPH radical scavenging assay and ranged from 29.5% to 67.2%. There was a linear relationship between antioxidant activity and total polyphenol content. Based on the obtained results, Ekotišnovský, Fruchtal, and Ruzyňský cultivars were recommended for further investigation and breeding programme of cornelian cherry fruit in the Czech Republic.

Keywords: cornelian cherry, antioxidant activity, mineral elements, ascorbic acid, polyphenols

The significance of less common fruit trees is not negligible. Most of them have modest demands for growing conditions and grow well in extreme habitats. They can be harvested every year, and their fruit have a high biological value with beneficial effects on human health.

Cornelian cherry (*Cornus mas*, L.) is 2–8 m high shrub cultivated mainly in Central and Southern Europe, in Asia Minor, and in the Caucasus. The fruit of cornelian cherry are two-seeded, red coloured, oval shaped, 10–30 mm long drupes with a weight of 2–5 g, containing many nutritive substances (KARADENİZ et al., 2002; DEMİR & KALYONCU, 2003; PAPERŠTEIN et al., 2009). They are suitable for direct consumption, however, they are mostly processed into various products, such as jams, jellies, marmalades, stewed fruit, yogurts, juice, syrups, and liquors.

In earlier times cornelian cherry was widely cultivated in southern regions of the Czech Republic, nowadays it is nearly forgotten, although it still wildly grows in this locality. One of the reasons is the fact that cornelian cherry is still not mentioned in the Czech National List of Varieties and thus it is out of interest for the farmers.

The aim of this work was to determine five nutritional parameters in nine cornelian cherry cultivars that predominantly grow in the Czech Republic, to compare each variety on the basis of the obtained results, and to select the best cultivar for a breeding programme of cornelian cherry fruit in the Czech Republic.

* To whom correspondence should be addressed.

Phone: +420-54114-9454; fax: +420-541211697; e-mail: divis@fch.vutbr.cz

1. Materials and methods

1.1. Samples

Fruit were harvested within the period of 2009–2010 in the experimental orchards of Brno Mendel University in Žabčice (approx. 20 km south of Brno city, Czech Republic). Average altitude of this locality is 185 metres, mean precipitations oscillate in from 450 to 550 mm per year and average year temperature reaches 9.3 °C. The soil type in the orchard was classified as sandy-clay alluvial soil consisting mostly of marginal weathered material rich in organic compounds. Samples were stored under –18 °C prior analysis and analysed as soon as possible. The samples represented nine varieties of cornelian cherry: Ekotišnovský, Olomoucký, Ruzyňský, Sokolnický, Tišnovský (Czech cultivars), Fruchtal, Joliko (Austrian cultivars), and Lukjanovskij and Vydubeckij (Ukrainian cultivars). Before the analysis, thirty randomly chosen fruit were mixed together and used for the analyses. From the selected fruit purée was made using a mixer and the final average sample was obtained by dividing into quarters.

1.2. Chemical analysis

Ascorbic acid was determined after homogenization of 5–6 g of cornelian cherry sample with 2% metaphosphoric acid. Homogenized samples were filtered through 0.45 µm nylon filter before the analysis on High Performance Liquid Chromatograph (Waters 1515, Waters Corporation, USA). The L-ascorbic acid standard was used to calibrate the chromatograph. Total amount of 20 µl filtered solution was injected on Gemini Reversed Phase C18 column (150 × 4.6 mm; 5 µm; Phenomenex) with Security Guard Cartridges (Gemini C18 4 × 3 mm, Phenomenex). Mobile phase consisted of 0.1 M KH₂PO₄ and contained 10% (v/v) of methanol. The isocratic flow of mobile phase was set to 1 ml min⁻¹. Analysis was performed at 30 °C and the analyte was detected using UV-VIS detector (Waters 2487, Waters Corporation, USA) at 254 nm.

The extract for total polyphenols and anthocyanins analysis was prepared from 20 g of fruit purée and 100 ml of ultrapure water acidified by 0.1 M HCl. After thorough mixing, the mixture was centrifuged at 6000 r.p.m. for 10 min and filtered. Total polyphenols were determined by UV-VIS spectrophotometer (Helios Gamma, Thermo Fisher Scientific) using Folin-Ciocalteu reagent (POPOVIC et al., 2012). Gallic acid was used as standard.

Total anthocyanins were measured at 510 and 700 nm in two buffers at pH 1.0 and 4.5 using pH-differential spectrophotometric method (POPOVIC et al., 2012).

Antioxidant activity was performed using electron paramagnetic resonance spectrometer (Miniscope MS 300, MagnetTech, Germany) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay (POLOVKA, 2006). Each sample extract was diluted 50 times prior the addition of 'DPPH solution (concentration c_{DPPH} in ethanol=0.63 mmol l⁻¹). Antioxidant activity of the sample was quantified by comparison of 'DPPH relative concentration after 14 minutes from mixing the 'DPPH solution with the sample. The antioxidant activity was expressed as a decrease of relative 'DPPH concentration.

The mineral content was determined after wet-ashing of 500 mg dry weight fruit sample in a microwave oven (Milestone 1200, Bergamo, Italy) using 6 ml of a mixture (2:1) of nitric acid and hydrogen peroxide and a defined time performance program. Analysis of all samples was performed on Q-ICP-MS (X-series, Thermo Scientific) with the following conditions: plasma gas flow 13 l min⁻¹, auxiliary gas flow 0.7 l min⁻¹, nebuliser gas flow 0.9 l min⁻¹,

forward power 1300 W. Collision cell containing Ar-He gas mixture (5 ml min⁻¹) was used during the measurement to reduce the spectral interferences. The instrument was calibrated using multielemental standard solution prepared by mixing standards of individual elements of interest.

1.3. Statistical analysis

The data obtained were analysed statistically in Statistica 10.0 software (Stat Soft, Inc.) and the results were displayed in mean values with standard deviation (n=3). Significance of the differences among the numbers was determined by Duncans multiple range test at P<0.05 significance level.

2. Results and discussion

The results from analyses of selected cultivars are given in Tables 1 and 3.

The highest content of ascorbic acid (vitamin C) was measured in Ekotišovský cultivar (433 mg kg⁻¹), while the lowest in Vydubeckij cultivar (198 mg kg⁻¹). These results are in accordance with the results obtained by the Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd. (Czech Republic) during the years 2004–2006 (PAPRŠTEJN et al., 2009). On the other hand, ROP and co-workers (2010) measured almost 10 times higher ascorbic acid content in 12 different cornelian cherry cultivars (6 of them were the same as in this study) harvested in the experimental orchard of Tomas Bata University Zlin (Czech Republic) within the period of 2007–2009. For the comparison, the contents of ascorbic acid in cornelian cherries grown in other parts of Europe and Asia are shown in Table 2. As can be seen the ascorbic acid content in the studied cultivars can be compared with other cultivars grown in the other part of world, however some cornelian cherries, mainly from Azerbaijan, Greece, and Turkey, can be richer in ascorbic acid compared to our studied cultivars. In the average, consumption of 100 mg of investigated fruit cultivars can cover about 30% of recommended dietary allowance of vitamin C for woman and men (DRISKELL, 2009).

Table 1. Total anthocyanins (c_{ACY}), ascorbic acid (c_{AA}), total polyphenols (c_{TP}) content and antioxidant activity (AOA) of cornelian cherry cultivars

Cultivar	c_{ACY} , mg kg ⁻¹	c_{AA} , mg kg ⁻¹	c_{TP} , mg kg ⁻¹	AOA, %
Ekotišovský	220±3 ^e	433±36 ^d	6143±195 ^e	67.25±1.25 ^e
Fruchtal	194±5 ^d	365±24 ^c	4117±84 ^c	60.95±0.15 ^d
Joliko	61±7 ^a	233±14 ^{ab}	2174±77 ^b	37.3±3.5 ^b
Lukjanovskij	347±4 ^e	214±43 ^{ab}	1823±10 ^a	37.3±0.6 ^b
Olomoucký	160±6 ^c	335±30 ^c	2438±35 ^{bc}	29.55±1.75 ^a
Ruzyňský	253.8±2.9 ^f	348±12 ^c	4259±131 ^e	52.0±3.6 ^c
Sokolnický	99.2±0.4 ^b	390±18 ^{cd}	3621±9 ^d	41.61±1.20 ^b
Tišnovský	153.4±1.3 ^c	249±19 ^b	2683±13 ^c	41.4±0.7 ^b
Vydubeckij	109.8±0.8 ^b	199±17 ^a	4782±172 ^f	51.6±1.6 ^c

Values in the same column with different letters are significantly different at P<0.05

Table 2. Comparison of ascorbic acid content in different cornelian cherry cultivars grown around the world

