

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici



**Studie obsahu antioxidačních komponent u
dealkoholizovaných vín**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

doc. Ing. Jiří Sochor, Ph.D.

Autor práce:

Bc. Miroslav Hrnčírík

Lednice 2015



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Miroslav Hrnčírík**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Název tématu: **Studie obsahu antioxidačních komponent u dealkoholizovaných vín**
Rozsah práce: minimální rozsah 50 stran

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu zabývající se problematikou dealkoholizovaných vín.
2. Rešeršním způsobem zpracujte přehled nejdůležitějších antioxidačních látek ve vínech obsažených.
3. Pomocí vysoce-účinné kapalinové chromatografie analyzujte významné antioxidanty u dealkoholizovaných vín.
4. Spektrometricky stanovte antioxidační aktivitu a obsah celkových polyfenolických sloučenin.
5. Získané výsledky vyhodnoťte a porovnejte s obsahem u běžných vín.

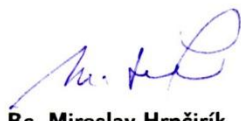
Seznam odborné literatury:

1. KORANY, K. – TAKACS, L. – VATAI, G. Production of alcohol free wine by pervaporation. [online]. 2007. URL: <http://://WOS:000240856700016>.
2. SCHMIDTKE, L. – AGBOOLA, S. – BLACKMAN, J. Production Technologies for Reduced Alcoholic Wines. [online]. 2012. URL: <http://://WOS:000299257000037>.
3. GIL, M. – KONTOUDAKIS, N. – ESTEVEZ, S. Influence of partial dealcoholization by reverse osmosis on red wine composition and sensory characteristics. [online]. 2013. URL: <http://://WOS:000324322500002>.
4. ALBANESE, D. – RUSSO, P. – LIGUORI, L. Evolution of quality parameters during red wine dealcoholization by osmotic distillation. [online]. 2013. URL: <http://://WOS:000318193500010>.

Datum zadání diplomové práce: prosinec 2013

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2015

L. S.



Bc. Miroslav Hrnčířik
Autor práce



Ing. Jiří Sochor, Ph.D.
Vedoucí práce



Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „**Studie obsahu antioxidačních komponent u dealkoholizovaných vín**“ vypracoval samostatně a použil jen materiály, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu literatury.

Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Lednici, dne.....

Podpis diplomanta.....

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval doc. Ing. Jiřímu Sochorovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za poskytnuté rady, materiály, připomínky a vstřícnost, které byly přínosem k vypracování mé diplomové práce.

Děkuji i mé nejbližší rodině, především mé manželce Radce za podporu a trpělivost při psaní diplomové práce a celou dobu studia.

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíl práce.....	10
3	Literární přehled	11
3.1	Metody využívané při dealkoholizaci vína	12
3.1.1	Membránové transportní procesy.....	12
3.1.2	Reverzní osmóza	13
3.1.3	Osmotická destilace (OD)	13
3.1.4	Pervaporace	14
3.1.5	Rotační kuželový sloupec (SCC)	15
3.2	Antioxidační komponenty obsažené ve víně.....	16
3.3	Přehled nejdůležitějších antioxidačních látek obsažených ve víně	18
3.3.1	Fenolové kyseliny.....	18
3.3.2	Deriváty kyseliny benzoové	18
3.3.3	Stilbeny.....	21
3.3.4	Třísloviny (taniny).....	22
3.3.5	Flavony a flavonoly	24
3.3.6	Antokyaniny	25
3.4	Základní metody pro stanovení antioxidantů	28
3.4.1	Analýza pomocí HPLC	28
3.4.2	Metoda FCM	29
3.4.3	Metody stanovení antioxidační aktivity	30
4	Materiál a metodika	32
4.1	Vzorky dealkoholizovaných a klasických vín.....	32
4.2	Spektrofotometrické stanovení.....	32

<i>Stanovení celkových polyfenolických sloučenin</i>	33
<i>Stanovení obsahu celkových hydroxyskořicových kyselin</i>	33
5.1 Stanovení antioxidační aktivity.....	35
5.2 Stanovení celkových polyfenolických sloučenin	36
5.4 Stanovení obsahu celkových hydroxyskořicových kyselin	38
5.5 Stanovení obsahu vybraných antioxidačních sloučenin pomocí HPLC ...	39
5 Závěr.....	43
6 Souhrn.....	44
7 Seznam použitých zkratk	46
8 Seznam použité literatury	47

Seznam obrázků

Obrázek 1. Nealkoholické víno TERRASSO	11
Obrázek 2. Schéma reverzní osmózy a Filtrační zařízení metodou reverzní osmózy	13
Obrázek 3. Schéma pervaporačního zařízení.....	14
Obrázek 4. Dealkoholizační zařízení od australské firmy FLAVOURTECH,	15
Obrázek 5. Miloš MICHLOVSKÝ a jeho dealkoholizační zařízení od australské firmy FLAVOURTECH	16
Obrázek 6. Deriváty kyseliny benzoové	19
Obrázek 7. Deriváty kyseliny skořicové.....	20
Obrázek 8. Stilbeny.....	21
Obrázek 9. Strukturální vzorec (+) katechinu a (-) epikatechinu	23
Obrázek 10. Flavonoly.....	24
Obrázek 11. Antokyanidiny	26
Obrázek 12. Schéma HPLC	28
Obrázek 13. Chromatogram - výsledek analýzy HPLC.....	29
Obrázek 14. Schéma spektrofotometru.....	30
Obrázek 15. Měřicí přístroje používané při experimentu	32
Obrázek 16. Měřicí přístroje pro metodu HPCL	34
Obrázek 17. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín.	35
Obrázek 18. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín.	36
Obrázek 19. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín.	37
Obrázek 20. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín.	38

1 Úvod

V posledním desetiletí se na českém trhu objevuje stále více druhů dealkoholizovaných vín. Obsah alkoholu v dealkoholizovaných, nealkoholických či nízkoalkoholických vínech může být nejvýše 0,5% obj. Díky situacím, kdy je pití alkoholu nevhodné, oblíbenost dealkoholizovaných vín postupně narůstá. Tento druh vín je vyhledáván hlavně lidmi, kteří jsou abstinenti, řidiči motorových vozidel, těhotnými a kojícími ženami, sportovci, lidmi kteří nepijí alkohol z náboženských důvodů a lidmi se zdravotními potížemi nebo z jiných důvodů.

Zmínka o prvním návodu na výrobu nealkoholického vína pochází z roku 1891 od lékaře A. W. CHASE. Patent na dealkoholizované víno metodou vakuové extrakce získal v roce 1908 Carl JUNG. U nás bylo první dealkoholizované víno s obsahem nižším než 0,5% obj. vyrobeno firmou Bohemia Sekt, a od roku 2013 vyrábí dealkoholizované víno firma VINSELEKT MICHLOVSKÝ, a.s. v Rakvicích na Břeclavsku.

Dealkoholizované vína jsou vyráběna z kvalitního hroznového vína několika různými metodami, jako reverzní osmóza, zmrazování vína, nanofiltrace, vakuová extrakce, z nichž se v současné době nejvíce využívá vakuová extrakce, která nejlépe uchovává chuťové a aromatické vlastnosti srovnatelné s alkoholickými víny.

Přesto, se různí názory na kvalitu dealkoholizovaných vín, všeobecně převládá názor, že po snížení obsahu alkoholu víno přichází o vůni, chuť, tělo a hebkost. Výrazné rozdíly se dají pozorovat u červených vín, kdežto u bílých dealkoholizovaných vín a vín alkoholických jsou rozdíly méně patrné. I zde je zastáván názor, že čím je šetrnější technologie odalkoholizování, tím kvalitnější je nealkoholické víno a jeho sensorické vlastnosti jsou k nerozeznání od původního vína.

Víno obsahuje množství látek, které mají významný vliv na lidské zdraví. Mezi důležité látky, které se nachází ve víně, a mají pozitivní vliv na zdraví, jsou látky na bázi fenolů. Fenoly, které jsou obsaženy ve víně, mají většinou antioxidační účinky. Antioxidanty jsou v posledních letech předmětem častých výzkumů a vědeckých prací, je dokázáno, že výrazně omezují nežádoucí činnost volných radikálů uvnitř buňky. Mezi nejvíce aktivní antioxidanty ve víně patří resveratrol, quercetin a katechiny. Zdokonalováním technologických postupů při procesu dealkoholizace vín se minimalizuje možnost vzniku výrazných změn a ztrát antioxidačních látek obsažených ve víně.

2 Cíl práce

Cílem práce byla studie obsahu antioxidačních komponent u dealkoholizovaných vín.

- Pomocí vysoce-účinné kapalinové chromatografie analyzovat významné antioxidanty u dealkoholizovaných vín
- Spektrometricky stanovit antioxidační aktivitu a obsah celkových polyfenolických sloučenin.
- Získané výsledky vyhodnotit a porovnat s obsahem u běžných vín.

3 Literární přehled

Dealkoholizovaná vína

Víno patří mezi jeden z nejoblíbenějších alkoholických nápojů ve světě. Je vědecky dokázáno, že podporuje snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, obsahuje totiž velké množství látek, které jsou velmi důležité z hlediska významu pro lidské zdraví. Do popředí zájmu se tak dostávají nealkoholické a nízkoalkoholické kvašené nápoje, mezi které patří i víno. Tyto produkty mají nižší kalorický obsah, nabízejí tradiční organoleptické vlastnosti bez vedlejších účinků alkoholu. Zdokonalováním technologií výroby dealkoholizovaných vín, by se mělo dosáhnout zdravotně nezávadného a vysoce kvalitního dealkoholizovaného vína, které bude srovnatelné svými organoleptickými vlastnostmi s vlastnostmi původního alkoholického vína.

První dealkoholizované víno vyrobeno u nás

TERRASSO, nealkoholické rosé vyrobeno z odrůd Ariana a Zweigeltrebe. Své růžové nealkoholické víno představil Miloš MICHLOVSKÝ jako „harmonické, lehké a svěží, decentně perlivé, přičemž přetlak CO₂ nepřesahuje 1,8 kPa“.



TERRASSO, bylo vyrobeno na technologickém zařízení od australské společnosti Flavourtech. Toto zařízení je v Evropě ojedinělé a v České Republice jediné. Tato technologie pracuje na principu vakuového odpařování za teploty kolem 30 °C, tento způsob dealkoholizace je k vínu velmi šetrný. Aroma vína je v počáteční fázi dealkoholizace odebíráno, aby bylo v konečné fázi vráceno nezměněno a v původním stavu. V prvním kole dealkoholizačního procesu, kdy je z vína odebírána část aromatická, dochází k částečné dealkoholizaci. A to z důvodu, že většina těkavých aromatických látek jsou z chemického hlediska alkoholem. Proto nelze do vína vrátit veškerou aromatickou složku, která byla v první fázi vínu odebrána, aby nedošlo k porušení definice „nealkoholické“, to je nepřesáhnout 0,5 % alkoholu.

Obrázek 1. Nealkoholické víno TERRASSO (MICHLOVSKÝ, 2015)

V procesu dealkoholizace vzniká jako sekundární produkt alkohol o lihovitosti kolem 51 až 52 %, který je po mnoha měsících ležení a zrání velmi jemný, jako vínovice. Výsledný produkt, nealkoholické víno není tiché, ale je z důvodu zachování svěžího projevu a zamezení oxidace jemně syceno přetlakem přirozeného CO₂ (STÁVEK, 2013).

3.1 Metody využívané při dealkoholizaci vína

Při výrobě dealkoholizovaných vín se využívá několik metod snížení nebo odstranění alkoholu z vína. V tabulce 1 jsou uvedeny některé z využívaných metod. Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody, z hlediska procesních nákladů na technologii, nebo požadavku na kvalitu výrobku.

Tabulka 1. Přehled technologií redukce etanolu při výrobě vína (SCHMIDTKE, *et al.* 2012; PICKERING, 2000)

Fáze výroby vína	Princip	Technologie
Předfermentační	Redukce zkvasitelných cukrů	Ředění moštu
		Glukozová oxidáza enzymem
V průběhu fermentace	Snížení produkce alkoholu	Specielní druhy kvasinek
		Zastavení fermentace
Postfermentační	Membránové separační metody	Reverzní osmóza
		Pervaporace
		Osmotická destilace
	Bezmembránové separační metody	SCC metoda
		Výměna iontů
	Extrakce rozpouštědlem	

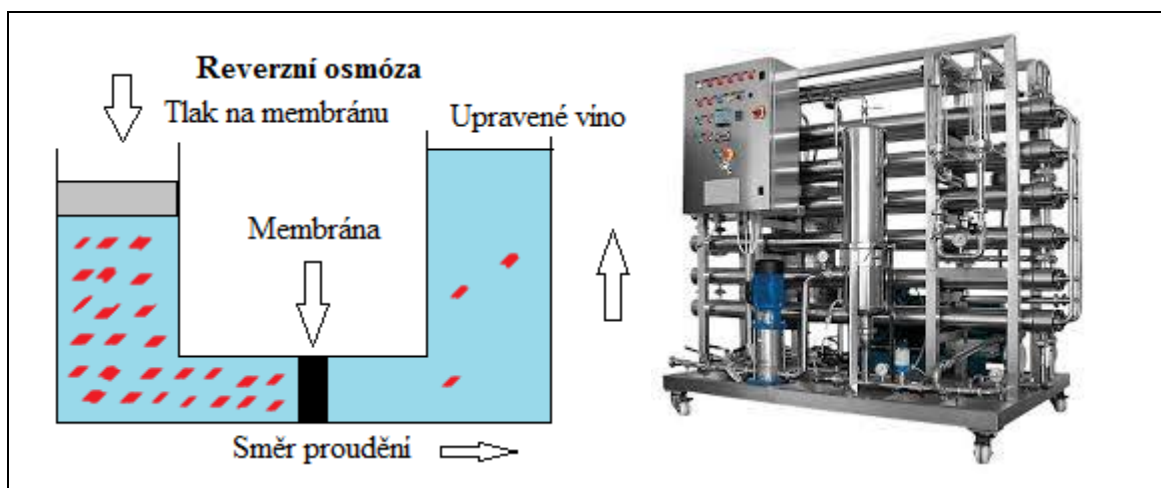
3.1.1 Membránové transportní procesy

Odstranění etanolu z vína po dokončení fermentace může být dosaženo buď prostřednictvím použití tepelného destilačního procesu s vakuem i bez vakua. Nebo přechodem etanolu přes semipermeabilní bariéry nebo membrány. Různé technologie, ve kterých je membrána používána pro selektivní odstranění etanolu z nápojů, byly vyvinuty, na principu molekulární permeace etanolu ze stávající suroviny s vysokou koncentrací, po stripovací fázi na surovinu s nízkou koncentrací. Nejrozšířenější technologie na bázi membrán pro odstranění organických složek z nápojů je reverzní

osmóza a nové technologie, jako je například osmotická destilace a pervaporace (SCHMIDTKE, *et al.* 2012).

3.1.2 Reverzní osmóza

Reverzní osmóza je v současnosti nejčastěji používanou metodou pro snížení nebo odstranění etanolu z vína (PICKERING, 2000). Při této metodě je víno čerpáno čerpadlem při tlaku 4 MPa přes semipermeabilní membránu. Působením tlaku na membránu se může zvyšovat teplota na povrchu membrány, obvykle jsou proto součástí zařízení tepelné výměníky s pracovní teplotou kolem 20 až 22 °C (SMITH, 1996). Před membránou vzniká vysoká koncentrace roztoku a je zde vytvářen tlak který je vyšší než tlak osmotický (SCHMIDTKE, *et al.* 2012). Přes membránu díky reverzní osmóze přechází látky s relativně nízkou molekulární hmotností, jako je etanol a voda (PICKERING, 2000). Reverzní osmózu je možné využívat ke snížení obsahu alkoholu ve víně z hodnot 12 % až 15 %, na méně než 0,5 % (SCHMIDTKE, *et al.* 2012).



Obrázek 2. Schéma reverzní osmózy a Filtrační zařízení metodou reverzní osmózy (DELLA TOFFOLA, 2015)

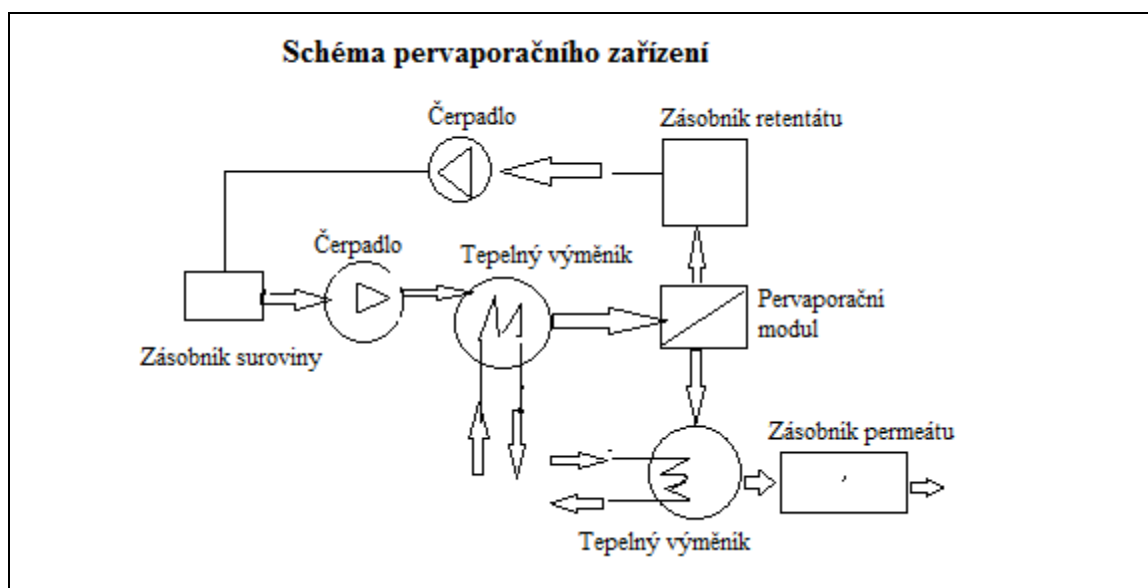
3.1.3 Osmotická destilace (OD)

Mezi membránové technologie, patří i metoda osmotické destilace (OD), je to moderní a perspektivní technologie pro snížení obsahu etanolu ve víně. Osmotická destilace je separační membránový proces, ve kterém se přepravují těkavé složky z vodného roztoku do jiného kapalného roztoku, (stripovacího činidla) který je schopen absorbovat tyto komponenty. Hnací silou procesu je rozdíl tlaků par těkavých složek přecházejících přes membránu, která je obvykle mikroporézní a hydrofobní. Přenos

hmoty zahrnuje odpařování etanolu z přiváděného proudu na povrchu membrány, difúzi přes póry membrány, a kondenzaci do stripovacího činidla na opačné straně membrány. Vzhledem k provozním podmínkám (pokojové teplotě a atmosférickém tlaku), osmotická destilace zabraňuje poškození aromatických těkavých látek vlivem vyšších teplot (VARAVUTH, *et al.* 2009).

3.1.4 Pervaporace

Pervaporace patří mezi další separační membránový proces, kde se dělí směsi kapalných složek jejich částečným vypařováním přes neporézní polymerní membránu. Pervaporace se dělí na pervaporaci vakuovou a na pervaporaci do nosného plynu (IZÁK, *et al.* 1999).

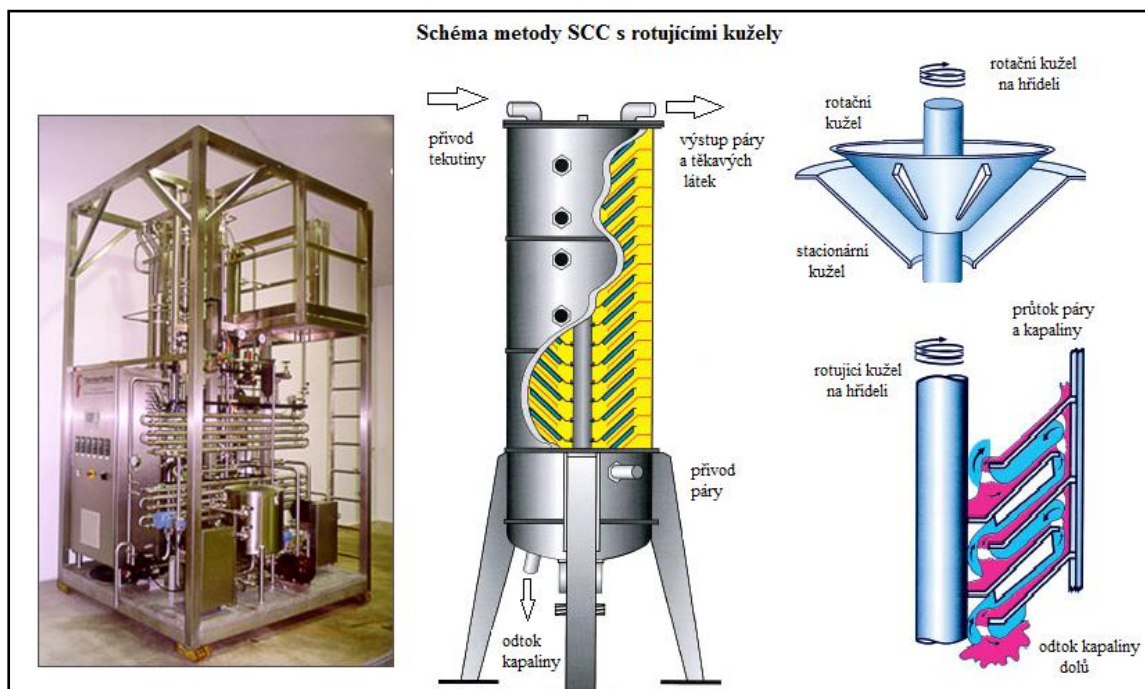


Obrázek 3. Schéma pervaporačního zařízení (HASAL, *et al.* 2007)

V pervaporačním zařízení je kapalná směs částečně zahřáta na vyšší teplotu, je přivedena na přední, retentátovou stranu membrány, zde se látky směsi rozpouštějí a difundují přes membránu kde se na retentátové straně odpařují (HASAL, *et al.* 2007). Na permeátové straně je výsledný produkt, pervaporát odstraňován v parní fázi odsáváním, a to při využití vakuové pervaporace a nebo proudem nosného plynu při pervaporaci do nosného plynu (IZÁK, *et al.* 1999). Výkon pervaporace je ovlivněn několika faktory, prostupným tlakem, koncentrací kapalně směsi, materiálem membrány, a teplotou (KARLSSON, *et al.* 1995; SAHA, *et al.* 2013). Teploty při kterých se mohou pervaporace provozovat jsou stále předmětem výskumu, jedním z důvodů je zachování a zlepšení aromatických látek v dealkoholizovaných vínech.

3.1.5 Rotační kuželový sloupec (SCC)

Rotační kuželový sloupec (SCC) je zařízení sloužící k extrakci těkavých aromatických složek z kapaliny nebo suspenze. Proces extrakce probíhá při teplotě 26 až 35° C. Sloupec se skládá, z vertikální hřídele, s 22 obrácenými kužely (směřující dolů), pracuje přibližně při 350 ot·min⁻¹. Mezi každou dvojicí kuželů, jsou pevné obrácené kužely, které jsou připojeny ke skříni kolony (Obrázek 4). Kapalina se přivádí do horní části sloupce na rotující kužely, kde je odšťikována působením odstředivé síly na vnitřní povrch pouzdra. Potom klesá v podobě tenkého filmu dolů, směrem ke středu kužele. Tento proces se opakuje několikrát, až tekutina steče na dno kolony. Film, který se tvoří z kapaliny na povrchu rotujících kuželů je poměrně tenký a zdržení objemu kapaliny je velmi nízké, doba mezi vstupem a výstupem je asi 20 sekund. SCC zvládne celou řadu materiálů s nízkou viskozitou mezi produkty, patří například i víno (SCHMIDTKE, *et al.* 2012). SCC má ve vinařství řadu uplatnění, které se využívají při odebrání jemných aromatických látek, odstraňování oxidu siřičitého z hroznové šťávy, snížení alkoholu vína a výrobě hroznových šťáv a koncentrátů (SCHMIDTKE, *et al.* 2012).



Obrázek 4. Dealkoholizační zařízení od australské firmy FLAVOURTECH, schéma metody SCC s rotujícími kužely (FLAVOURTECH, 2015).



Obrázek 5. Miloš MICHLOVSKÝ a jeho dealkoholizační zařízení od australské firmy FLAVOURTECH (foto: Anna VAVRÍKOVÁ, MAFRA)

3.2 Antioxidační komponenty obsažené ve víně

Antioxidanty jsou přírodní složky potravin, které chrání buňky před škodlivými vlivy (JORDÁN a HEMZALOVÁ 2001). Hlavním úkolem antioxidantů je neutralizace účinku volných kyslíkových radikálů, vznikajících v procesu oxidace a odpovědných za degradaci buněk (DWECK, *et al.* 2015). V krvi fungují polyfenoly jako antioxidanty, ty vážou molekulární kyslík a redukují tak oxidační stres (KRAUS, *et al.* 1997).

Polyfenolické sloučeniny

Polyfenolické sloučeniny jsou důležité chemické látky patřící do skupiny sekundárních metabolitů, které jsou produkovány rostlinami. Sekundární metabolity rostlin slouží k ochraně rostlin před stresem, patogeny, predátory, UV zářením atd. Fenolických látek s velkou rozmanitostí struktur a funkcí bylo v rostlinách identifikováno až několik tisíc. Velké množství těchto látek je zastoupeno v potravinách, hlavně v ovoci a zelenině (TRNA a TÁBORSKÁ 2002). Polyfenolické látky jsou v posledních letech v centru zájmu vědeckých výzkumů zejména z důvodu svého antioxidačního potenciálu a schopnosti snižovat rizika onemocnění (FANCINI a SEBASTIANI, 2013).

Mezi nejvíce studovanou ovocnou plodinu z hlediska obsahu polyfenolických a antioxidačních látek patří réva vinná (*Vitis vinifera* L). Hrozny révy vinné obsahují polyfenoly, včetně flavonoidů, stilbenů a proantokianidinů, tvoří tak nejvýznamnější skupinu biologicky aktivních látek v hroznech. Flavanoidy patří k nejvíce biologicky aktivním fytonutrientům mezi polyfenoly, které jsou obsaženými v hroznech, tyto látky vykazují kardioprotektivní, neuroprotektivní, antimikrobiální vlastnosti. (ALZAND, 2012; HEIM, 2002; HAN, *et al.* 2007; XIA, 2010; in GEORGIEV, 2014).

Z organoleptického hlediska jsou fenolické sloučeniny, vzhledem k neuvěřitelné strukturní různorodosti velmi významné (KENNEDY, 2006), ovlivňují mnoho důležitých charakteristik vína, (PAVLOUŠEK, 2011) především jakost, jeho tělo a strukturu (BUSCEMA a BOULTON 2014; MICHLOVSKÝ, 2014), a taktéž odpovídají za antioxidační vlastnosti (PAVLOUŠEK, 2011).

Vliv na lidské zdraví

Už v devadesátých letech minulého století byl na základě epidemiologických studií zjištěn, dnes velmi popularizovaný francouzský paradox. Tato studie zjistila poměrně nízký výskyt ischemické choroby srdeční u obyvatel Francie i přes to že tradiční francouzská strava obsahuje vysoké hladiny nasycených tuků (GUILFORD a PEZZUTO, 2011). Toto zjištění je přisuzováno pravidelné mírné konzumaci červeného vína tamních obyvatel. Polyfenolové sloučeniny obsažené ve víně pozitivně působí při prevenci kardiovaskulárních nemocí, zlepšení krevního oběhu, zpomalení mozkového stárnutí a prevenci Alzheimerovy nemoci (MICHLOVSKÝ, 2014b). Fenolické látky, třísloviny a barviva patří k důležitým složkám vína a působí profilakticky a bakteriostaticky hlavně v červených vínech, mimo jiné, hojí jizvy na sliznici střevního traktu. Vznik a šíření zhoubného bujení spomalují vyzrálá červená vína (KRAUS, *et al.* 1997).