Cultivar	Location	Ascorbic acid, mg kg ⁻¹	Reference
Ekotišnovský, Olomoucký, Ruzyňský, Sokolnický, Tišnovský, Fruchtal, Joliko Lukjanovskij, Vydubeckij	Czech Republic, South Moravia	199–433	This study
n.a.	Alborz Mountain Chain, Guilan, North Iran	446	HASHEMPOUR et al., 2010
C14, C15, C24, C25, C26, C27	Arasbaran, East Azerbaijan	1655–2995	HASSANPOUR et al., 2011
01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 12, 15	Çoruh valley, Turkey	437–767	GÜLERYÜZ et al., 1998
n.a.	Konya region, Turkey	730	KALYONCU et al., 2009
n.a.	Samsun, Turkey	160–888	TURAL & KOCA, 2008
14-09, 44-01, 44-05, 44-16, 44-18, 44-20, 44-24, 44-26, 67-01, 77-04, 77-05, 77-06, 77-09, 77-10, 78-03, 78-05	Western Black Sea and Inner Anatolia regions, Turkey	290–1120	YILMAZ et al., 2009
n.a.	North-eastern Anatolia, Turkey	372	ASLANTAS et al., 2007
CPC16, KC1, KC2, Bačka, R1, PPC1, KDC1, KDC3, KKC1	Serbia	149–388	BIJELIC et al., 2011
260 different genotypes	Gemer region, Slovakia	164–385	BRINDZA et al., 2009
n.a.	Georgia	505–1280	MAGHRADZE et al., 2009
Bolestraszycki, Dublany, Florianka, Juliusz, Kresowiak, Paczoski, Podolski, Raciborski, Słowianin, Szafer	Poland	342–750	KUCHARSKA et al., 2011
Vermio	Veria, Northern Greece	1633	PANTELIDIS et al., 2007

n.a.: not available

Total polyphenol content was the highest in Ekotišnovský cultivar (6143 mg kg⁻¹) and the lowest in Lukjanovskij cultivar (1823 mg kg⁻¹). The obtained results were within the limits of the values published by several authors for cornelian cherries from Czech Republic, Poland, Turkey, or Iran (TURAL & KOCA, 2008; YILMAZ et al., 2009; HASHEMPOUR et al., 2010; ROP et al., 2010; KUCHARSKA et al., 2011), but were lower than the values reported by PANTELIDIS and co-workers (2007) in Vermio cultivar from Greece (15 920 mg kg⁻¹). The differences in total polyphenol content may be caused by the different extraction method used in that study compared to the other studies. It is well known that water extracts may have a lower extraction yield compared to application of organic solvents (KRATCHANOVA et al., 2010), however in food industry the cornelian cherry products are processed without support of organic compounds and thus water extraction can provide useful information in relation to the absorption of these substances by the human metabolism. The total polyphenol content correlated well with the antioxidant activity (Fig. 1., R²=0.7985), which confirms the hypothesis that consumption of cornelian cherry can strengthen the immune system and generally may have positive effect on human health.

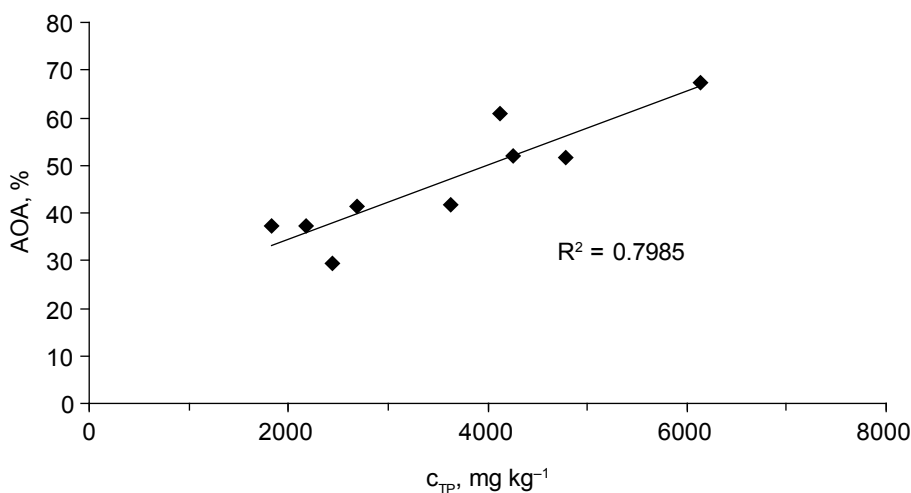


Fig. 1. Correlation between total polyphenols content (cTP) and DPPH radical activity (AOA)

The content of total anthocyanins ranged from 61 mg kg⁻¹ (Joliko cultivar) to 347 mg kg⁻¹ (Lukjanovskij cultivar). These results are in agreement with the results published by SEERAM and co-workers (2002) and BIJELIC and co-workers (2011) who analysed cornelian cherries from Serbia and the USA. Significantly higher anthocyanin concentrations (1068–4421 mg kg⁻¹) were measured in cornelian cherries from Turkey, Iran (TURAL & KOCA, 2008; YILMAZ et al., 2009; HASSANPOUR et al., 2011), and Greece (PANTELIDIS et al., 2007).

The highest antioxidant activity was observed in Ekotišnovský cultivar (67.2%), while the lowest in Olomoucký cultivar (29.5%). In other similar studies the antioxidant activity ranged from 31% to 94.3% (YILMAZ et al., 2009; HASSANPOUR et al., 2011), although it was determined by different analytical methods.

The dominating mineral element in cornelian cherry cultivars was potassium. The potassium concentration varied between 4425 mg kg⁻¹ and 9729 mg kg⁻¹. Other important major elements related to human health are calcium, magnesium, iron, and manganese. In the average, the analysed cornelian cherry cultivars contained 931 mg kg⁻¹ Ca and 277 mg kg⁻¹ Mg. The iron and manganese contents were about 1 mg kg⁻¹. The results of elemental analysis showed that all cornelian cherry cultivars are rich in essential metals (0.40–4.48 mg kg⁻¹) except for chromium that was present in trace amount (0.023–0.23 mg kg⁻¹). There are relatively few studies dealing with the mineral content of cornelian cherry. KALYONCU and co-workers (2009) reported significantly higher concentrations of major elements compared to this study. Nevertheless it can be said that the measured results are in agreement with the published data (ASLANTAS et al., 2007; BIJELIC et al., 2011). All measured major and minor metal concentrations are below the tolerable upper intake levels and it can be concluded that, in the average, consumption of 100 mg cornelian cherry fruit cover about 6–25% of the recommended dietary allowance of potassium, calcium, iron, manganese, copper, zinc, and chromium for woman and men (DRISKELL, 2009).

Table 3. Mineral composition of all tested cornelian cherry cultivars

	E	F	J	L	O	R	S	T	V
K	9 045±346 ^{de}	8 309±455 ^{cd}	6 643±292 ^{bc}	5 672±325 ^b	8 936±248 ^{de}	9 729±122 ^c	5 721±304 ^b	7 918±125 ^c	4 225±394 ^a
Ca	941±56 ^{b-d}	1164±142 ^d	517±84 ^a	793±45 ^b	995±57 ^{b-d}	1095±95 ^{cd}	984±51 ^{b-d}	1036±75 ^{b-d}	858±39 ^{bc}
Mg	393±35 ^{de}	326±43 ^d	174±26 ^{bc}	214±17 ^c	113±18 ^{ab}	430±37 ^e	373±58 ^{de}	107±6 ^b	72±9 ^a
Fe	1.0±0.3 ^{ab}	1.62±0.08 ^{bc}	1.55±0.14 ^{bc}	1.83±0.25 ^e	1.43±0.16 ^{bc}	1.24±0.13 ^b	1.37±0.24 ^b	0.46±0.09 ^a	0.48±0.14 ^a
Mn	1.92±0.07 ^e	1.37±0.06 ^{cd}	1.07±0.05 ^b	1.27±0.04 ^e	1.95±0.13 ^e	1.54±0.07 ^d	1.27±0.05 ^e	0.71±0.03 ^a	1.83±0.09 ^a
Cu	0.79±0.28 ^a	3.6±0.4 ^e	2.01±0.09 ^{cd}	3.14±0.09 ^e	1.59±0.05 ^{bc}	2.37±0.16 ^d	1.39±0.08 ^b	0.53±0.05 ^a	0.67±0.09 ^a
Zn	3.18±0.15 ^c	3.20±0.23 ^{cd}	2.59±0.13 ^{bc}	4.01±0.25 ^{ef}	4.42±0.24 ^f	3.51±0.14 ^{de}	2.51±0.06 ^b	0.48±0.13 ^a	2.89±0.23 ^{bc}
Cr	0.17±0.03 ^a	0.12±0.06 ^a	0.22±0.13 ^b	0.23±0.03 ^b	0.18±0.06 ^b	0.095±0.013 ^a	0.13±0.05 ^a	0.025±0.009 ^a	0.073±0.025 ^a

(E): Ekotišnovský; (F): Fruchtal; (J): Joliko; (L): Lukjanovskij; (O): Olomoucký; (R): Ruzyňský; (S): Sokolnický; (T): Tišnovský; (V): Vydubeckij. Values in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$, all concentrations are in mg kg^{-1}

3. Conclusion

This study showed that Czech cultivars of cornelian cherry are comparable with the cornelian cherry cultivars grown around Europe and Western Asia in terms of ascorbic acid, polyphenols, anthocyanins, and mineral contents and antioxidant activity. The minor differences in the content of the studied compounds can be caused by several factors, soil type, geographical and environmental conditions, degree of fruit ripeness, manipulation during fruit processing, and selection of analytical methods. From the analysed cultivars the Ekotišnovský, Fruchtal, and Ruzyňský cultivars were evaluated as best in terms of the evaluated parameters and they can be recommended for the breeding programme of cornelian cherry fruit in the Czech Republic.

*

This work was supported by the National Agency for Agriculture Research, grants No. QH82232 and QI111A141.