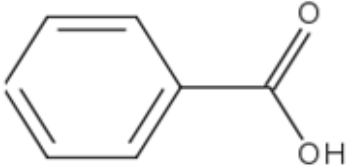
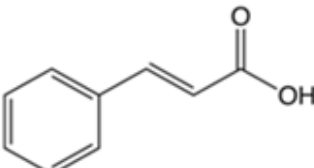
3.3 Přehled nejdůležitějších antioxidačních látek obsažených ve víně

3.3.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny se dělí: na hydroxylové deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové (MICHLOVSKÝ, 2014 b).

Kyseliny benzoová a skořicová se nachází především v dužnině bobulí révy vinné a ve víně, nejčastěji jsou zde vázány v esterech kyseliny vinné, ale vážou se též na třísloviny, zřídka i na cukry (MICHLOVSKÝ, 2014 b).

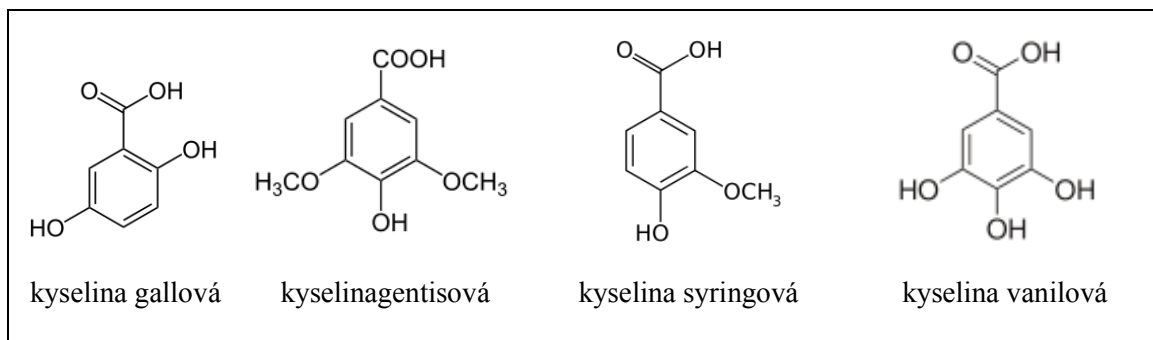
Tabulka 2. Fenolové kyseliny a jejich rozdělení (MICHLOVSKÝ, 2014; TAILLANDIE a BONNET, 2005)

Fenolové kyseliny	
Deriváty kyseliny benzoové	Deriváty kyseliny skořicové
	
kyselina gallová	kyselina p-kumarová
kyselina gentisová	kyselina kávová
kyselina prokatechová	kyselina ferulová
kyselina salicylová	kyselina sinapová
kyselina syringová	kyselina kaftarová
kyselina vanilová	

3.3.2 Deriváty kyseliny benzoové

Kyselina benzoová je nejjednodušší aromatickou kyselinou, rozšířena je hlavně v rostlinných materiálech jako 1-O-benzoyl-β-D-glukopyranosa. V silicích se nachází ve formě esterů, a ve volné formě neovlivňuje vůni. Její přítomnost v ovoci a zelenině je obecně velmi nízká, pohybuje se okolo 0,05 %. Často se do potravin přidává jako konzervační činidlo (VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009).

Deriváty kyseliny benzoové vznikají různými mechanismy. Šikimátovou cestou ze šikimové kyseliny jejich prekurzorů nebo metabolitů vznikají, kyselina gallová, salicylová, protokatechuová, vanilová, syringová, gentisová (VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009). Tyto kyseliny se vyskytují v hroznech a ve víně ve formě esterů (FARKAŠ, 1980).



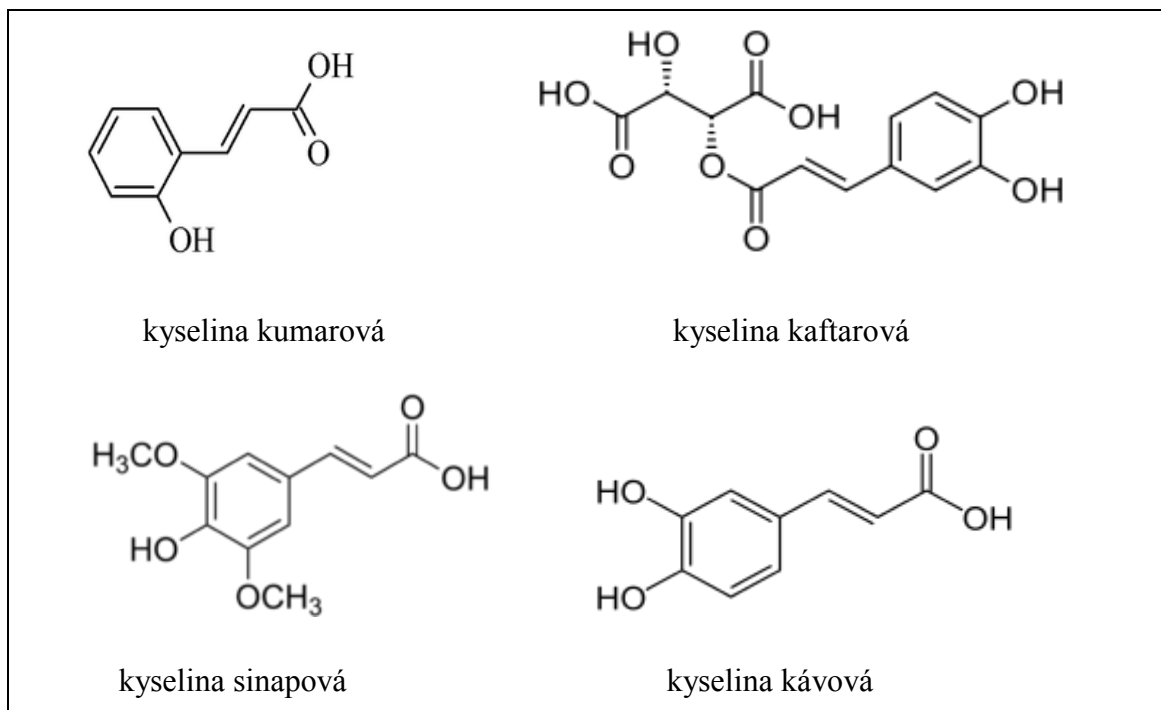
Obrázek 6. Deriváty kyseliny benzoové (FARKAŠ, 1980; MICHLOVSKÝ, 2014b)

Kyselina gallová je obsažena převážně v semenech bobulí révy vinné v množství asi 2 až 13 mg · kg⁻¹ čerstvé váhy, tvoří zde estery s katechinem (MICHLOVSKÝ, 2014a). Patří mezi jedinou hydroxybenzoovou kyselinu, která je přímo obsažena v hroznech, v pevných částech bobule (PAVLOUŠEK, 2011). V potravinách je obsažena v ostružinách, hořké čokoládě, mangu, malinách, hřebíčku a dalších. Kyselina gallová působí v bobulích též jako antioxidant (MICHLOVSKÝ, 2014a). Bylo prokázáno, že extrahována z hroznových semen inhibuje tvorbu amyloidních fibril, jednu z možných příčin Alzheimerovy choroby (LIU, *et al.* 2013).

Kyselina gentisová - je derivát kyseliny benzoové. Využívá se jako antioxidační pomocná látka, z důvodu její snadné oxidace u některých farmaceutických přípravků (STRUPAT, *et al.* 1991). V bobulích révy vinné se vyskytuje kyselina gentisová jen ve stopovém množství (MICHLOVSKÝ, 2014a). Ve významnějším množství se nachází v kakaových bobech (VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009).

Kyselina syringová - je chemická sloučenina trihydrobenzoové kyseliny. Vyskytuje se v hroznech a víně ve stopovém množství, zde je většinou vázána v esterech kyseliny vinné. V některých případech ji můžeme najít vázanou na taniny nebo dokonce na cukry (MICHLOVSKÝ, 2014b).

Kyselina vanilová - je derivát kyseliny dihydrobenzoové. Nachází se v malém množství ve všech potravinách rostlinného původu (VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009).



Obrázek 7. Deriváty kyseliny skořicové (FARKAŠ, 1980; MICHLOVSKÝ, 2014b)

Kyselina skořicová patří mezi nenasycené aromatické kyseliny. Převládá ve skořici i některých druzích koření. Od kyseliny skořicové jsou oxidací odvozeny p-kumarová a kávová kyselina. Kyselina ferulová a kyselina sinapová jsou jejich methoxyderiváty (VELÍŠEK, a HAJŠLOVÁ, 2009).

Kyselina p-kumarová - je organická sloučenina, hydroxy derivát kyseliny skořicové. Nachází se v řadě potravin, jako jsou rajčata, mrkev, arašidy, česnek. Byla též zjištěna v zrnech ječmene (ŽORY, *et al.* 2006). V hroznech a víně se vyskytuje jako volná kyselina (FARKAŠ, 1980). Z hlediska medicínského má kyselina p-kumarová antioxidační vlastnosti, předpokládá se, že může snižovat rizika rakoviny žaludku (FERGUSON, *et al.* 2005).

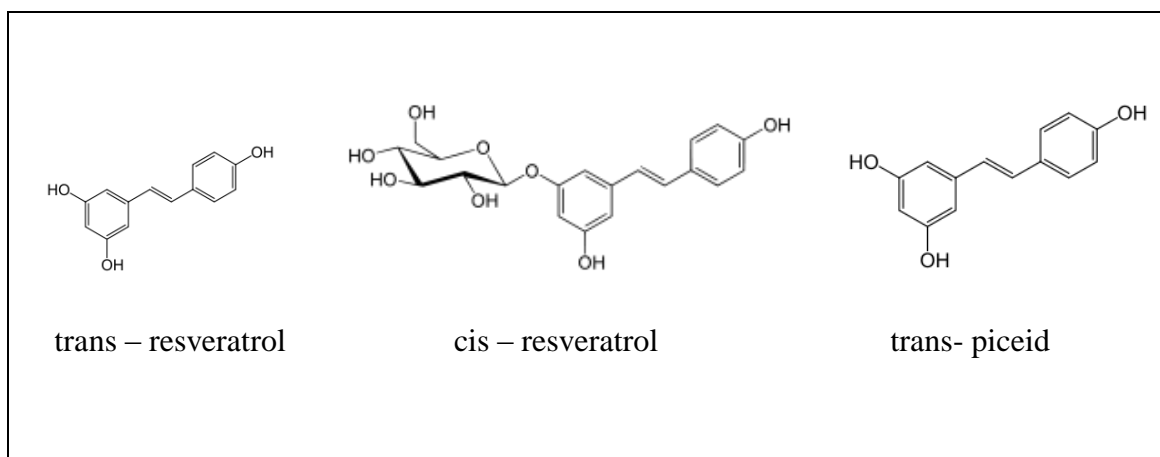
Kyselina kaftarová - je neflavoidní fenolová sloučenina. Nachází se v bobulích hroznů, a v moštích bílých odrůd tvoří až polovinu fenolických látek. Vzhledem k vyššímu obsahu se účastní ve větší míře většiny oxidačně redukčních procesů, probíhajících u bílých a rosé vín (KUMŠTA, 2007). Produkty okysličené kyseliny kaftarové jsou odpovědné za žluto-zlaté zbarvení bílých vín (Michlovský, 2014a; LEE, *et al.* 1987).

Kyselina sinapová se vyskytuje ve víně v malém až zanedbatelném množství a na senzorycké vlastnosti vína nemá žádný vliv. Do vína přechází ze dřeva sudů ve kterých bylo školeno (KUMŠTA, 2007).

Kyselina kávová - je hlavní sloučeninou hydroxiskořicových kyselin ve víně, z hlediska oxidačně redukčních vlastnosti (KUMŠTA, 2007). Ve víně byla identifikována v malém množství jako volná, jinak je ale ester kyseliny vinné a glykosid (MICHLOVSKÝ, 2014b). Z hlediska medicíny je kyselina kávová antioxidant a vykazuje imuno modulační a protizánětlivou aktivitu. Svoji antioxidační aktivitou snižuje oxidační stres vyvolaný houbou *Aspergillus flavus* produkující alfatoxiny (CAMPBELL a KIM, 2006).

3.3.3 Stilbeny

Stilbeny patří do skupiny polyfenolů, jsou to látky vyskytující se v různých rostlinách ale i dubovém dřevě (MICHLOVSKÝ, 2014a). Hrozny révy vinné, bílá i červená vína jsou považovány za významný zdroj těchto látek. Z medicínského pohledu mají tyto látky, **resveratroly a piceidy**, velmi pozitivní vliv na lidské zdraví. Vyskytují se hlavně ve slupkách bobulí hroznů (PAVLOUŠEK, 2005). Tyto látky vytváří rostlina v různých orgánech na ochranu proti napadení některými mikroorganismy, jsou to hlavně houby, které způsobují různé houbové choroby (MICHLOVSKÝ, 2014b), UV záření, mechanické poškození, stres ze sucha, (PAVLOUŠEK, 2005). Působením patogenních organismů a abiotických činitelů se tak zvyšuje i produkce ochranných látek (PAVLOUŠEK, 2005), potom se stilbeny začnou chovat jako fytoalexiny (MICHLOVSKÝ, 2014a).



Obrázek 8. Stilbeny (MICHLOVSKÝ, 2014a)

Resveratrol

Trans-resveratrol je jeden z nejvíce studovaných stilbenů, má antimikrobní a antioxidační účinky. V mnoha případech kdy byly zkoumány biologické vlastnosti resveratrolu bylo prokázáno, že jako polyfenol je biologicky aktivní, je výrazný antioxidant a pohlcovač volných radikálů. Obecně je resveratrol jednou z hlavních složek rostlinných extraktů, používaných v medicíně k možné léčbě srdečních a nádorových onemocnění (ŠMIDRKAL, *et al.* 2001). Resveratrol se nachází v řadě rostlin z nichž poměrně velké množství se vyskytuje v hroznech révy vinné (Šmidrkal, *et al.* 2001). Z různých studií je zřejmé, že resveratrol produkují rostliny jako ochrannou reakci na působení patogena. Jestliže je réva ve stresu, (MICHLOVSKÝ, 2014a) je produkce resveratrolu vyšší lze ho zařadit mezi fytoalexiny (ŠMIDRKAL, *et al.* 2001). U révy vinné se koncentruje ve slupce bobule hroznů, ale můžeme jej zaznamenat i v semenech. V červených vínech se koncentrace resveratrolu pohybuje od 1 až 12 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u bílých vín je jeho koncentrace poměrně nízká do 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (MICHLOVSKÝ, 2014a).

Piceid

Trans-piceid je glukosid a je vytvořen z trans-resveratrolu, nachází se v hroznovém moštu (ROMERO-PEREZ, *et al.* 1999). Tato sloučenina se vyskytuje i ve víně (MICHLOVSKÝ, 2014b).

3.3.4 Třísloviny (taniny)

Třísloviny jsou pro víno důležité svým složením a obsahem, u červených vín jsou důležité pro jejich strukturu, harmonii a celkový dojem (KUMŠTA, 2008; PAVLOUŠEK, 2011). Třísloviny se podílí na číření a stabilizaci vín a to z důvodu srážlivosti s bíkovinami (FARKAŠ, 1980).

Třísloviny ve víně se rozdělují na dvě skupiny:

- hydrolizovatelné (galické, ellagické)
- kondenzované (katechické), (KUMŠTA, 2008a)

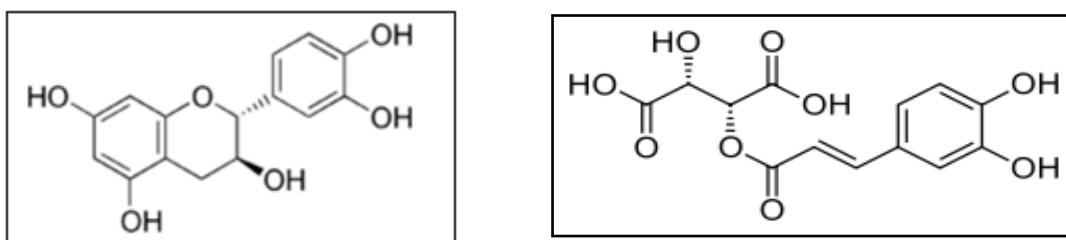
Hydrolizovatelné taniny se v révě vinné nevyskytují, do vína přecházejí z dubových sudů nebo jsou přidávány do vína ve formě enologických taninů

(ACKERMANN, *et al.* 2007; MICHLOVSKÝ, 2014). Mají důležitý antioxidační význam při zrání vín v nových dubových sudech (KUMŠTA, 2008a).

Kondenzované taniny jsou obsaženy v hroznech révy vinné, hlavně v semenech, slupkách bobulí a třapině. Největší množství tříslovin se nachází v semenech. Koncentrace tříslovin v hroznech je závislá na stupni vyzrállosti hroznů, a druhu odrůdy (MICHLOVSKÝ, 2014b). Z medicinského pohledu jsou taniny silnou antioxidační látkou, působí při prevenci kardiovaskulárních nemocí, zlepšení krevního oběhu (rozšiřují cévy) a snižují hladinu chlesterolu v krvi. Dobrý vliv mají i na zpomalení průběhu Alzheimerovy nemoci a zpomalení mozgového stárnutí (MICHLOVSKÝ, 2014b).

Třísloviny v červených vínech mají důležitou antioxidační a ochrannou vlastnost. Oxidací tříslovin se uvolňuje vodík který se transformuje na chinony a melaniny, které potom chrání víno a jeho složky před případnou pozdější oxidací (MICHLOVSKÝ, 2014b).

Rékové taniny vyskytující se v hroznech jsou složeny ze dvou základních strukturních jednotek (+) katechinů a (-) epikatechinů (MICHLOVSKÝ, 2014b; KUMŠTA, 2008).

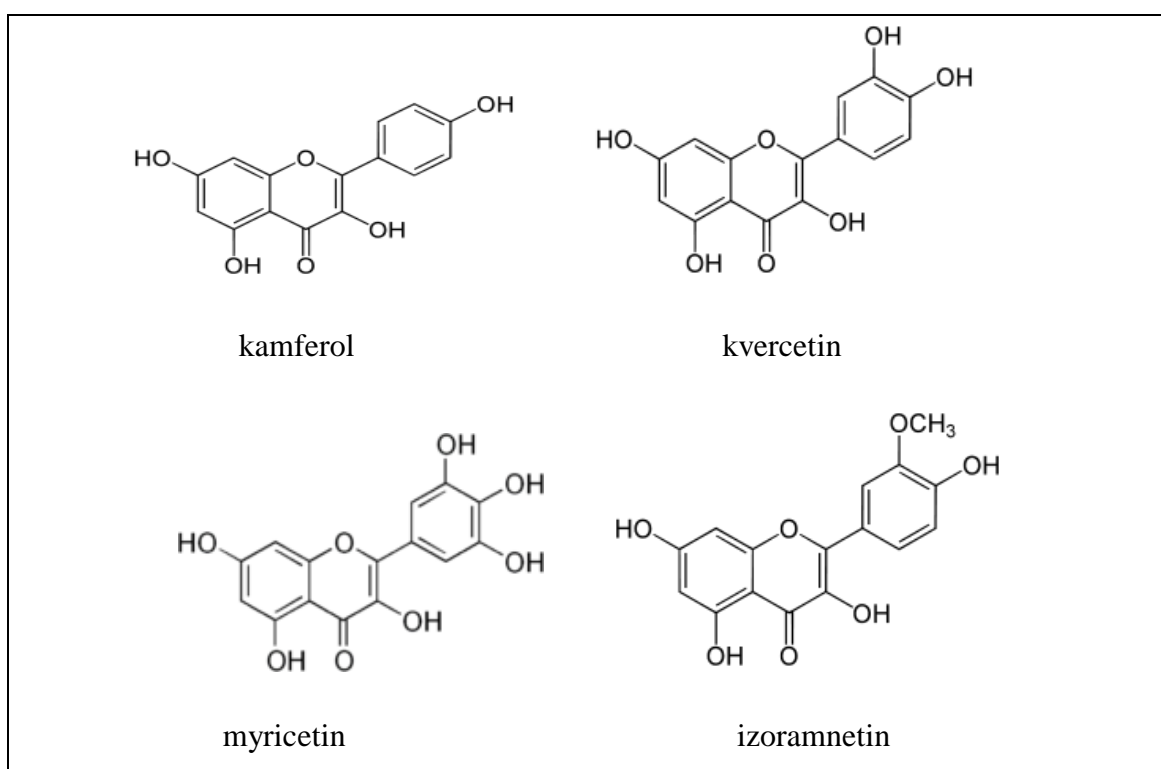


Obrázek 9. Strukturální vzorec (+) katechinu a (-) epikatechinu (MICHLOVSKÝ, 2014b)

Katechin je flavan-3-ol, patří mezi hlavní přírodní druh fenolu a je antioxidant. Je jedním z nejsilnějších antioxidantů ze skupiny flavonoidů, díky jeho schopnostem eliminovat singletový kyslík, který je velmi reaktivní (ZHENG, *et al.* 2008). Katechiny a epikatechiny jsou obsaženy v řadě potravin, mezi potraviny s nejvyšším obsahem katechinů patří kakao (KWIK-URIBE, *et al.* 2008). Jako prekurzory kondenzovaných tříslovin se katechiny nacházejí v hroznech a mladých červených vínech (MICHLOVSKÝ, 2014b).

3.3.5 Flavony a flavonoly

Flavony a flavonoly jsou přírodní látky, které většinou patří do skupiny rostlinných barviv (LAHO, *et al.* 1970). Flavonoidy jsou žluté barviva s různým barevným spektrem (MICHLOVSKÝ, 2014a) jsou přítomné ve slupkách modrých i bílých hroznů (MICHLOVSKÝ, 2014b). Flavonoidy jsou obsaženy ve víně vždy v podobě glykosidů. Glykosidy obsahují volné flavonolové aglikony (FARKAŠ, 1980), mezi nejvýznamnější zástupce patří kamferol, quercetin, myricetin (MICHLOVSKÝ, 2014a).



Obrázek 10. Flavonoly (FARKAŠ, 1980; MICHLOVSKÝ, 2014b)

Kamferol je přírodní flavonol který se přirozeně vyskytuje v různých rostlinách a potravinách rostlinného původu. Mezi potraviny, ve kterých se nachází kamferol patří rajčata, jablka, zelený čaj, brokolice a další (CALDERON-MONTAÑO, *et al.* 2011). Z biologického hlediska je kamferol známý pro své silné antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Na základě studií je kamferol považován za potenciální látku napomáhající při léčbě rakoviny a kardiovaskulárních nemocí. Vykazuje cytotoxické účinky u mnoha typů karcinogenních buněk (LAU, 2008).

Kvercetin patří mezi flavonoidy a v přírodě je velmi rozšířený. Byl nalezen v různých druzích ovoce, zeleniny a v obilninách. Vyskytuje se hlavně v borůvkách, bobulích rakytníku řešetlákového, jablkách, brokolici a jiných. Jeho deriváty získávají v posledních letech zvláštní pozornost, v souvislosti s využitím jako potravinové složky. V epidemiologických studiích je možné, že kvercetin jako silný antioxidant hraje určitou roli v prevenci kardiovaskulárních nemocí, působí pozitivně na snížení hladiny cholesterolu v krvi (CHANG, *et al.* 2000). Kvercetin se ve víně vyskytuje ve formě aglikolu, ve velmi malém množství. V červených vínech se pohybuje jeho koncentrace přibližně $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ale v bílých, je koncentrace velmi malá 1 až $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ z důvodu neprobíhající macerace (MICHLOVSKÝ, 2014a).

Myricetin je další z přirozených bioflavonoidů vyskytující se v přírodě, je velmi rozšířen mezi různými druhy rostlin (ONG, a KHOO, 1997). Obvykle se nachází v ovoci, zelenině, bobulových plodech a ořechoch. Myricetin se nachází ve víně a v bobulích hroznů modrých odrůd, v bílých odrůdách nebyl nalezen, (MICHLOVSKÝ, 2014a). Antioxidační vlastnosti myricetinu spočívají v ochraně buněk před oxidačním stresem který vzniká v důsledku přítomnosti a činnosti reaktivních forem kyslíku (ROS) (ROOS, a KASUM, 2002). Myricetin má schopnost reagovat s volnými radikály a vázat rizikové kovy do neúčinných komplexů, zvyšuje též účinky jiných antioxidantů. (ROOS, a KASUM, 2002).

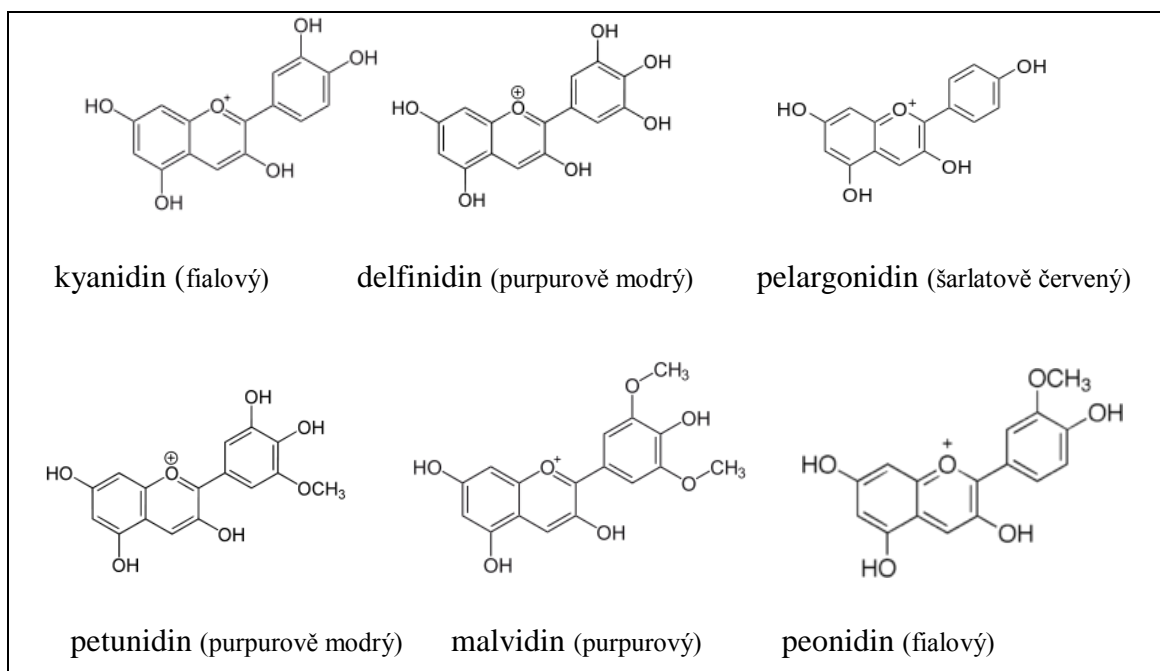
3.3.6 Antokyaniny

Antokyaniny (antokyanová barviva) jsou vakuolární pigmenty (ANDERSON, *et al.* 2001). Jsou nejrozšířenější skupinou přírodních barviv. Tato skupina je početně velmi rozsáhlá, dosud bylo identifikováno na 300 různých antokyanů. Antokyaniny v hroznech révy vinné (*Vitis vinifera* L) byly lokalizovány hlavně v buňkách slupky bobulí modrých odrůd (KUMŠTA, 2008b), vyskytují se v spektru od červené, fialové až po modrou barvu. Obsah antokyanů v hroznech révy vinné je velmi proměnlivý, je závislý od druhu, odrůdy, stádia vývoje a dalších podmínek (VELÍŠEK, a HAJŠLOVÁ, 2009). Nalezneme je i v různých částech vyšších rostlin, hlavně v kořenech, listech, plodech a květech (ANDERSON, *et al.* 2001).