References

- ASLANTAS, R., PIRLAK, R. & GÜLERYÜZ, M. (2007): The nutritional value of wild fruits from the North Eastern Anatolia region of Turkey. *Asian J. Chem.*, 19, 3072–3078.
- BIJELIC, S.M., GOLOŠIN, B.R., NINIC TODOROVIC, J.I., CEROVIC, S.B. & POPOVIC, B.M. (2011): Physicochemical fruit characteristics of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes from Serbia. *Hort. Sci.*, 46, 849–853.
- BRINDZA, P., BRINDZA, J., TÓTH, D., KLIMENKO, S.V. & GRIGORIEVA, O. (2009): Biological and commercial characteristics of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) population in the gemer region of Slovakia. *Acta Hort.*, 818, 85–94.
- DEMIR, F. & KALYONCU, I.H. (2003): Some nutritional, pomological and physical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *J. Fd Eng.*, 60, 335–341.
- DRISKELL, J.A. (2009): *Upper safe limits of intake for adults: Vitamins and minerals*. NebGuide G1981, UNL Extension, Nebraska. 4 pages
- GÜLERYÜZ, M., BOLAT, I. & PIRLAK, L. (1998): Selection of table cornelian cherry (*Cornus mas* L.) types in Coruh Valley. *Tr. J. Agric. Forest.*, 22, 357–364.
- HASHEMPOUR, A., GHAZVINI, R.F., BAKHSHI, D., GHASEMNEZHAD, M., SHARAFI, M. & AHMADIAN, H. (2010): Ascorbic acid, anthocyanins, and phenolic contents and antioxidant activity of ber, azarole, raspberry and cornelian cherry genotypes growing in Iran. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 51, 83–88.
- HASSANPOUR, H., HAMIDOGHLI, Y., HAJILO, J. & ADLIPOUR, M. (2011): Antioxidant capacity and phytochemical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes in Iran. *Sci. Hortic.*, 129, 459–463.
- KALYONCU, I.H., ERSOY, N. & YILMAZ, M. (2009): Physico-chemical and nutritional properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Asian J. Chem.*, 21, 6555–6561.
- KRATCHANOVA, M., DENEV, P., CIZ, M., LOJEK, A. & MIHAILOV, A. (2010): Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochim. Pol.*, 57, 229–234.
- KUCHARSKA, A.Z., SOKOL-LETOWSKA, A. & PIORECKI, N. (2011): Morfologiczna, fizykochemiczna i przeciwutleniająca charakterystyka owoców polskich odmian derenia właściwego (*Cornus mas* L.). (Morphological, physicochemical, and antioxidant profiles of Polish varieties of cornelian cherry fruit (*Cornus mas* L.)) *Zywn.-Nauk Technol. Jakosc*, 18, 78–89.
- MAGHRADZE, D., ABASHIDZE, E., BOBOKASHVILI, Z., TCHIPASHVILI, R. & MAGHLAKELIDZE, E. (2009): Cornelian cherry in Georgia. *Acta Hort.*, 818, 65–72.
- PANTELIDIS, G.E., VASILAKAKIS, M., MANGANARIS, G.A. & DIAMANTIDIS, GR. (2007): Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Fd Chem.*, 102, 777–783.
- PAPRŠTEJN, F., KOSINA, J., SEDLÁK, J. & ŘEZNIČEK, V. (2009): *Technologie pěstování dřínu obecného* *Cornus mas* L. (Cultivation technology of cornelian cherry *Cornus mas* L.) Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd. 30 pages

- POLOVKA, M. (2006): EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. *J. Food Nutr. Res.*, *45*, 1–11.
- POPOVIC, B.M., ŠTAJNER, D., KEVREŠAN, S. & BIJELIC, S. (2012): Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) – comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods. *Fd Chem.*, *134*, 734–741.
- ROP, O., MLCEK, J., KRAMAROVA, D. & JURIKOVA, T. (2010): Selected cultivars of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) as a new food source for human nutrition. *Afr. J. Biotechnol.*, *9*, 1205–1210.
- SEERAM, N.P., SCHUTZKI, R., CHANDRA, A. & NAIR, M.G. (2002): Characterization, quantification and bioactivities of anthocyanins in *Cornus* species. *J. Agric. Fd Chem.*, *50*, 2519–2523.
- TURAL, S. & KOCA, I. (2008): Physico-chemical and antioxidant properties of Cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Sci. Hortic.*, *116*, 362–366.
- YILMAZ, K.U., ERCISLI, S., ZENGIN, Y., SENGUL, M. & KAFKAS, E.Y. (2009): Preliminary characterisation of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes for their physico-chemical properties. *Fd Chem.*, *114*, 408–412.

Impact of different viticulture systems on elemental composition of *Vitis vinifera* and wine and on total antioxidant activity of wine

Jaromír POŘÍZKA^{1,2*} · Pavel DIVIŠ^{1,2} · Zuzana OLŠOVCOVÁ¹ · Jiřina OMELKOVÁ¹

1: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food science and Biotechnology, Brno, Czech Republic

2: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Centre for Materials Research CZ.1.05/2.1.00/01.0012, Purkyňova 464/118, Brno, Czech Republic

*Corresponding author: Tel: +420 776 00 95 91, xcporizkaj@fch.vutbr.cz

Abstract

Aim: The aim of this study was the comparison of organic viticulture system with viticulture controlled by integrated pest management (IPM) in terms of their influence on elemental composition of grapevine leaves, grapes and wine from one specific vineyard. In addition to elemental analysis, differences in total antioxidant activity of wines from organic grapes and from grapes grown by IPM were studied.

Method and results: The determination of 17 elements, which were selected on the basis of plant nutrition, toxicological and dietary point of view was performed. Elemental analysis of samples was carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-Q-MS) technique. For comparison of radical scavenging activity, electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) with DPPH method was used.

Conclusion: Results of this study showed that quantity and manner of pesticide application is very important factor affecting the final elemental composition of the grapevine and wine, especially the content of copper, zinc and manganese. However, both farming systems examined in this study were able to produce grapes for winemaking which meets quality and safety standards according to Czech and European legislation. In the case of this study, the influence of vine growing under different farming systems on the total antioxidant activity of wine was found to be insignificant.

Significance and impact of the study: Previous studies, presented in this field, showed, that farming practice is very important factor affecting final chemical composition of wine. However, most of them are comparing old conventional approaches with organic. Presented study is focused on comparison of currently the most widely used sustainable viticulture systems - integrated pest management and organic viticulture, in terms of the impact on elemental composition and antioxidant activity, which bring useful informations about food safety and also gives feedback for farmers how specific way of treatment is influencing the vine and wine.

Keywords: Wine, Elemental analysis, Antioxidant activity, Organic viticulture, Integrated pest management, Pesticides

Résumé

Objectif: Le but de cette étude est de comparer des systèmes issus de viticulture biologique avec ceux basés sur les principes de la Protection Intégrée des Cultures (PIC), en termes d'influence sur la composition élémentaire des feuilles de vigne, des raisins et du vin d'un vignoble spécifique. En plus de l'analyse élémentaire, une comparaison de l'activité antioxydante totale des vins issu de la viticulture biologique et de la viticulture utilisant la Protection Intégrée des Cultures (PIC) a été réalisé.

Méthodes et résultats: 17 éléments constitutifs ont été sélectionnés sur la base de la nutrition des plantes, d'un point de vue toxicologique et alimentaire. L'analyse de ces éléments a été réalisé par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-Q-MS). La comparaison du piégeage des radicaux libres a été réalisé grâce à la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (RPE) et à la méthode DPPH.

Conclusion: Les résultats de cette étude montre que la quantité et le mode d'application de pesticides est un facteur très important qui influe sur la composition élémentaire finale de la vigne et du vin, en particulier pour la teneur en cuivre, en zinc et en manganèse. Néanmoins, les deux systèmes d'exploitation étudiés sont capables de produire des raisins pour la vinification qui répondent aux normes de qualité et de sécurité selon la législation tchèque et européenne. Dans le cas de cette étude, l'influence des différents systèmes d'exploitation sur l'activité antioxydante totale de vin a été jugée insignifiante.

Signification et impact de l'étude: Des études réalisées antérieurement dans ce domaine montrent que le type d'agriculture est un facteur important affectant la composition chimique finale du vin. Cependant, la plupart d'entre elles comparent des approches conventionnelles anciennes avec l'agriculture biologique. Cette étude porte sur les systèmes de viticulture durables les plus utilisés et leur comparaison en termes d'impact sur la composition élémentaire et l'activité antioxydante. Ces données fournissent des informations utiles relatives à la qualité sanitaire et informent en retour les agriculteurs quant à la manière dont des traitements spécifiques peuvent influencer la vigne et le vin.

Mots clés: Vin, analyse élémentaire, activité antioxydante, viticulture biologique, protection intégrée des cultures, pesticides

INTRODUCTION

Wine is a popular alcoholic beverage made from grapes of *Vitis vinifera* or other genus of *Vitis*, such as *Vitis labrusca* (Jackson, 2008). Grape cultivation is dating back to more than 7500 years (McGovern *et al.*, 1996). Throughout this years, demands for better wine started the process of improvement in viticulture, winemaking and storage in order to satisfy the requirements of the consumers and to obtain the maximum yield of desired quality (Jackson, 2008; Francis, 2000). The agriculture in the 1950's and 1960's emphasized usage of mechanization, synthetic fertilizers and pesticides, which resulted in very high yields of crops sold at a very low cost, but the reality was that the price did not reflect issues like pollution problems, environmental damage etc. That creates concerns about long-term sustainability of this conventional system leading to the development of new sustainable agriculture approaches (Thomas *et al.*, 2014). In general, there are two main alternative viticulture systems replacing conventional principles of winegrowing in the countries registered in International Organisation of Vine and Wine (OIV) - the *Organic viticulture* (OV) and the viticulture managed by the rules of *Integrated pest management* (IPM) (Willer *et al.*, 2014).