Tabulka 3. Antokyany, rozdělení (MICHLOVSKÝ, 2014b; TAILLANDIER, a BONNET, 2005)

Antokyanidy	
	Pelargonidin
	Kyanidin
	Delfinidin
	Malvidin
	Petunidin

V hroznech révy vinné jsou antokyaniny odpovědné za zbarvení červených vín. Mladá červená vína obsahují ve volném stavu kolem $100 \text{ až } 1500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ mg antokyanů (MICHLOVSKÝ, 2014b; KUMŠTA, 2008b). Běžně se antokyaniny nachází především ve slupkách bobulí modrých hroznů, u odrůd které jsou označovány jako barvíčky se nachází i v dužnině bobule (KUMŠTA, 2008b). Modré odrůdy révy vinné obsahují pět druhů antokyanidinů tvořících základní barviva. V hroznech jsou volné antokyanidiny poměrně nestabilní, jejich chemická stabilita se výrazně zvyšuje navázáním na glukózu (RIBEREAU-GAYON, *et al.* 2006; KUMŠTA, 2008b).



Obrázek 11. Antokyanidiny (MICHLOVSKÝ, 2014b; TAILLANDIER, a BONNET, 2005)

Kyanidin je přírodní organická sloučenina, nacházející se jako pigment v bobulovém ovoci a zelenině které jsou červeně zbarvené. Jsou to třešně, borůvky, ostružiny, bezinky, brusinky, černý rybíz, hrozny modrých odrůd ale i červeně zbarvená zelenina. Červená cibule, zelí, řepa a jiné (BELITZ, *et al.* 2009). Kyanidin nacházející se hlavně ve slupkách ovoce a zeleniny, vykazuje antioxidační účinky které snižují rizika kardiovaskulárních a karcinogenních chorob. Další z teorií naznačuje, že příjem kyanidinů může inhibovat vývoj obezity a diabetu (SASAKI, *et al.* 2007).

Delfinidin je primární rostlinné barvivo patřící do skupiny antokyanů. V bobulích modrých odrůd révy vinné se antokyaniny vytváří po dobu zrání, na jejich množství v bobulích má vliv ročník a způsob jakým byly hrozny pěstovány. Ze zdravotního hlediska patří delfinidin k silným antioxidantům, je jedním z antokyanů inhibujících UV záření, a snižující tak poškození DNA (AFAQ, *et al.* 2006).

Pelargonidin patří mezi šestici antokyaninových sloučenin. Nejvíce je známý jako přírodní zdroj červeného pigmentu, který byl hojně zjištěn u jahod (EDIRISINGHE, *et al.* 2011). V červených vínech vyrobených s hroznů *Vitis vinifera* je jeho poměr značně ovlivněn odrůdou a podmínkami pěstování (MICHLOVSKÝ, 2014a), přítomností minerálních solí a pH (FARKAŠ, 1980). Podobně jako ostatní antokyaniny, vykazuje pelargonidin a jeho odvozené sloučeniny v červených vínech potenciální antioxidační aktivitu s příznivým působením na lidské zdraví (DE PASCUAL, *et al.* 2008).

Petunidin je přírodní organická sloučenina, tmavě červené až fialové barvivo, patřící do skupiny antokyaninů. Vyskytuje se v hroznech různých druhů révy, *Vitis vinifera*, *Vitis riparia*, *Vitis ruperstris* a *Vitis amurensis*. Pro tyto druhy je charakteristický vyšší obsah antokyanů. U daných druhů révy je jeho tvorba daná geneticky (KUMŠTA, 2008b). Asi 10% z celkového množství antokyanů, které se vytvoří v bobuli, v čase dozrávání tvoří petunidin (MICHLOVSKÝ, 2014a). Petunidin patří mezi antokyaniny s antioxidačními vlastnostmi.

Malvidin díky intenzitě své barvy patří mezi hlavní antokyaniny vyskytující se v hroznech a ve víně, je zodpovědný hlavně za barvu mladých červených vín (MICHLOVSKÝ, 2014a; PAVLOUŠEK, 2011). V červených vínech je malvidin a jeho působení na naše zdraví rozsáhle studovanou složkou. Příznivé účinky malvidinu jsou

tak alespoň částečně potvrzeny. Bylo zjištěno že mírná spotřeba červeného vína působí preventivně na chronické nemoci, jako je obezita, diabetes, hyperenze a kardiovaskulární onemocnění (BOGNAR, *et al.* 2013).

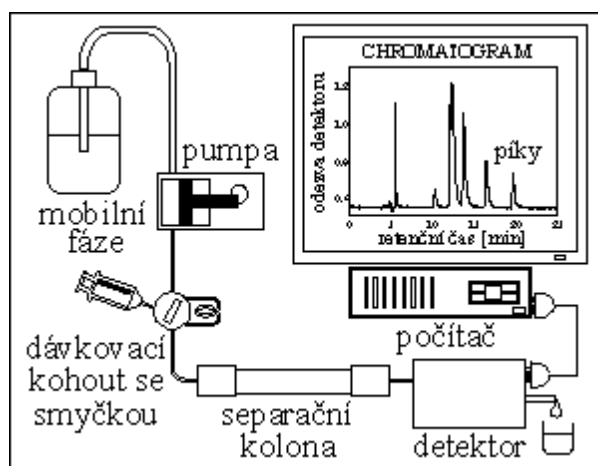
Peonidin je primární rostlinný pigment v purpurově červených odstínech. Největším potravinovým zdrojem peonidinu je čerstvé ovoce, brusinky, borůvky, třešně. Nachází se i v červených vínech z hroznů révy vinné (KWON, *et al.* 2007). Peonidin vzniká v bobulích těsně před dozráváním, to že jsou pigmenty přítomny, signalizuje, že rostliny jsou před optimální cukernatostí bobulí (MICHLOVSKÝ, 2014a). Ze zdravotního hlediska má peonidin stejně jako jiné antokyanidiny silné inhibiční a apoptotické účinky na nádorové buňky a to zejména při karcinogenním onemocnění rakovinou prsu (KWON, *et al.* 2007).

3.4 Základní metody pro stanovení antioxidantů

Metody pro analýzu polyfenolových látek se mohou rozdělit do dvou skupin: analytické metody pro stanovení skupin polyfenolů a metody pro stanovení jednotlivých polyfenolů (DVOŘÁKOVÁ, *et al.* 2006).

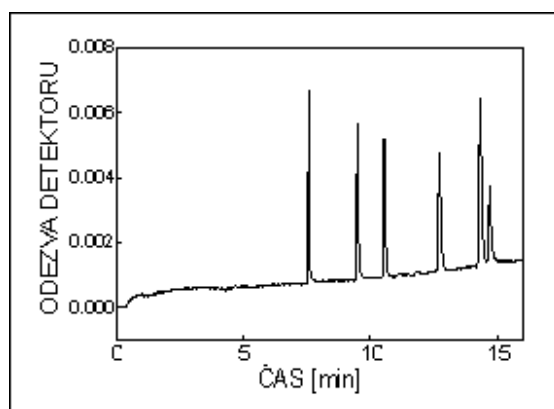
3.4.1 Analýza pomocí HPLC

Pro stanovení jednotlivých polyfenolových látek je využívána hlavně analytická metoda HPCL (High Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Je to analyticko-separační metoda, která slouží k separaci a stanovení přítomnosti i koncentraci složek ve směsi (DVOŘÁKOVÁ, *et al.* 2006).



Obrázek 12. Schéma HPLC (MATĚJÍČKOVÁ, 2015)

Metoda HPLC - přístrojem proudí mobilní fáze (voda, metanol, acetonitril) je vedena ze zásobních nádob přes vysokotlakou pumpu, která je velmi důležitou součástí. Mobilní fáze proudí přes kolonu pod tlakem až 40 Mpa. Přes dávkovací kohout, pomocí dávkovací smyčky je vzorek dávkován do proudu mobilní fáze. Pokračuje přes separační kolonu, ve které se nachází stacionární fáze, je tvořena mikročásticemi silikagelu (DVOŘÁKOVÁ, *et al.* 2006), na kterých je navázána samotná stacionární fáze. Následuje detektor, zde jsou jednotlivé látky detekovány, často používaným je spektrofotometrický UV – VIS (ultrafialově - viditelná spektroskopie) a fluorescenční detektor. Z detektoru do PC je vysílán signál, který je ihned zaznamenáván. Výsledek HPLC analýzy je vytisknut v podobě chromatogramu. Obrázek 13. (COUFAL, 2004).



Obrázek 13. Chromatogram - výsledek analýzy HPLC. (MATĚJÍČKOVÁ, 2015)

3.4.2 Metoda FCM

Průtoková cytometrie (FCM) je metoda pro stanovení celkových polyfenolických sloučenin. Patří mezi metody luminiscenční analýzy, v této fluorescenčně optické metodě je vzorek nesen v proudu nosné kapaliny (NOVÁK, *et al.* 2008). Je založena na redukci směsi fosfomolybdenanu a fosfowolframanu fenolickými sloučeninami za vzniku produktů modrého zbarvení. Naměřené hodnoty bývají vyjádřeny jako ekvivalenty kyseliny gallové GAE. Vysoká frekvence analýzy jednotlivých buněk je hlavní předností této metody, moderní analyzátoři analyzují za vteřinu až desetitisíce mikroskopických objektů (ŠINKOROVÁ, a ZÁRYBNICKÁ, 2008).

3.4.3 Metody stanovení antioxidační aktivity

Z důvodu velkého počtu metod stanovení antioxidační aktivity (AOA) mohou být principy stanovení rozděleny do dvou skupin:

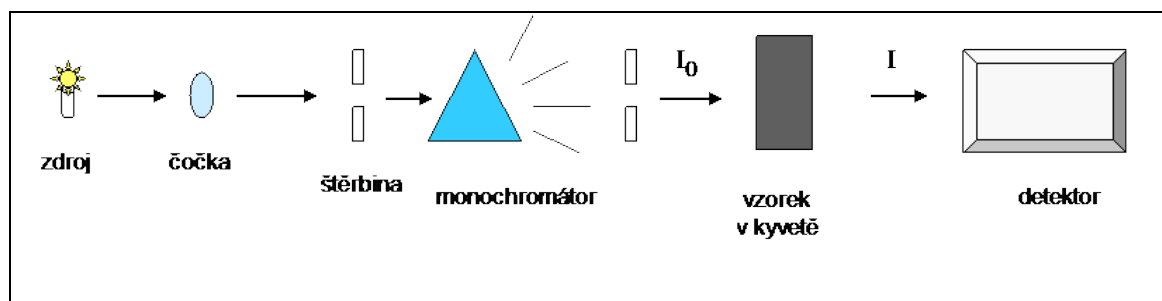
- metoda hodnotící schopnost eliminovat radikály (ABTS, DPPH, ORAC)
- metoda posuzující redoxní vlastnosti látek (FRAP, volumetrie, HPLC-ECD (PAULOVÁ, *et al.* 2004).

3.4.3.1 Metoda ABTS (TEAC)

Je metoda hodnotící schopnost eliminovat volné radikály. Patří k základním a nejpoužívanějším metodám stanovení celkové antioxidační aktivity TAA (PAULOVÁ, *et al.* 2004). Při samotném experimentu se mohou využívat dva postupy měření. U prvního způsobu měření se antioxidant dávkuje do reakční směsi, která obsahuje už vytvořen kation-radikál $ABTS^{++}$. Ve druhém způsobu měření je antioxidant obsažen v reakční směsi při generování radikálu $ABTS^{++}$ (PAULOVÁ, *et al.* 2004).

3.4.3.2 Metoda DPPH

Spektrofotometrická metoda používající DPPH, je jedním z nejvíce využívaných testů pro stanovení antioxidační aktivity látek. Princip metody spočívá ve schopnosti stabilního volného radikálu difenylpicrylhydrazylem – DPPH, reagovat s donory vodíku. DPPH silně absorbuje v UV-VIS spektru (SOCHOR, *et al.* 2011). Průběh reakce je většinou sledován spektrofotometricky (PAULOVÁ, *et al.* 2004).



Obrázek 14. Schéma spektrofotometru (KVASNICOVÁ a BALÍNOVÁ, 2015).

3.4.3.3 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je využívána ke stanovení antioxidační aktivity. V principu je metoda založena na redukci železitých komplexů TPTZ (2,4,6- tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým (FeCl_3). Tyto látky jsou vesměs bezbarvé, popřípadě mírně nahnědlé, ale po reakci vytváří modrý až do fialova zabarvený železnatý komplex. Měření se provádí při vlnové délce 593 nm. Výsledek je vyjádřen pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství iontů Fe^{2+} (DOBEŠ, *et al.* 2012).

4 Materiál a metodika

4.1 Vzorky dealkoholizovaných a klasických vín

Náplní experimentální studie byla analýza nealkoholických vín, a klasických vín z odrůd *Vitis vinifera* L.

Pro experimenty s dealkoholizovaným vínem byly vybrány dva vzorky bílého, dva růžového a dva červeného vína, vždy o hodnotách alkoholu 0,1 % a 5 % alkoholu. Dealkoholizované bílé víno z odrůdy Müller-Thurgau, růžové a červené z odrůdy Zweigeltrebe. „Klasické“ vína o obsahu 12 % alkoholu byla totožně z odrůd Müller-Thurgau (bílé) a Zweigeltrebe (růžové a červené).

4.2 Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometricky byly stanoveny antioxidační aktivity (pomocí metody DPPH) celkový obsah polyfenolických sloučenin, flavanolů a hydroxiskořicových kyselin.