The essential points of organic agriculture are described by the International federation of organic agriculture movement (IFOAM). Specifics about labeling and certification undergoes to local legislation prescriptions, for example in European union to Council Regulation (EC) No 834/2007 and No 889/2008, in USA it is defined by regulations of US Department of Agriculture. Offerman and Nierberg estimated approximately 20% lower overall input costs of organic farms by lowering amounts of fertilizers, chemicals and energy, even when labor costs are much higher in comparison with conventional agriculture (Offermann *et al.*, 2000). Also, it is proven, that organic food contains less contaminants (Baker *et al.*, 2002; Kristiansen *et al.*, 2006) and higher level of secondary plant metabolites (Birzele *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2004). Organic farming focuses on minimizing of damage to the environment by avoiding of usage of most mineral salt fertilizers and agrochemical pesticides. Instead, it uses beneficial insects, pheromones or hand weed to reduce pests and disease. It also builds natural soil fertility by feeding soil instead of plant (Weigle *et al.*, 2014). If there is a real threat to a crop, only authorized plant protection products can be used. All products or substances shall be of plant, animal, microbial or mineral origin, except where products from such sources are not available in sufficient quantities or if alternatives are not available. List of protection substances is included in European

regulation (EC) No 834/2007 Annex IIB. For example, copper and sulfur based agents are approved to control major pests and diseases (Fragoulis *et al.*, 2009).

Integrated pest management was initially developed more from problem solving, than from a focus on protecting the environment integrates several control strategies to reduce reliance on pesticides. Targeted chemical crop protection can be applied if biological methods are not satisfactory and maximal application doses are set by the European Initiative for Sustainable Development in Agriculture (EISA) and by the regulations subjected to local initiatives of IPM, which is doing supervision and grants the permit for using IPM label on products. Timing of application of protective agents was greatly improved by development of pest and disease outbreaks prediction computer software, geographical information system and by usage of solar-powered weather stations (Worth *et al.*, 2012). Cliff Ohmart defined IPM as a sustainable approach for managing pest by combining biological, cultural and chemical tools in a way, that minimizes economical, environmental and health risks (Ohmart, 2011). Cowell and Clift presented the suggestion, that yields of integrated farming are somewhere in the middle between high yields of conventional agriculture and the lower of organic (Cowell *et al.*, 1995). This implies an idea, that IPM can be accepted as a third way for agriculture, which is economically realistic and friendly to environment.

Both agricultural systems emphasize different strategies of growing and protecting of grapevine, which is reflected in the final quality and quantity of production. One of the most important quality standards that can be easily quantified is *elemental composition* of grapes and wine because the elemental composition of grapes is influenced by viticulture practice, grapevine cultivar, environmental pollution, soil and climatic conditions (Jackson, 2008; Kabata-Pendias, 2011). Elemental analysis is very useful tool for determining of nutritional value and toxicological safety of the product. Macro and micro elements such as Ca, Cr, Co, K, Se, Zn, presented in grapes and wines are important cofactors in vitamins and enzymes and have beneficial effect for human organism in optimal concentrations. On the other hand As, Cd, Pb and Br are potentially toxic in higher concentrations (Jackson, 2008; Monaci *et al.*, 2003). Some of the elements can have negative impact on sensorial properties of wine. Higher concentrations of copper and iron can cause metallic and astringent tastes and they catalyze oxidative reactions which modifies taste and may induce haziness (Jackson, 2008). Another application of elemental analysis was used by Salvo used the elemental analysis to determine the correlation between the usage of specific protective agents in viticulture and the concentration of Cd, Cu, Pb, Zn in wine. It was proven, that application of different protective agents reflects in elemental profile of grapes and wines (Salvo *et al.*, 2003).

Another important parameter associated with the quality of wine is *total antioxidation activity*. The antioxidation properties of wines are mainly connected with polyphenolic compounds (Stasko *et al.*, 2008). It's a large group of more than 8000 substances for which it is proven to have some human health beneficial effects, like insulin resistance, depression of blood fat, inhibition of destruction of collagen and others (Jackson, 2008; Chiva-Blanch *et al.*, 2001; Djilas *et al.*, 2009; Arvanitoyannis, 2006; Moure *et al.*, 2001; Ju *et al.*, 2005; Co *et al.*, 2009). Phenolic compounds also protects and enhance wine itself because they are removing oxygen and reducing redox potential which is important effect of wine-bottle maturation. In addition to that, polyphenols have a significant effect on sensorical characteristics of wines like appearance, taste, mouth-feel and fragrance (Jackson, 2008). These compounds, mostly flavonoids are initially accumulated in leaves and they are transported into grapes in the stage of ripening and finally, those compounds are transported to the wine during winemaking process (Revilla *et al.*, 1998; Luque-Rodriguez *et al.*, 2007; Cortell *et al.*, 2007). Beside the polyphenolic compounds, carotenoids also participates on the total antioxidant activity of wine. Previous work showed, that pesticide application, fertility of soil and overall health condition of plant may have significant effects on content those secondary metabolites (Brandt *et al.*, 2001; Rapisarda *et al.*, 2005). Vrček in her research demonstrated that wines from organic grapes shows a higher phytochemical concentration and a higher antioxidant activity than wines from conventionally growned grapes (Vrček *et al.*, 2011).

The aim of this study is the comparison of organic and integrated viticulture systems in terms of their influence on elemental composition of grapevine leaves, grapes and wine from one vineyard estate after 7 years from reorientation from conventional viticulture. The determination of 17 elements, which were selected on the basis of plant nutrition, toxicological and dietary point of view was performed. Elemental analysis of samples was carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-Q-MS) technique thanks to its high sensitivity and speed (Stroh *et al.*, 1994; Nardi *et al.*, 2009). In addition to elemental analysis, differences in total antioxidant activity of wines from organic grapes and from grapes grown by IPM were studied. For comparison of radical scavenging activity, electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), which is more selective and sensitive than commonly used UV-VIS spectroscopy, was preferably used (Unno *et al.*, 2002; Kilmartin *et al.*, 2001; Valcic *et al.*, 2000).

MATERIALS AND METHODS

1. Site Details

Vineyard estate Aeibis which was taken into this study is situated at village of Ivaň (**Figure 1**) which belongs to Mikulov wine region and it is owned by Holánek winery which runs both organic and integrated farming systems on its vineyards. At 2006 vast majority of land was converted from conventional viticulture to integrated pest management and approximately 20 % of vineyards were converted to organics. From 2009, vineyards achieved certification according to regulations of the Ministry of Agriculture of Czech republic and Association of integrated and ecological production of grapes and wine (EKOVÍN). Organic and integrated sections are separated by a distance of 180 m.

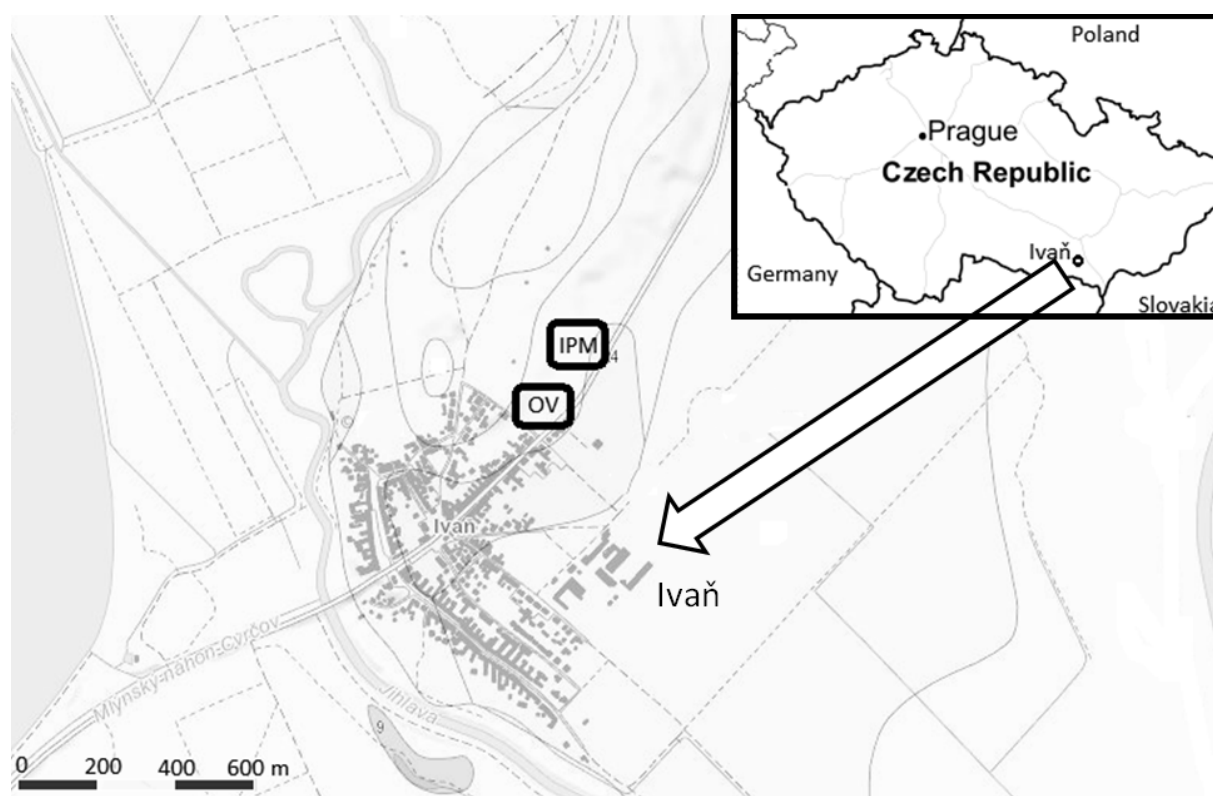


Figure 1 - Map of the situation of vineyards

All tested blocks, which were selected for comparison of farming systems, have very similar soil type and bedrock characteristics. Major proportion of soil is chernozem with high contribution of humus and iron and bedrock is formed by loamy sediments.