Obrázek 15. Měřicí přístroje používané při experimentu (SPECTROPHOTOMETERS, CHEMICAL ANALYSIS EQUIPMENT, 2015)

Stanovení antioxidační aktivity

Do kyvety o objemu 3ml bylo pipetou nadávkováno 2000 μl radikálového roztoku DPPH (2,2-difenil- β -pikrylhydrazylový radikál), bylo naváženo $m = 9,35$ mg radikálu DPPH. Odměřené množství bylo dáno do odměrné baňky o obsahu 250 ml a doplněno metanolem. Potom bylo přidáno 40 μl vzorku, v našem případě vzorek vína a ten byl ponechán při teplotě 22 °C po dobu 25 minut. Po uplynutí dané doby byla změřena absorbance při 505 nm. Výpočet antioxidační aktivity byl proveden z kalibrační křivky, jako standardu byla použita kyselina gallová (10-200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) Výsledky jsou vyjádřeny v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ antioxidačních ekvivalentů kyseliny gallové.

Stanovení celkových polyfenolických sloučenin

Vzorek vína o objemu (50 ml) byl napipetován do kyvety a naředěn 1,5 ml ACS vody. Následně bylo přidáno 0,05 ml Folin-Ciocalteova činidla (Sigma Aldrich, CZ). Po 30 minutách při teplotě 22°C byla změřena absorbance na dvouprávkovém spektrofotometru SPEKOL 2000 při vlnové délce $\lambda = 640$ nm a $\lambda = 670$ nm proti slepému pokusu (kyselina gallová). Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallove v $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

Stanovení celkových flavanolů

Příprava reagenty - vzorek o objemu 40 μl jsme napipetovali do kyvety o obsahu 3 ml a poté zředili 1960 μl činidla [(0,1 % DMCA = p-dymethylaminocinnamaldehyd) a 300 ml MHCl v MeOH (metanolu)]. Daná směs byla protřepána a při laboratorní teplotě (asi 22 °C) inkubována 12 minut. Po uplynutí doby 12 minut byla změřena absorbance na měřicím přístroji, dvouprávkovém spektrofotometru značky SPECORD 210, Carl-Zeis Jena, Německo, při $\lambda = 640$ nm proti prázdné kyvetě. Výsledky jsou vyjádřeny jako ekvivalent katechinu.

Stanovení obsahu celkových hydroxyskořicových kyselin

Měření bylo provedeno SO_2 metodou. V 2 ml mikrozkušavce bylo protřepáno 200 μl vzorku s 1,8 ml a 1,1 M HCl. Slepý pokus ke každému vzorku byl připraven stejným způsobem, kdy roztok HCl byl nahrazen čerstvým 0,22 M roztokem $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (SO_2). Po 180 minutách byly v kyvetě změřeny absorbance vzorků s HCl při 280 nm. Výsledky byly vypočítány pro hodnoty v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Výpočet celkových hydroxyskořicových kyselin: $OD_{280} = 10 \cdot \text{ředění} \cdot A(\text{HCl})_{280}$

Stanovení antioxidantů pomocí HPLC

Množství jednotlivých antioxidačních sloučenin ve vzorcích vína byly stanoveny metodou HPLC měřícím přístrojem Shimadzu LC-10A (Obrázek 16). Shimadzu LC-10A obsahuje tyto zabudované pomocné technologie: 2 pumpy LC-10ADvp, kolonový termostat, nástřikový ventil Rheodyne CTO-10Cvp, DAD detektor SPD-M10Avp, řídicí systém pro Shimadzu LC-10A je SCL-10Avp.

Software pro vyhodnocení analýz: LC solution, Kolona AlltechAlltima C 18 3 μ m, 3 x 150 mm, předkolona stejný typ 3 x 7,5 mm.



Obrázek 16. Měřicí přístroje pro metodu HPCL (KNC-DAISHIN, 2015).

5. Výsledky a diskuze

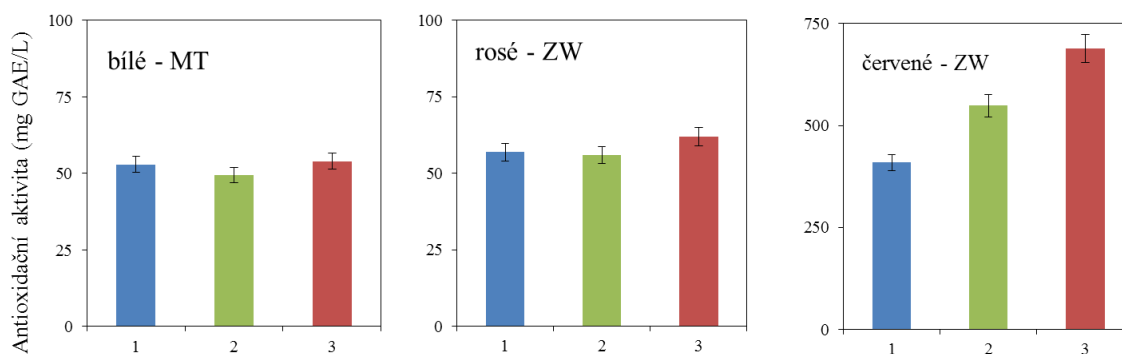
Pro experimenty s dealkoholizovaným vínem byly vybrány dva vzorky bílého, dva růžového a dva červeného vína, vždy o hodnotách alkoholu 0.1 % a 5 % alkoholu. Dealkoholizované bílé víno z odrůdy Müller-Thurgau, růžové a červené vína z odrůdy Zweigeltrebe. „Klasické“ vína o obsahu 12 % alkoholu byla totožně z odrůd Müller-Thurgau (bílé) a Zweigeltrebe (růžové a červené).

Byly studovány základní skupiny látek, konkrétně celkové polyfenolické sloučeniny, flavanoly, hydroxyskořicové sloučeniny a antioxidační aktivita, která představuje určující sílu všech antioxidantů v daném vzorku. A v neposlední řadě byly, pomocí metody HPLC mapovány významné antioxidanty.

5.1 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity lze použít více druhů metod, jejich rozmanitost vyplývá z toho, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. V mnohých případech jde o přímou reakci s radikály. Například zhášení, vychytávání nebo reakce s přechodovými kovy. Z tohoto důvodu, jsou metody, které hodnotí míru antioxidačního působení založeny na různých principech (PAULOVÁ, *et al.* 2004).

Metoda používající DPPH patří mezi základní metodiky pro posouzení antiradikálové aktivity čistých i směsných látek. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH (difenylpikrylhydrazylem). Vlivem reakce dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (PAULOVÁ, *et al.* 2004). Vzorky byly analyzovány spektrofotometricky přístroji HELIOS Gama (THERMOSCIENTIFIC UK), SPEKOL 2000, SPECORD 210.



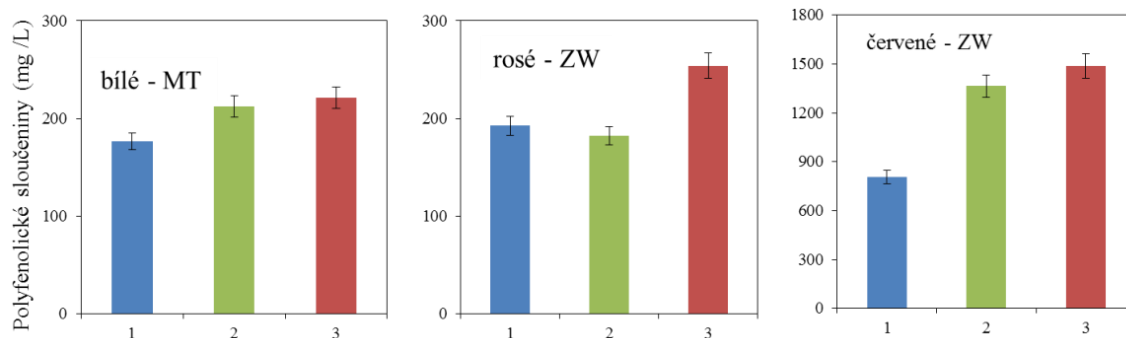
Obrázek 17. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín. 1: víno s obsahem alkoholu 0,1 % alkoholu, 2: víno s obsahem alkoholu 5 % alkoholu, 3: víno s obsahem alkoholu 12

Nižší antioxidační kapacita u bílých vín ve srovnání s víny červenými je způsobena nižším obsahem fenolických látek. Vyššího obsahu fenolických látek u červených vín se dosáhne pomocí doby macerace, během které dochází k uvolnění fenolických látek ze slupek, semen, stopek i dužniny bobule (FUHRMAN, *et al.* 2001). Alkohol vznikající během fermentace spolu se zvyšující se teplotou extrakci navíc podporuje. U bílých vín technologický úkon macerace většinou neprobíhá, proto je obsah fenolických látek u bílých vín menší a vykazují nižší antioxidační aktivitu (MA LAMUELA-RAVENTÓS, 1996)

5.2 Stanovení celkových polyfenolických sloučenin

Polyfenolické sloučeniny které se vyskytují ve víně, patří mezi látky ze skupiny sekundárních metabolitů. Obsah fenolických sloučenin závisí jednak na odrůdě hroznů, jednak na technologii zpracování vína (GARRIDO, *et al.* 2013). Právě obsah polyfenolických sloučenin je odpovědný za celkovou antioxidační aktivitu vína (ŠAMÁNEK, *et al.* 2010). Ke stanovení celkových polyfenolických sloučenin byla využita Folin – Ciocalteova metoda. Metoda je založena na spektrometrickém měření barevných produktů, reakce hydroxidových skupin a fenolických sloučenin s činidlem Folin – Ciocalteu (BALÍK, 2006). Všechny vzorky byly měřeny třikrát, výsledná hodnota byla získána jako průměr z těchto měření.

Podobně, jako u hodnot antioxidační aktivity je obsah celkových polyfenolických sloučenin u bílých a růžových vín podobný (od 179 do 218 mg.l⁻¹), přičemž obsah alkoholu neměl na obsah polyfenolických sloučenin zásadní vliv. Jinak tomu bylo u vín červených. Obsah polyfenolických sloučenin je výrazně vyšší a to z důvodu lišící se technologie výroby červených a bílých vín.

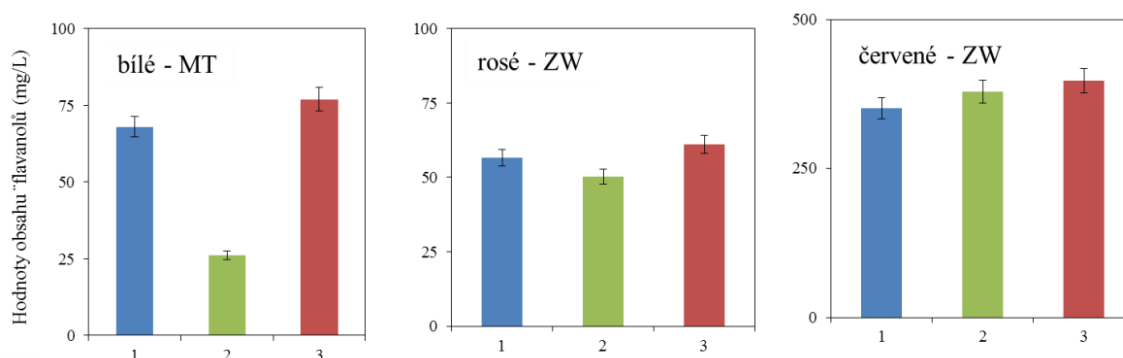


Obrázek 18. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín. 1: víno s obsahem alkoholu 0,1 % alkoholu. 2: víno s obsahem alkoholu 5 % alkoholu, 3: víno s obsahem alkoholu 12 % alkoholu

5.3 Stanovení celkových flavanolů

Do skupiny nejvýznamnějších flavanolů nacházejících se ve víně patří hlavně quercetin, rutin, kaempferol a myricetin. V této práci bylo využito stanovení koncentrace celkových flavanolů pomocí metody která je založena na reakci s DMACA činidlem (BOGS, *et al.* 2007). Tato metoda je citlivější a selektivnější než často používaná reakce s vanilinem a nedochází tak k interferenci s anthokyaniny (KUMŠTA, *et al.* 2009)

Největší hodnoty obsahu flavanolů byly změřeny u klasického červeného vína odrůdy ZW 12 % alkoholu ($405 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), u ZW 5 % alkoholu ($379 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), a ZW 0,1 % ($354 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). U rosé ZW byl obsah flavanolů v rozmezí ($50 - 59 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), nejmenší množství flavanolů bylo naměřeno u bílé odrůdy MT o obsahu 0,1 % alkoholu ($25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

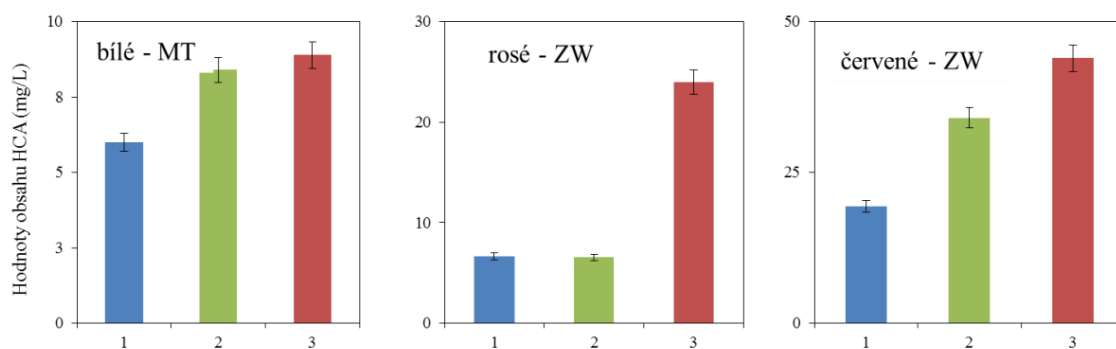


Obrázek 19. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín. 1: víno s obsahem alkoholu 0,1 % alkoholu, 2: víno s obsahem alkoholu 5 % alkoholu, 3: víno s obsahem alkoholu 12 % alkoholu

5.4 Stanovení obsahu celkových hydroxyskořicových kyselin

Hydroxyskořicové kyseliny jsou deriváty kyseliny skořicové. V hroznech se vyskytují především v dužnině bobulí, a vždy přecházejí do moštu. Jejich obsah je do značné míry nezávislý na použité technologii zpracování hroznů. Nejvýznamnějšími a také nejvíce studovanými hydroxyskořicovými kyselinami jsou kávová, p-kumarová, a ferulová kyselina (VELÍŠEK, a HAJŠLOVÁ, 2009)

Významný rozdíl v zjištěných hodnotách obsahu hydroxyskořicových kyselin byl zaznamenán u červených vín a to u ZW 0,1 % alkoholu, kde byla naměřena hodnota $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a ZW 5 % $34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Hodnoty obsahu hydroxyskořicových kyselin u bílých a růžových vín vykazovali minimální rozdíly, pohybovali se v rozmezí od 6 do $8,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obrázek 20. Hodnoty obsahu antioxidační aktivity bílých, růžových a červených vín. 1: víno s obsahem alkoholu 0,1 % alkoholu, 2: víno s obsahem alkoholu 5 % alkoholu, 3: víno s obsahem alkoholu 12 % alkoholu

5.5 Stanovení obsahu vybraných antioxidačních sloučenin pomocí HPLC

Technika HPLC se jeví jako ideální pro stanovení antioxidantů obsažených ve víně, hroznech i ovoci (DOBEŠ, a SOCHOR, 2012). Studovány byly významné antioxidanty, které jsou pro víno typické. Předmětem studie byly významné a typické antioxidanty, které se nachází ve víně, patří sem: kyseliny gallová, vanilová, syringová, kávová, p-kumarová, ferulová, kaftarová, fertalová, z následujících antioxidantů jsou to: katechin, epikatechin, cis-resveratrol, quercetin, rutin, quercitrin a tyrosol. Výsledky měření jsou v (Tabulce 5).

Tabulka 5. Hodnoty vybraných antioxidačních komponent stanovené pomocí HPLC ve sledovaných vínech

sloučenina	obsah alkoholu					
	nealko bílé		nealko rosé		nealko červené	
	0,10%	5%	0,10%	5%	0,10%	5,00%
kyselina gallová	5,1	4,85	3,79	4,28	40,7	51,9
kyselina vanilová	1,24	1,63	1,75	1,73	5,63	3,54
kyselina syringová	0,50	0,37	0,51	0,54	6,09	8,05
kyselina kávová	39,00	54,70	50,10	37,40	63,10	45,20
kyselina p-kumarová	1,13	2,26	1,20	1,21	5,30	5,08
kyselina ferulová	2,62	3,20	2,47	2,06	3,45	3,71
kyselina kaftarová	28,10	45,40	38,10	26,00	46,10	32,80
kyselina fertarová	2,02	2,11	2,05	1,64	2,90	2,10
katechin	27,90	7,20	24,00	10,00	63,10	88,40
epikatechin	14,10	4,50	8,20	10,00	35,20	38,50
cis-resveratrol	0,06	0,07	0,12	0,16	3,28	2,82
rutin	0,77	1,47	0,84	0,12	12,40	3,53
quercetin	0,05	0,18	0,04	0,04	0,43	2,03
quercitrin	0,04	0,11	0,09	0,02	0,26	2,96
tyrosol	8,54	17,20	9,13	20,20	20,20	26,50

Kyselina gallová - obsah kyseliny gallové se u vzorků pohyboval v rozmezí 3,79 až 51,9 mg.l⁻¹. Výrazně vyšší koncentrace byla naměřeny u nealko červeného vína (0,5 %), 51,9 mg.l⁻¹, nejnižší koncentrace (3,79 mg.l⁻¹) byla změřena u nealko rosé (0,10 %)

Kyselina kávová - obsah kyseliny kávové ve všech sledovaných vzorcích vína byl velmi vyrovnaný, pohyboval se v rozmezí 37,4 až 63,1 mg.l⁻¹. Nejvyšší koncentrace kyseliny

kávové ($63,1 \text{ mg.l}^{-1}$) bylo naměřeno u nealko červeného (0,5 %), nejnižší ($37,4 \text{ mg.l}^{-1}$) u nealko rose (0,5 %)

Kyselina kaftarová - u sledovaných vzorků se pohybovali naměřené hodnoty velmi vyrovnaně v rozmezí $46,1$ až 26 mg.l^{-1} . Nejvyšší koncentrace ($46,1 \text{ mg.l}^{-1}$) byla změřena u nealko červeného (0,10 %), nejnižší koncentrace u nealko rose (0,5 %)

Kyselina vanilinová - naměřené hodnoty se pohybovali ve velmi nízkých hladinách od nejnižší koncentrace $1,24 \text{ mg.l}^{-1}$ u nealko bílé (0,10 %) až po nejvyšší koncentrace ($5,63 \text{ mg.l}^{-1}$) u nealko červeného (0,10 %).

Kyselina syringová - naměřené hodnoty u vzorků nealko bílých a rose se pohybovali vyrovnaně na velmi nízkých hodnotách ($0,50$ až $0,54 \text{ mg.l}^{-1}$) na rozdíl od nealko červeného, kde bylo naměřeno podstatně větší množství kyseliny syringové ($6,09$ až $8,05 \text{ mg.l}^{-1}$).

Kyselina p-kumarová - u vzorků nealko bílých a rosé vín se pohybovali naměřené hodnoty v nízkých hladinách od $1,13$ do $2,26 \text{ mg.l}^{-1}$. Vyšší hodnoty byly naměřeny u nealko červené $5,08$ až $5,30 \text{ mg.l}^{-1}$

Kyselina nerulová - v daných vzorcích nealko bílých, rose, i červených vín byly naměřeny nízké a velmi vyrovnané hodnoty $2,06$ až $3,71 \text{ mg.l}^{-1}$.

Kyselina fertarová - naměřené hodnoty u vzorků nealko bílých, rosé i červených vín byly velmi nízké a velmi vyrovnané, pohybovali se od $1,64$ až $2,90 \text{ mg.l}^{-1}$.

Katechin - naměřené hodnoty u nealko bílé a rosé se pohybují v nižších hladinách koncentrace, nejnižší koncentrace byla naměřena u nealko bílé (5 %) a to $7,20 \text{ mg.l}^{-1}$. Výrazně nejvyšší hodnoty koncentrace katechinu byly naměřeny u obou nealko červených vín $63,10$ až $88,40 \text{ mg.l}^{-1}$.

Epikatechin - naměřené hodnoty u vzorků nealko bílých a rosé vín jsou opět výrazně nižší, $4,50$ až $14,10 \text{ mg.l}^{-1}$. Až dvojnásobek koncentrace epikatechinu bylo naměřeno u nealko červených vín, $35,20$ až $38,50 \text{ mg.l}^{-1}$.

Cis-resveratrol - naměřené hodnoty ve vzorcích nealko bílé a rosé vín je velmi nízké až stopové 0,06 až 0,16 mg.l⁻¹. U nealko červených vín byla naměřena o málo vyšší koncentrace 2,82 až 3,28 mg.l⁻¹.

Quercetin - u sledovaných vzorků nealko bílé, rosé a červené (0,10 %) byly naměřeny velmi nízké koncentrace quercetinu 0,04 až 0,43 mg.l⁻¹. U nealko červené byla naměřena relativně vyšší hodnota 2,03 mg.l⁻¹.

Rutin - minimální naměřené hodnoty koncentrace byly u vzorků nealko bílé a rosé, pohybovali se v rozmezí od 0,12 až 1,47 mg.l⁻¹. Největší koncentrace rutinu byla naměřena u nealko červené (0,10 %) pohybovala se kolem 12,4 mg.l⁻¹.

Tyrosol - rozsah naměřené koncentrace tyrosolu u sledovaných nealko vín byl od nejnižší hodnoty 8,54 mg.l⁻¹, u bílého (0,10%) a nejvyšší naměřené hodnoty 26,50 mg.l⁻¹ u červeného (5,00 %) vína.

Z výsledků měření je patrné že ve vzorcích dealkoholizovaných bílých vín byla naměřena největší koncentrace antioxidantů u kyseliny kávové, kyseliny kaftarové, katechinu a tyrosolu. Nejnižší hodnoty byly naopak zaznamenány u sloučenin, quercitrinu, quercetinu a cis-resveratrol.

Z naměřených hodnot ve vzorcích dealkoholizovaných hrosé vín vykazuje největší koncentraci kyselina kávová, kyselina kaftarová, katechin a tyrosol. Nejnižší koncentrace byly naměřeny u quercitrinu, quercetinu, rutinu a kyseliny syringové.

Ve vzorcích červeného dealkoholizovaného vína byla naměřena největší koncentrace antioxidantů u katechinu, kyseliny kávové, kyseliny gallové, kyseliny kaftarové, epikatechinu a tyrosolu. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u quercitrinu a quercetinu.

Nejvyšší naměřená koncentrace ve vybraných antioxidantech byla zaznamenána u sloučeniny Katechin (88.4 mg.l⁻¹ u 5 % červeného vína), vysoký obsah byl také monitorován u kyseliny kávové, kyseliny kaftarové a gallové. Z výsledků měření lze říci, že červené víno mělo vyšší obsah, v mnohých případech až několikanásobný, sledovaných antioxidantů než bílé nebo růžové vína. U sloučeniny tyrosol byl zřejmý vyšší obsah těchto látek u nealko (5 % alkoholu) než u dealkoholizovaných vín (0,10 % alkoholu).

Dle naměřených výsledků lze říci, že obsah alkoholu neměl na hodnoty polyfenolických sloučenin zásadní vliv, což dokazují také jiné studie (IVANOVA-PETROPULOS, *et al.* 2015). Za rozdílnost obsahu antioxidantních komponent je odpovědná především technologie výroby a odrůda (BALÍK a KOPEC, 2008). V současné době jsou ale tato vína pro konzumenty málo známá (STÁVEK, 2013; JUNG, 2005).

V uplynulých letech se objevily nové požadavky spotřebitelů na stávající sortiment nápojů. Spotřebitelé se začali více zajímat o lehké ovocné nápoje s nízkým obsahem alkoholu, a to tlačilo vinařské odvětví do diverzifikace jejich produkce a vývinu nových výrobků. Díky těmto požadavkům začala vznikat dealkoholizovaná vína, která se dnes již stávají více dostupným zbožím.

Epidemiologické studie zaměřené na nápoje s obsahem alkoholu naznačují, že jeho mírná konzumace je spojena se sníženým rizikem ischemické choroby srdeční či onemocnění *diabetes mellitus* (RONKSLEY, *et al.* 2011). Vztah mezi střídou konzumací alkoholu a nižším rizikem těchto chorob nejvíce projevil u těch, kteří z celého sortimentu alkoholických nápojů konzumovali víno. Klinické studie tedy dokládají, že mírná konzumace vína a obzvláště červeného vína, může snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění (ŠAMÁNEK, a URBANOVÁ, 2010).

Studie, které se zabývají srovnáváním účinků antioxidantů obsažených v červených alkoholických a nealkoholických vínech na lidské zdraví naznačují, že spojení alkoholu s antioxidanty je kontraproduktivní. I když oba druhy vín obsahují shodné množství antioxidantů příznivě účinkujících na srdeční a cévní choroby, alkohol může negativně působit na ochranný systém polyfenolů. Nealkoholické červené víno by tak mohlo být účinným pomocníkem v boji proti kardiovaskulárním onemocněním (Fung, 2012). Jiná experimentální studie vyhodnocuje účinky červeného alkoholického a nealkoholického vína na potenciální krevní tlak (BP). Bylo zjištěno, že nealkoholická červená vína díky účinkům polyfenolů obsažených ve víně, snižují systolický a diastolický tlak (TK). Denní spotřeba nealkoholického červeného vína by tak mohla být užitečná jako prevence nízké a střední hypertenze (Blanch, *et al.* 2012)

Zdali je to právě alkohol obsažený ve víně, který má na lidský organismus příznivé účinky je ale dnes široce diskutované téma. Některé studie uvádějí jeho příznivé účinky, jiné naopak účinky škodlivé. (ŠAMÁNEK, a URBANOVÁ, 2010). Klasické víno si však díky obsahu alkoholu nemůže vychutnat každý.

5 Závěr

Výsledky předložené studie dokázaly, že obsah antioxidantních komponent, které jsou v dealkoholizovaných vínech obsažené, je srovnatelný s obsahem v „běžných“ alkoholizovaných vínech.

Některé klinické studie přichází s tvrzením, že víno s nižším obsahem alkoholu nebo jen mošt, může mít lepší vliv na lidské zdraví, než víno s vyšším obsahem alkoholu. V minulých letech různé vědecké studie potvrzovaly zdravotní výhody červených vín. Mírná konzumace alkoholického vína příznivě působila na srdeční a cévní choroby, mozkovou mrtvici, infarkt.

V poslední době přibývá nových studií zabývajících se vlivem nealkoholických vín a v nich obsažených antioxidantních komponentů na lidské zdraví. Pravidelným popíjením nealkoholického červeného vína můžeme zajistit prevenci proti srdečním záchvatům nebo jiným kardiovaskulárním problémům.

Dealkoholizovaná vína se tak dostávají díky svým vlastnostem a příznivému působení na lidské zdraví do povědomí široké veřejnosti a mohla by se stát významnou alternativou k běžným alkoholickým vínům. Představují ideální volbu pro řidiče, sportovce, vyznavače zdravého životního stylu, nastávající matky, lidi se zdravotními potížemi a pro všechny ostatní milovníky vína, kteří si jej kvůli obsahu alkoholu nemohou vychutnávat.