Average altitude of selected sampling blocks is 177 m above sea level, long-term average of precipitation is 543 mm and long-term average temperature is 8,4°C. In the year 2013, when samples were gathered for this study, total precipitation was higher than normal, 716 mm and average temperature was slightly lower, 8,1°C. Thanks to the higher winter temperatures and significantly higher precipitation over the vine growing season, there was a high pressure of peronospora and oidium infections which were suppressed by application of protecting agents. Poor weather conditions forced the farmers to use the limit doses of fungicides set by legislation.

Organic vineyards were treated by the combination of copper and sulfur based fungicides with pheromone protection against parasites. Sodium silicate was used for fortification of the plant in the time of the worst fungi infections. Also natural agents made from seaweed were used for improvement of immunity of vine. Vineyards administrated by Integrated pest management system were treated by inorganic and organic fungicides based on copper and zinc. Complete list of protective products with application doses is presented in **Table 1**. Plots were fertilized by the same system, using only organic fertilizers to manage optimal levels of N, P, K in soil and the same crop rotation cycles were used. Viability of plants through season did not require addition of mineral preparates.

Table 1 - List of the protective agents used on tested plots

System	Product Name	Activity	Application	Based on	Dose
OV	Isonet L Plus	Pheromone	2	CAS No. 84364-62-4	-
OV	Kocide 2000	Fungicide	8	Cu(OH) ₂	5,5 kg/ha of Cu
OV	Sulikol K	Fungicide	5	Sulfur	4 kg/ha of S
OV	Vitisan	Fungicide	4	KHCO ₃	3 kg/ha
OV	Aqua Vitrin	Plant Protection	2	Water glass	2,5 l/ha
OV	Algimure	Fungicide	2	Algae extract	-
IPM	Kocide 2000	Fungicide	6	Cu(OH) ₂	2 kg/ha of Cu
IPM	Falcon 460 EC	Fungicide	2	CAS No. 288-88-0	0,3 l/ha
IPM	Folpan 80 WDG	Fungicide	6	CAS No. 73771-08-1	1 kg/ha
IPM	Discus	Fungicide	2	CAS No. 248582-68-5	0,2 kg/ha
IPM	Ridomil MZ GOLD	Fungicide	2	CAS No. 8018-01-7	2,5 kg/ha

2. Sampling and sample preparation

Sauvignon blanc and Pinot noir cultivars of *Vitis Vinifera* from each viticulture system were chosen for comparison and sampled after full *véraison*. The organic fruits were gathered one week after the integrated counterpart. The systematic cluster sampling procedure from different part of vine was used. This sampling approach is more accurate than berry sampling, because in case of berry sampling, there is a tendency to pick the

more mature berries. Mixed sample from clusters gives more representative results (Iland *et al.*, 2004; Kasimatis *et al.*, 1985). A sample blocks of 96 vines in 6 rows were allocated. Samples were gathered evenly at the start, middle and at the end of the row. Three clusters were gathered from each vine, three samplings in every row, so total amount of samples was 54 clusters from each cultivar and viticulture system. Samples of leaves were collected together with clusters, from bottom, center and top of the vine. Transport to laboratory was performed in plastic bags under dry ice conditions.

For the comparison of wines, 2013 Sauvignon from organic and IPM production was sampled from stainless steel tanks into glass bottles. In total, six 0,7 l bottles of wine from each agritech were collected. Wines were stabilized by SO₂. Unfortunately, Pinot noir wine from 2013 organic and IPM production was not available for experiments because yields from this cultivar were not sufficient for winemaker to produce separate production from both farming systems.

Unwashed berries from clusters were purged from solid impurities and dried. After seed separation, berries were grounded in liquid nitrogen into a powder. Every sample was created by mixing of grapes from 3 clusters from one vine. The amount of 300 ± 5 mg of such sample was weighed directly into PTFE vessels and 5 ml of HNO₃ (65 %, v/v, Analytica Praha, Czech republic) and 2 ml of H₂O₂ (30 %, v/v, Analytica Praha, Czech republic) was added. Samples were digested using a microwave digestion system Milestone 1200 (Milestone Inc., Shelton, USA). Digested solutions were quantitatively transferred into 25 ml volumetric flasks and diluted by a purified water (ELGA, UK). 36 samples from each cultivar and viticulture were prepared. All samples were digested in 2 independent replicates. The air-dried leaves samples were prepared by the same way as in the case of berries.

Wine samples were prepared separately for elemental analysis and for analysis of total antioxidant activity. For elemental analysis, wine samples were diluted in ratio 1:1 with purified water. That reduces the ethanol concentration to the level, which is sufficiently low for elimination of problems with matrix effects and plasma instability on ICP-MS. The microwave digestion method for a sample preparation was not used in order to minimize the sample contamination and to obtain the best detection limits (Coetze *et al.*, 2005). Dilution method provides better detection limits without increased risk of the contamination and is faster and simpler. For the EPR experiments, wine samples were diluted with purified water in ratio 1:5 just before mixing it with DPPH solution. Dilution ratio was determined experimentally, to obtain reasonable rate of radical termination reaction.

3. Multielemental analysis

Multi-elemental analysis was carried out on a Thermo X-series inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-Q-MS) with hexapole collision cell working on He/H mode (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Both sample and skimmer cones were made from nickel. The instrument was equipped with autosampler connected to MicroMist concentric nebulizer with Scott-type spray chamber for sample introduction. Experimental data were acquired by Plasma lab software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Optimization of the ICP-Q-MS method was focused on maximizing of sensitivity on desired masses while maintaining oxide ratio for $\text{CeO/Ce} < 0.01$. Typical sensitivity on ^{115}In mass was $> 50\,000$ cps on 1ppb standard of In. The power of radiofrequency generator was set to maximum power of 1400 W. Flow of collision gas and collision cell setting was tuned for assuring < 500 cps on mass 80 to prevent interferences caused by polyatomic species formed in plasma. As internal standards, ^{45}Sc , ^{115}In , ^{232}Th (standards 1 g/L, Analytika Praha, Czech republic) were used for matrix and drift corrections. Introduction of internal standards was performed by Internal standard kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). For elimination of influence of matrix effects, the calibration was prepared by the method of standard addition into the wine. Calibration standards were prepared from 1g/L stock standards (Astasol, Analytika Praha, Czech republic). Data were acquired in peak jump mode with 300 ms dwell time with 100 sweeps. Before the analysis, the ICP-MS method was validated. The limits of detection were calculated from the analytical signal of blank sample and three times standard deviation obtained by the analysis of the blank sample. To check the accuracy of the analysis, the quality control material (Metranal 3, Strawberry leaves, Analytika Praha, Czech republic) and spiked wine samples were analyzed. The average recovery for elements of interest varied between 92 % to 102 %. The RSDs % ($n = 5$) of all measurements were below 3% for all elements. Analysis of all samples was performed in triplicates and results were expressed as mean \pm SD ($n = 5$).

4. Total antioxidant activity analysis

Determination of radical scavenging activity of organic and integrated wines was performed by EPR spectrometer Magnettech MS300 (Magnettech, GmbH, Berlin, Germany). 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) experimental system has been used (Garcia-Alonso *et al.*, 2005; Arvanitoyannis *et al.*, 2006; Petrisor *et al.*,

2007). DPPH was preferred instead of ABTS⁺, because it can be acquired directly without preparation, so is faster and more suitable for this comparative type of work (Labrinea *et al.*, 2004).

Measurement was performed in flat cuvettes to suppress dielectric effect of polar solutions (Weil *et al.*, 2007). Stability test of the reference system (water + DPPH) showed minimal termination of radicals in time of 30 min. Volume of 0.5 ml of diluted sample of wine was mixed with 0.5 ml of ethanolic solution of DPPH ($C_{\text{DPPH}} = 0,517 \text{ mM}$). Mixture in cuvette was inserted into the spectrometer cavity for measurement. Magnetic field of EPR spectrometer was set to 3360 G with 5000 mG modulation and 10 dB of microwave atten. Sweep time of one scan was 11 s Termination of DPPH radicals was observed as lowering of amplitude of spectra which is directly proportional to the concentration of DPPH. Set of 12 spectra with a start in third minute after the addition of DPPH into the diluted wine sample was gathered for each replicate ($n = 5$). As reference system, the purified water was used instead of sample. Comparison of antioxidant properties of organic and integrated wines were evaluated by two quantification methods. By the comparison of relative concentration of DPPH in time $t = 25 \text{ min}$ after mixing with samples and by the conversion to Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) for concentration of DPPH in time $t = 25 \text{ min}$ from the start of experiment.

5. Statistical analysis

The statistical evaluation of experimental data was carried out by Excel table processor (Microsoft, USA) and Statistica software (Statsoft, USA). Differences between the viticulture systems were evaluated on the basis of the hypothesis pooled variance T-test. Means of the concentration of elements were compared separately for leaves, grapes and wine of both cultivars and both viticulture systems. Level of significance was set to 95 %, respectively $\alpha = 0,05$.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Elemental analysis

The results of the comparison, including mean concentrations of selected elements in leaves, grapes and wine, standard deviations are given in **Table 2** and **3** and **4**. All comparisons in this study were made with the assumption that all samples were gathered from the plants of the similar age on the plots with almost identical

soil and environmental and climatic conditions. All these influences were excluded in this study and any significant differences were associated to the vineyard practice.

Table 2 - Mean concentrations of selected elements in samples of leaves in $\mu\text{g/g}$

Isotope	<i>Pinot n. OFS</i>	<i>Pinot n. IFS</i>	<i>Sau. OFS</i>	<i>Sau. IFS</i>
²³ Na	42,2 ± 5,4	52,2 ± 2,8	81,3 ± 2,8	46,6 ± 12,8
²⁴ Mg	2635 ± 93	1679 ± 39	2238 ± 31	2611 ± 174
²⁷ Al	60,9 ± 5,1	54,0 ± 1,7	98,2 ± 9,1	39,2 ± 1,5
³⁹ K	13716 ± 638	12469 ± 398	12079 ± 1177	14242 ± 1992
⁴⁸ Ca	14952 ± 412	18307 ± 411	17913 ± 1070	18245 ± 988
⁵⁵ Mn	58,6 ± 2,7	150 ± 8	93,4 ± 5,5	110 ± 4
⁵⁶ Fe	136 ± 6	146 ± 4	135 ± 8	112 ± 7
⁵⁹ Co	0,095 ± 0,002	0,104 ± 0,003	0,15 ± 0,01	0,102 ± 0,005
⁶⁰ Ni	8,48 ± 1,88	10,8 ± 0,6	28,9 ± 7,1	5,79 ± 0,24
⁶⁵ Cu	325 ± 19	170 ± 5	713 ± 61	104 ± 5
⁶⁶ Zn	12,9 ± 0,7	26,4 ± 0,8	19,0 ± 1,2	27,14 ± 1,6
⁷⁵ As	0,773 ± 0,03	0,820 ± 0,024	1,075 ± 0,036	0,736 ± 0,010
⁸⁸ Sr	83,9 ± 2,3	80,9 ± 2,1	81,8 ± 5,8	84,1 ± 3,9
⁹⁵ Mo	0,318 ± 0,018	0,219 ± 0,005	0,174 ± 0,014	0,628 ± 0,23
¹¹¹ Cd	0,031 ± 0,004	0,037 ± 0,002	0,06 ± 0,005	0,026 ± 0,002
¹³⁷ Ba	9,38 ± 0,41	23,5 ± 0,5	14,3 ± 1,5	13,2 ± 0,3
²⁰⁸ Pb	0,500 ± 0,036	0,615 ± 0,067	0,77 ± 0,09	0,382 ± 0,023

Values are mean ± SD of 36 separately prepared samples (18 sample gathering points; samples prepared in duplicates)

Table 3 - Mean concentrations of selected elements in samples of grapes in µg/g

Isotope	<i>Pinot n. OFS</i>	<i>Pinot n. IFS</i>	<i>Sau. OFS</i>	<i>Sau. IFS</i>
²³ Na	6,65 ± 0,79	5,2 ± 0,73	4,13 ± 0,40	7,18 ± 1,91
²⁴ Mg	413 ± 6	434 ± 9	274 ± 6	351 ± 5
²⁷ Al	45,7 ± 3,4	72,1 ± 0,8	44,4 ± 0,9	46,7 ± 7,2
³⁹ K	13399 ± 1095	13854 ± 392	12429 ± 296	12756 ± 373
⁴⁸ Ca	657 ± 33	783 ± 18	527 ± 10	575 ± 33
⁵⁵ Mn	1,73 ± 0,02	2,12 ± 0,09	2,86 ± 0,066	3,6 ± 0,4
⁵⁶ Fe	17,3 ± 1,2	11,6 ± 1,0	12,4 ± 0,29	12,1 ± 3,5
⁵⁹ Co	0,002 ± 0,0002	0,004 ± 0,0005	0,002 ± 0,0004	0,007 ± 0,002
⁶⁰ Ni	<LOD	3,24 ± 0,37	<LOD	<LOD
⁶⁵ Cu	7,81 ± 0,38	4,45 ± 0,33	4,56 ± 0,22	2,85 ± 0,14
⁶⁶ Zn	1,6 ± 0,8	2,29 ± 0,25	1,15 ± 0,015	1,77 ± 0,17
⁷⁵ As	0,024 ± 0,003	0,031 ± 0,0003	0,016 ± 0,001	0,17 ± 0,027
⁸⁸ Sr	3,11 ± 0,12	2,86 ± 0,06	1,55 ± 0,04	2,19 ± 0,07
⁹⁵ Mo	0,045 ± 0,005	0,038 ± 0,003	0,013 ± 0,001	0,12 ± 0,009
¹¹¹ Cd	0,028 ± 0,004	0,018 ± 0,003	<LOD	<LOD
¹³⁷ Ba	0,467 ± 0,022	1,16 ± 0,03	0,64 ± 0,034	0,461 ± 0,020
²⁰⁸ Pb	<LOD	0,033 ± 0,006	<LOD	<LOD

Values are mean ± SD of 36 separately prepared samples (18 sample gathering points; samples prepared in duplicates)

Table 4 - Mean concentrations of selected elements in wine samples in µg/L

Isotope	<i>Sauvignon OFS</i>	<i>Sauvignon IFS</i>
²³ Na	not measured	not measured
²⁴ Mg	68550 ± 300	73775 ± 2975
²⁷ Al	not measured	not measured
³⁹ K	713 ± 11 ^a	618 ± 25 ^a
⁴⁸ Ca	169 ± 8 ^a	172 ± 6 ^a
⁵⁵ Mn	311 ± 21	380 ± 15
⁵⁶ Fe	321 ± 9	312 ± 11
⁵⁹ Co	0,882 ± 0,425	0,873 ± 0,043
⁶⁰ Ni	18,7 ± 0,19	22,1 ± 0,10
⁶⁵ Cu	931 ± 37	354 ± 24
⁶⁶ Zn	508 ± 6	567 ± 24
⁷⁵ As	22,3 ± 4,6	27,3 ± 0,18
⁸⁸ Sr	162 ± 0,6	135 ± 4,5
⁹⁵ Mo	<LOD	<LOD
¹¹¹ Cd	<LOD	<LOD
¹³⁷ Ba	30,2 ± 0,2	35,0 ± 1,1
²⁰⁸ Pb	2,353 ± 0,048	2,18 ± 0,045

Values are mean ± SD of 5 measurements; K and Ca are presented in mg/L

Most significant differences were observed in residual concentration of copper in all kind of samples. The mean concentrations of copper in leaves, grapes and wine were significantly higher ($P < 0,05$) in organic samples. Mean concentration of copper in organic leaves was $325 \pm 19 \mu\text{g/g}$ for Pinot noir cultivar and $713 \pm 61 \mu\text{g/g}$ for Sauvignon cultivar. In leaves from plants treated by IPM mean concentration of $170 \pm 5 \mu\text{g/g}$ (Pinot noir) and $104 \pm 5 \mu\text{g/g}$ (Sauvignon) was found. Mean copper concentration in berries was much lower. In comparison with leaves berries have smaller capture area proportional to the mass. Copper is also very important part of metalloproteins and enzymes responsible for some oxidative and reductive processes in plant cells and these compounds are mostly present in leaves (Barker *et al.*, 2007). The copper concentration in berries exhibited again statistically important difference depending on the farming system. Organic berries contained $7,81 \pm 0,38 \mu\text{g/g}$ Cu (Pinot noir) and $4,56 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$ Cu (Sauvignon) while IPM berries contained $4,45 \pm 0,33 \mu\text{g/g}$ Cu (Pinot noir) and $2,85 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$ Cu (Sauvignon). Different copper concentrations in berries finally caused different copper concentration in wine samples. Organic Sauvignon wine showed almost 3 times higher concentration of copper than in its counterpart from IPM production ($931 \pm 37 \mu\text{g/L}$ against $354 \pm 24 \mu\text{g/L}$). The copper residue in organic wine was very close to the 1 mg/L limit set by legislation. Higher concentration of copper may cause astringent taste of wine and can lead to the formation of cupric cloudiness, especially together with high content of tannic substances and high pH (Peyanaud *et al.*, 1996; Kment *et al.*, 2005).

Results from this study are consistent with those published by other authors. Vrček *et al.* found higher concentration of copper in Croatian organic wines, compared to the conventional production. However, copper residues were still under the limit of 1 mg/L (Vrček *et al.*, 2001). Martins *et al.* studied the impact of application of bordeaux mixture ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca(OH)}_2$) on copper levels in grape berries and grape juice (Martins *et al.*, 2014). Amounts and number of applications were based on regular vineyard management of commercial organic farms. Grapevines treated by bordeaux mixture showed 7-14 times higher concentration of copper than in control fruits and juice made from treated grapes showed 4 times higher concentration than in the control. The fact that organic viticulture practice may result in higher residues of copper in plant and also in wine is probably caused by the permission of higher application dose (compared to IPM) in organic farming. In organic farming system it is allowed to use 6 kg/ha of pure Cu compared to 2 kg/ha in IPM. This permission is build on the fact that copper salts are the only efficient fungicide approved in organic viticulture. IPM, on the other hand, can utilize wider spectrum of synthetic protective agents and it is not so reliable only on copper based substances.

It is important to note here that application dose of copper based fungicides is not the only one factor influencing the residual concentration of copper in grapevine. Garcia-Esparza *et al.* studied the effect of the

number of applications, total applied doses and the time between the last application of fungicide on vineyard. Garcia-Esparza found the weak correlation between copper residue level in grapes and wines and the total amount of copper applied and the time between the last application and harvest. The average concentration of copper in grapes was rising in dependence on the shrinking time interval between last application of fungicide and harvest (García-Esparza *et al.*, 2006). These results also supports the data from our study. Last application of copper fungicide Kocide 2000 on organic plots was 32 days before harvest against 41 days on IPM plots.

Another important factor influencing the residues of copper in leaves and grapes may be the rainfall. Unfortunately, there are no reliable data for *Vitis vinifera*, however Gaskin *et al.* studied the effect of rainfall on copper spray residues in kiwi leaves and fruits and they concluded that the concentration of copper in plant samples was highly dependent on rainfall level (Gaskin *et al.*, 2013). Higher rainfall resulted in lowering of copper concentration in leaves and fruits. The 50 mm of rain applied on leaves were able to decrease the total amount of copper in samples by 2/3. The residual concentration of copper in leaves reflected the total dose of protective agent however it was proved that dependence of copper residue level is not linear with addition of higher amounts of copper based fungicides. Gaskin *et al.* tried to apply extreme four times higher than the recommended amount of copper on plant and it was not resulted in adequate increase of copper concentration in foliage neither in fruit. The research of Gaskin *et al.* implies an idea, that most of the copper residues are adhered on the surface, not inside of the plant itself as copper has quite limited mobility in plants. It is proven, that soil copper levels are correlating very poorly with plant accumulation. Most of the copper extracted from the soil is fixed in the root tissues and it is not transported in high amounts through the plant to the leaves and berries (Barker *et al.*, 2007). From this reason, the copper presented in soil is not the most important source of copper in the final product but it is very important as a toxic, persistent contaminant of the whole ecosystem. The rainfall effect in the case of our study did not play an important role in residual concentration of copper, because there was no rain in the interval between the harvest of IPM and OV samples.

In addition to the copper residues differences, different strategies of pest management were reflected in the concentrations of zinc and manganese in our analyzed samples. Relatively higher concentration of those elements were observed in IPM samples and it is probably associated with application of Ridomil GOLD MZ 68 WP which is fungicide based on dithiocarbamate Mancozeb $[C_4H_6N_2S_4Mn]_x(Zn)_y$, containing zinc and manganese in organic complex form. In organic farming system, the usage of this group of pesticides is strictly prohibited. Contrast in zinc and manganese concentrations between the farming systems is not so expressive as in the case of copper, but still the trend of higher concentration in IPM samples is statistically important and it is

observable in plant samples and also in wine samples. Mean zinc concentrations in organic leaves were $12,9 \pm 0,7$ (Pinot noir) and $19 \pm 1,2$ $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon). In contrast to organic leaves IPM leaves contained $26,4 \pm 0,8$ $\mu\text{g/g}$ (Pinot noir) and $27,14 \pm 1,6$ $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon) of zinc. Organic berries contained mean zinc concentrations of $1,60 \pm 0,77$ $\mu\text{g/g}$ (Pinot noir) and $1,15 \pm 0,015$ $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon) while IPM berries contained $2,29 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$ (Pinot noir) and $1,77 \pm 0,17$ $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon) of zinc. In the final wine product mean zinc concentration was 508 ± 6 $\mu\text{g/L}$ in the case of organic Sauvignon compared to 567 ± 24 $\mu\text{g/L}$ in IPM Sauvignon. Usually, wines contains 200 to 500 $\mu\text{g/L}$ of zinc. High concentration of zinc may cause astringent taste and for that reason, limit concentration of zinc in wine is set to 5 mg/L (Michlovský, 2014).

Average manganese concentration in organic leaves was $58,6 \pm 2,7$ $\mu\text{g/g}$ (Pinot noir), $93,4 \pm 5,5$ $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon) while in IPM leaves 150 ± 8 $\mu\text{g/g}$ (Pinot noir) and 110 ± 4 $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon). Organic berries contained $1,73 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ (Pinot noir) and $2,86 \pm 0,066$ $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon) compared to $2,12 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ (Pinot noir) and $3,57 \pm$ $\mu\text{g/g}$ (Sauvignon) in IPM samples. Organic Sauvignon wines contained 311 ± 21 $\mu\text{g/L}$ of manganese, less than wines from IPM 380 ± 15 $\mu\text{g/L}$. The manganese content in the wine usually ranges from 300 to 400 $\mu\text{g/L}$. Beside the contamination from protective agents, concentration of manganese is strongly dependent on content of this metal in soil. For example, Beaujolais region soils are very rich on manganese and in the wine from this area concentration of manganese up to 4 mg/L can be found (Michlovský, 2014).

The observed differences in the content of zinc and manganese are in accordance with research conducted by La Pera *et al.* who studied the influence of mancozeb, zoxamide and copper oxychloride fungicides treatment on Mn, Zn, Cu, Cd and Pb residual concentration in Italian red wines and in grapes (La Pera *et al.*, 2008). Samples from plots treated with mancozeb showed notable higher concentration of zinc in wine and grapes compared to the untreated samples. Significance of the difference was influenced by the time of last mancozeb application. Later application resulted in higher amounts of zinc in wine. Manganese concentrations showed similar trend. Application of above mentioned pesticides also increased the concentration of Pb and Cd in grapes and wine. This was not confirmed in our research.

The content of other studied elements in leaves, berries and in wine showed in some cases slight differences between two tested farming systems, however after more detail analysis no meaningful links to the agritechnique practice were found probably due to the high level of variability of individual samples within the group. Concentration of elements in wine that are regulated by legislation did not exceeded allowed limits in all samples.

2. Total antioxidant activity

The results of comparison of antioxidant activity are presented in **Table 4**. Kinetic output of the experiment showed that more than 50% of DPPH radicals were terminated in first three minutes of the experiment. From the results presented in **Table 4** it can be seen that both tested wines have almost identical radical scavenging abilities. Radical termination ability of organic sauvignon was $1,10 \pm 0,05$ mmol/L of TEAC. Sauvignon from IPM showed antioxidant activity equal to $1,08 \pm 0,07$ mmol/L of TEAC. Total antioxidant activity is dependent on grapevine cultivar, but usually total antioxidant activity of white wine varies from 0,3 – 1,2 mmol/L of TEAC [19]. Based on this range it can be concluded that the tested wine samples have relatively high antioxidant activity.

Table 4 - Mean relative concentrations of DPPH in time $t = 25$ min after mixing of radical with samples in % and conversion to Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). TEAC values are in mmol/L of trolox.

	Organic <i>Sauvignon</i>	IPM Sauvignon
% RC	$14,34 \pm 0,65$	$16,3 \pm 1,1$
TEAC	$1,1 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,07$

Values are mean \pm SD of 5 measurements

However results of presented study did not showed any significant difference in antioxidant properties of wines from organic and IPM farming systems, several studies have shown that cultivation practice can have important effect on formation of compounds with antioxidant properties. Tinttunen and Lehtonen concluded that organic wine contains higher concentration of trans-resveratrol (in average 5,6 mg/L in organic against 2,9 mg/L in conventional wine) (Tinttunen *et al.*, 2001). Vrček *et al.* pointed out that organic farming has positive effect of on formation of gallic acid, syringic acid, chlorogenic acid, flavonols, flavanols and resveratrol in berries which correlates with higher antioxidation activity of organic wine (Vrček *et al.*, 2011). Higher production of those compounds is probably connected with the absence of synthetic pesticides in organic viticulture. Plant is therefore more dependent on metabolically synthesized phytoalexins. For example, resveratrol is natural phytoalexin with antifungicidal effects. The synthesis of polyphenols can be affected also by the availability of basic nutrients. It was found that higher availability of phosphorus in soils from organic farming is enhancing production of those substance or that the amount of nitrogen in soil influences the rate of flavonoids synthesis (Mitchel *et al.*, 2007).

The difference between our results and above mentioned research could be related by fact that previous research did not compare organic farming with integrated pest management in viticulture but compared organic

farming with conventional farming. Unlike the organic and conventional farming systems, the differences between organic and IPM systems are much smaller. In addition, the same crop rotation management was used on both types of vineyards included in this study and in 2013 no synthetic fertilizers were used on plots cultivated under integrated pest management.

CONCLUSION

This study was aimed on comparison of two sustainable systems emphasizing ecological way of farming using different crop growing and protection strategies. Results of this study showed that quantity and manner of pesticide application is very important factor affecting the final elemental composition of the grapevine and wine, especially content of copper, zinc and manganese. The influence of vine growing under different farming systems on the total antioxidant activity of wine was found to be insignificant in this study. Both farming systems examined in this study were able to produce grapes for winemaking which meets quality and safety standards according to Czech and European legislation. All standards have been met even in difficult conditions which affected the samples used in this study. The samples were collected in 2013 which was climatically extreme year, when doses of protection substances were on the limit to sustain profit-making yields. The information about safety is important for consumers, but also it gives essential feedback for farmers about the impact of their activity on the characteristics of the crop. It is not possible to make final decision which way of viticulture is better to follow only on the basis of the elemental composition and antioxidant activity of farming products. On the other hand such information can help the farmers in optimization process of farming systems in order to minimize environmental pollution, lower the overall inputs of protective agents and to increase the quality of production.

This study also confirmed some of the results of previous research about direct impact of vineyard protective agents on the residual level of metals in the plant. Lots of the residues of metals from pesticides are adhered to the surface of the berries and they are transferred into the must during the crushing and pressing. Final concentration of metals in wine is generally lower than in must, thanks to the precipitation and yeast consumption during the winemaking. However, higher concentration of metals in grape juice at the start of the fermentation process may negatively influence the yeast growth and performance which is affecting the final organoleptic properties of wine. The study of rainfall effects on metal residues levels, mentioned in this article, raised up the suggestion, that washing of grapes before crushing and pressing can lower the metal contamination of must. Usually, grape washing is not the standard procedure of the winemakers, mostly thanks to the fact, that

it can affect the natural population of wild yeast on grapes which helps to create terroir properties, but it can be useful if there is a risk of production spoilage because of the increased application of protective agents in the seasons with extreme pests pressure leading to exceeding the limit concentration of metals in final product.

BIBLIOGRAPHY

- Arvanitoyannis IS., 2006. Improving the safety of fresh meat. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **41**, 1111-1114.
- Arvanitoyannis IS., Ladas D. and Mavromatis A., 2006. Wine waste treatment methodology. *J. Food Sci. Technol.*, **41**, 475-487.
- Baker BP., Benbrook CM., III EG. and Benbrook KL., 2002. Pesticide residues in conventional, integrated pest management (IPM)-grown and organic foods: insights from three US data sets. *Food Addit. Contam.*, **19**, 427-446.
- Barker AV. and Pilbeam D., 2007. *Handbook of plant nutrition*. CRC/Taylor, Boca Raton.
- Birzele B., Meier A., Hindorf H., Kramer J. and Dehne WH., 2002. Epidemiology of fusarium infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland. *Eur. J. Plant Pathol.*, **108**, 667-673.
- Brandt K. and Mølgaard JP., 2001. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? *J. Sci. Food Agr.*, **81**, 924-931.
- Brandt K., Christensen LP., Hansen-Møller J., Hansen SL., Haraldsdottir J., Jespersen L., Purup S., Kharazmi A., Barkholt V., Frøkiaer H. and Kobaek-Larsen M., 2004. Health promoting compounds in vegetables and fruits. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 384-393.
- Chiva-Blanch G., Urpi-Sarda M., Rotchés-Ribalta M., Zamora-Ros R., Llorach R., Lamuela-Raventós RM., Estruch R. and Andrés-Lacueva C., 2011. Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 698-705.
- Co M., Koskela P., Eklund-Åkergren P., Srinivas K., King JW. and Sjöberg PJR., 2009. Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark. *Green Chem.*, **11**, 668-674.
- Coetze P., Steffens FE., Eiselen RJ., Augustyn OP., Balcaen L. and Vanhaecke F., 2005. Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5060-5066.
- Cortell JM., Halbleib M., Gallagher AV., Righetti TL. and Kennedy JA., 2007. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) anthocyanins. 1. Anthocyanin concentration and composition in fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6575-6584.
- Cowell S. and Clift R., 1995. *Life cycle assessment for food production systems*. International Fertiliser Society, Colchester.
- Djilas S., Canadanovic-Brunet J. and Cetkovic G., 2009. By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, **15**, 191-202.
- Fragoulis G., Trevisan M., Di Guardo A., Sorce A., van der Meer M., Wibel F. and Capri E., 2009. Development of a Management Tool to Indicate the Environmental Impact of Organic Viticulture. *J. Environ Qual.*, **38**, 826-35.
- Francis F., 2000. *Encyclopedia of food science and technology*, 2nd ed. Wiley, New York.

- García-Alonso M., Rimbach G., Sasai M., Nakahara M., Matsugo S., Uchida Y., Rivas-Gonzalo JC. and De Pascual-Teresa S., 2005. Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Mol. Nutr. Food Res.*, **49**, 1112-1119.
- García-Esparza MA., Capri E., Pirzadeh P. and Trevisan M., 2006. Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Addit. Contam.*, **3**, 274-280.
- Gaskin RE., Horgan DB., Steele KD. and van Leeuwen RM., 2013. The effect of rainfall on copper spray residues on kiwifruit foliage, fruit and canes. *New Zealand Plant Prot.*, **66**, 199-203.
- Iland P., Bruer N., Markides A. and Sitters J., 2004. *Monitoring the winemaking process From grapes to wine: techniques and concepts, 2nd ed. nd ed.* Australia: Patrick Iland wine promotions Pty. Ltd., Campbelltown.
- Jackson R., 2008. *Wine Science: principles and applications.* Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Ju Z. and Howard LR., 2005. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *J. Food Sci.*, **70**, 270-276.
- Kabata-Pendias A., 2011. *Trace elements in soils and plants, 4th ed.* CRC Press, Boca Raton.
- Kasimatis A. and Vilas E., 1985. Sampling for degree Brix in vineyard plots. *Am. J. Enol. Viticult.*, **36**, 207-213.
- Kilmartin PA., Zou H. and Waterhouse AL., 2001. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1957-1965.
- Kment P., Mihaljevič M., Ettler V., Šebek O., Strnad L. and Rohlová L., 2005. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chem.*, **91**, 157-165.
- Kristiansen P., Taji A. and Reganold JP., 2006. *Organic agriculture: a global perspective.* CSIRO Publishing, Collingwood.
- La Pera L., Dugo G., Rando R., Di Bella G., Maisano R. and Salvo F., 2008. Statistical study of the influence of fungicide treatments (mancozeb, zoxamide and copper oxychloride) on heavy metal concentrations in Sicilian red wine. *Food Addit.*, **25**, 302-313.
- Labrinea EP. and Georgiou CA., 2004. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. *Anal. Chim. Acta*, **526**, 63-68.
- Luque-Rodriguez J., Luque de Castro M. and Perez-Juan P., 2007. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. *Bios. Tech.*, **98**, 2705-2713.
- Martins V., Teixeira A., Bassil E., Blumwald E. and Gerós H., 2014. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiol. Bioch.*, **82**, 270-278.
- McGovern PE., Glusker DL., Exner LJ. and Voigt MM., 1996. Neolithic resinated wine. *Nature*, **381**, 480-481.
- Michlovský M., 2014. *Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře, Vydání I.* Vinselekt Michlovský, Rakvice.
- Mitchel AE., Hong YJ., Koh E., Barrett DM., Bryant DR., Denison RF. and Kaffka S., 2007. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *J. Agr. Food Chem.*, **55**, 6154-6159.
- Monaci F., Bargagli R. and Focardi S., 2003. Element concentrations in Chianti Classico appellation wines. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **17**, 45-50.

Moure A., Cruz JM., Franco D., Domínguez JM., Sineiro J., Domínguez H., Núñez J. and Parajó JC., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, **72**, 145-171.

Nardi EP., Evangelista FS., Tormen L., SaintPierre TD., Curtius AJ., de Souza SS. and Barbosa F. Jr., 2009. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chem.*, **112**, 727-732.

Offermann F. and Nieberg H., 2000. *Economic performance of organic farms in Europe*. Inst. für Landwirtschaftliche Betriebslehre, Stuttgart-Hohenheim.

Ohmart CP., 2011. *View from the vineyard: a practical guide to sustainable winegrape growing*. Wine Appreciation Guild, San Francisco.

Petrisor D., Damian G., Simon S., Schmutzer G., Hosu A. and Miclaus V., 2007. EPR investigation of antioxidant characteristics of some irradiated natural extracts. *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, **9**, 760-763.

Peynaud E. and Blouin J. 1996. *The taste of wine: the art and science of wine appreciation, 2nd ed.* Wiley, New York.

Rapisarda P., Calabretta ML., Romano G. and Intrigliolo F., 2005. Nitrogen metabolism components as a tool to discriminate between organic and conventional citrus fruits. *J. Agr. Food Chem.*, **53**, 2664-2669.

Revilla E., Ryan J-M. and Martín-Ortega G., 1998. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4592-4597.

Salvo F., La Pera L., Di Bella G., Nicotina M. and Dugo G., 2003. Influence of different mineral and organic pesticide treatments on Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) contents determined by derivative potentiometric stripping analysis in Italian white and red Wines. *J. Agr. Food Chem.*, **51**, 1090-1094.

Staško A., Brezová V., Mazúr M., Čertík M, Kaliňák M. and Gescheidt G., 2008. A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. *LWT - Food Sci. Tech.*, **41**, 2126-2135.

Stroh A., Bruckner P. and Vollkopf U., 1994. Multielement analysis of wine samples using ICP-MS. *Atom. Spectrosc.*, **15**, 100-106.

Thomas T. and Gunde C., 2014 Organic agriculture, sustainability and consumer preferences. *Organic agriculture towards sustainability*. Doi: 10.5772/58428.

Tintunen S. and Lehtonen P., 2001. Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 390-394.

Unno T., Yayabe F., Hayakawa T. and Tsuge H., 2002. Electron spin resonance spectroscopic evaluation of scavenging activity of tea catechins on superoxide radicals generated by a phenazine methosulfate and NADH system. *Food Chem.*, **76**, 259-265.

Valcic S., Burr JA., Timmermann BN. and Liebler DC., 2000. Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 801-810.

Vrček IV., Bojić M., Žuntar I., Mendaš G. and Medić-Šarić M., 2011. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chem.*, **124**, 354-361.

Weigle T., Carroll J., 2014. *Production guide for organic grapes*, 2014. New York State IPM program, New York. http://nysipm.cornell.edu/organic_guide/grapes.pdf. Accessed 16 March 2015.

Weil JA. and Bolton JR., 2007. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*, 2nd ed. John Wiley, Hoboken.

Willer H. and Lernoud J., 2014. *The world of organic agriculture*. Research Institute of Organic Agriculture, Bonn.

Worth T., 2012. *European integrated farming framework, 2012*. EISA. http://sustainable-agriculture.org/wp-content/uploads/2012/08/EISA_Framework_english_new_wheel_170212.pdf