6 Souhrn

Práce byla zaměřena na studii antioxidantních složek obsažených ve vybraných dealkoholizovaných vínech. Pro experiment byly vybrány tři vzorky bílého, tři růžového a tři červeného vína, vždy o hodnotách alkoholu 0,1 %, 5 % a 12 % alkoholu. Pomocí vysoce-účinné kapalinové chromatografie byly identifikovány významné antioxidanty, konkrétně kyselina gallová, kyselina vanilová, kyselina syringová, kyselina kaftarová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová, kyselina fertarová, kyselina ferulová, katechin, epicatechin, cis-resveratrol, rutin, quercitrin, quercetin a tyrosol. Spektrofotometrie bylo použito i k stanovení antioxidantní aktivity, obsahu celkových polyfenolů, flavonoidů a kyseliny hydroxyskořicové. Z výsledků této studie lze konstatovat, že obsah antioxidantních komponent v dealkoholických vínech a v „běžných“ vínech byl řádově v podobných hodnotách.

Klíčová slova: dealkoholizované víno, polyfenolické sloučeniny, antioxidantní aktivita, HPCL

Resume

Our work was focused on the study of antioxidant ingredients contained in dealcoholised selected wines. For the experiment, three were selected samples of white, pink, three and three red wines, each of the values alcohol 0,1 %, 5 % and 12 % alcohol. Using a high-performance liquid chromatography were identified important antioxidants, specifically gallic acid, vanillic acid, syringic acid, caftaric acid, caffeic acid, p-coumaric acid, fertaric acid, ferulic acid, catechin, epicatechin, cis-resveratrol, rutin, quercitrin, tyrosol and quercetin. Spectrophotometry was also used for the determination of antioxidant activity, contents of total polyphenols, flavonoids and hydroxycinnamic acids. The results of this study can be said that the content of antioxidant components in dealcoholised wines and a "normal" order of the wines was similar values.

Keywords: dealcoholised wine, polyphenolic compounds, antioxidant activity, HPCL

7 Seznam použitých zkratek

ABTS	2,2- azinobis(3-ethyl-2-3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
AO	Aantioxidační aktivita
DMACA	p-dimethylaminocinnamaldehyd
DPPH	2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl
FCM	průtoková cytometrie
FeCl ₃	Chlorid železitý
FRAP	železitý redukční antioxidační potenciál
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
OD	osmotická destilace
ORAC	měření absorbance kapacity kyslíkového radikálu
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCC	rotační kuželový sloupec
TAA	celková antioxidační aktivita
TPTZ	(2,4,6- tripyridyl-S-triazin)
UV – VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie

8 Seznam použité literatury

- Ackermann, Petr, a další. 2007.** *Velký vinařský slovník*. Praha : Radix, spol. s .r. o., Praha 2007, 2007. str. 396 + 36 stran barevná příloha. ISBN: 978-80-86031-70-5.
- Afaq, Farrukh, a další. 2006.** Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Protects Human HaCaT Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006, stránky 223-232.
- Alzand, I et al. 2012.** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. *Journal of Pharmacy Research*,. 2012, stránky 4013-4012.
- Anderson, Oyvind M a Jordheim, Monica. 2001.** "Anthocyanins". *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001. ISBN: 0470016175, doi : 10.1038/npg.els.0001909.
- Balík, Josef a Kopec, K. 2008.** *Kvalitologie zahradnických produktů - nauka o hodnocení a řízení jakosti produktů a produkčních procesů*. Brno : Brno: MZLU, 2008.
- Balík, Josef. 2006.** *Vinařství návody pro laboratorní cvičení*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2006. str. 98. ISBN: 80-7157-933- 5.
- Belitz, Hans Dieter, Grosch, W a Schieberle, P. 2009.** *Food chemistry*. místo neznámé : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. stránky 829-832. ISBN: 978-3-540-69933-3.
- Bognar, Eszter, a další. 2013.** Antioxidant and anti-inflammatory effects in RAW264.7 macrophages of malvidin, a major red wine polyphenol. *PLOS ONE*. 6 2013.
- Bogs, a další. 2007.** The Grapevine Transcription Factor VvMYBPA1 Regulates Proanthocyanidin Synthesis during Fruit Development. *Plant Physiology*. 2007. 2007, stránky 1347-1361.
- Boulton, B a Buscema, Fernando. 2014.** Phenolic Composition of Malbec: A Comparative Study of Research-Scale Wines between Argentina and the United States. *American Society for Enology and Viticulture*. 2014.

Calderon-Montaño, JM, a další. 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011, stránky 289-344.

Campbell, Bruce C. a Kim, Johng H. 2006. Nuts' New Aflatoxin Fighter: Caffeic Acid? *United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service*. 2006.

Coufal, Pavel. 2004. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [Online] 2004. [Citace:]

De Pascual, Teresa a Sanchez-Ballesta, Maria Teresa. 2008. Anthocyanins: from plant to heal. *Phytochemistry reviews*. 2 2008, stránky 281-299.

Dobeš, J., a další. 2012. Stanovení oxidační aktivity přírodních antioxidantů pomocí automatického robota a spektrometru. *Mendel Net 2012*. [Online] 2012. [Citace: 15. 3 2015.] http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/data/up/39_dobes_669.pdf.

Duke, James A. 2001. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. 2001. str. 654. ISBN: 08-493-3865-4.

Dvořáková, a další. 2006 Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladkách, mladínách a pivech *Kvasný průmysl* 111-114

Dweck, a další. 2015 Olfactory Proxy Detection of Dietary Antioxidants in *Drosophila* *Science Daily*

Edirisinghe, I, a další. 2011. Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *British Journal of Nutrition*. 5 2011, stránky 913-922.

Farkaš, Ján. 1980. *Technologie a biochemie vána*. Praha : SNTL n. p. Spálená 51, 113 02 Paha 1, 1980. str. 870. L 18-B2-IV-41f/82172.

Ferguson, LR, Shuo-tun a Harris, PJ. 2005. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29. *Molecula Nutrition a Food Research*. 2005, stránky 585-693.

Francini, Alexandra a Sebastiani, Luca. 2013. Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. *Antioxidanty* 2013. 2013, stránky 191-193.

Garrido, I, Bencomo, Rodriques a Garcia-Ruiz. 2013. Posouzení dopadu navíc antimikrobiální rostlinných extraktů na víno: volatilní a fenolové složení. *J Sci Food Agric.* 2013, stránky 2507-2516.

Georgiev, a další. 2014Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals391-415

Guilford, Jacquelin M. a Pezzuto, John M. 2011. Wine and Health: A Review. *American journal of enology and viticulture.* 2011, Sv. 4, stránky 471-486.

HAN, Xiuzhen, SHEN, Tao a LOU, Hongxiang. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences.*, 2007, stránky 950-988.

Hasal, P, Schreiber, I a Šnita, D. 2007. 18.9 Pervaporace. *Chemické inženýrství I.* místo neznámé : VŠCHT Praha, 2007.

Hlúbik, a další. 2006 Antioxidanty v klinické praxi *Interní medicína pro praxi*79-81

HEIM, et al. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional biochemistry.* 2002, stránky 572-584.

Chang, Chu Y.-H., Chang, Chao-Lin a Hsu, H.-F. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2000, stránky 561-566.

Ivanova-Petropulos, Violeta, a další. 2015. Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chemistry.* 4 2015, stránky 412-420.

Izák, Pavel, Šípek, Milan a Hodek, Jiří. 1999. Aparatura pro pervaporační dělení kapalných směsí plochými polymerními membránami. *Chemické listy* 93. 1999, stránky 254-258.

Jordán, Hemzalová. 2001. *Antioxidanty zázračné zbraně, vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život.* Brno : JOTA, s. r. o., 2001. str. 160. ISBN 80-7217-156-9.

Jung, Carl. 2005. Carl Jung skutečně víné bez alkoholu. <http://www.carl-jung.cz/>. [Online] 2005. [Citace: 29. 4 2015.]

Karabín, Marcel, Dostálek, Pavel a Hofta, Pavel. 2006. Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarnictví. *Chemické Listy 100*,. 03 2006, stránky 184-189.

Karlsson, H, Laureiro, S a Tragardh, G. 1995. Aroma compounds recovery with pervaporation- temperature effects during pervaporation of muscat wine. *Journal Food Engineering.* 1995, stránky 177-191.

Kennedy, Saucier, Sláva. 2006. Fenoly v hroznech a víně: Historie a perspektiva. *American Journal of enology and viticulture.* 9 2006, Sv. č.3, stránky 239-248.

Kraus, Vilém, Kuttelvašer, Zdeněk a Vurm, Bohumil. 1997. *Encyklopedie českého a moravského vína.* Praha : Melantrich, a. s., 1997. str. 224. ISBN 80-7023-250-1.

Kumšta, Michal. 2008 b. Fenolické látky červených vín - část 1.: Anthokyany. *Vinařský obzor.* 5 2008 b, stránky 238-239.

Kumšta, Michal. 2008a. Fenolické látky červených vín - část 2.: Taniny. *Vinařský obzor.* 7-8 2008 a, stránky 345-347.

Kumšta, Michal. 2007. Hydroxyskořicové kyseliny - Část1.: Obecné a antioxidační vlastnosti. *Vinařský obzor.* 2007, Sv. 6/2007, str. 293.

Kumšta, Michal, a další. 2009. Srovnání vybraných rosé vín z pohledu zdraví prospěšných látek obsažených ve víně. *Vinařský obzor.* 6 2009, Sv. 6, stránky 272-273.

Kwik- Uribe, Catherine a Bektash, Roger M. 2008. Cocoa flavanols - measurement bioavailability and bioactivity. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 2008, stránky 280-283.

Kwon, Jung Yeon, a další. 2007. Peonidin Inhibits Phorbol-Ester-Induced COX-2 Expression and Transformation in JB6 P+ Cells by Blocking Phosphorylation of ERK-1 and -2. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007, stránky 513-520.

Laho, Ladislav, Minárik, Erich a Navara, Anton. 1970. *Vinárstvo chémia, mikrobiológia a analytika vína*. Bratislava : Príroda, Vydavateľstvo podohospodárskej literatury, 1970. str. 426. 64-054-70, číslo publikace 2866.

Lau, Tiffany. 2008. A healthy way to live: The Occurance, bioactivity, biosynthesis, and synthesis of kaempferol. [Online] 21. Únor 2008. <http://www.uvic.ca/>.

Lee, Cy a Jarowsky, A. 1987. Phenolic Compounds in White Grapes Grown in New York. *American Journal of Enology Viticulture*. 1987, stránky 277-281.

Li, Hua, a další. 2009. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*. 2009, Sv. 112, stránky 454-460.

Liu, Yanquin, a další. 2013. Gallic acid is the major component of grape seed extract that inhibits amyloid fibril formation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, Sv. 23, 1, stránky 6336-6340.

Ma Lamuela-Raventós, Rosa. 1996. Fenoly v bílých volný běh šťáv a vína z Penedès podle HPLC: Změny v průběhu vinifikace. *Journal of zemědělské a potravinářské chemie*. 17. 10 1996, stránky 3040-3046.

Michlovský, Miloš. 2014 a. *Bobule*. Rakvice : Vinselekt Michlovský a. s. Luční 858, 691 03 Rakvice, 2014 a. str. 229. ISBN: 978-80-905319-3-2.

Michlovský Miloš, 2014b *Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře*. Vydání 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014, 262 s. ISBN 9788090531925.

NARAYANA, K. Raj, et al. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of pharmacology*,. 2001, stránky 2-16.

Novák, Jan, a další. 2008. Průtoková cytometrie ve výskumu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a její aplikace v praxi. *Chemické listy*. 2008, stránky 183-187.

Ong, Kian C a Khoo, Hoon-Eng. 1997. Biological Effects of Myricetin. *General pharmacology*. 1997, stránky 121-126.

Paulová, Hana, Bochořáková, Hana a Táborská, Eva. 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* 98. 2004, stránky 174-179.

Pavloušek, Pavel. 2011. *Pěstování révy vinné Moderní vinohradnictví*. Praha 7 : Grada Publishing, a. s., 2011. str. 336. ISBN 978-80-247-3314-2.

Pavloušek Pavel. 2005. Význam vína pro zdraví člověka. *Vinařský obzor*. 12 2005, str. 642.

Pickering, Gary J. 2000. Low-and Reducet-alcohol wine: A Review. *Journal of Wine Research*. 2000, stránky 129-144.

Ribereau-Gayon, Pascal, a další. 2006. *Handbook of enology, Volume 2: The chemistry of Wine, Phenolic compounds*,. 2 Edition. 2006. stránky 145-146. ISBN: 13: 978-0-470-01037-2.

Romero-Perez, Ana I, Gomez-Ibern, Maite a Lamuela-Raventos, Rosa M. 1999. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47. 3 1999, stránky 1533-1536.

Ronksley, Paul E, a další. 2011. Sdružení konzumace alkoholu s vybranými kardiovaskulárních onemocnění výsledky: systematický přehled a meta-analýza. *British Medical Journal*. 2011, str. 342.

Roos, JA a Kasum, CM. 2002. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*. 2002, stránky 19-34.

Saha, Bithika, a další. 2013. Review of processing technology to reduce alcohol levels in wines. Bordeaux : autor neznámý, 2013, stránky 78-86.

Sasaki, R, a další. 2007. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochemical Pharmacology*. 12 2007, stránky 1619-1627.

Schmidtke, Leigh M., Blackman, John W. a Agboola, Samson O. 2012. Production technologies for reduced alcoholic wines. *Journal of Food Science*. 2012, str. 17.

Smith, Clark R. 1996. Apparatus and method for removing compounds from a solution. *United States Patent: 5480665*. 2. 1 1996. investor.

Sochor, J., a další. 2011. *Screeningová metodika pro stanovení antioxidantů*. Brno : Brno: Mendelova univerzita v Brno, 2011. str. 36. ISBN: 978-80-7375-575-1.

Stávek, Richard. 2013. Bez alkoholu (tedy téměř). [editor] SV ČR- Vinařský obzor Velké Bílovice. *Vinařský obzor*. 2013, Sv. 7-8, stránky 398-399.

Strupat, K, Karas, M a Hillenkampem, F. 1991. "2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry". *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1991, stránky 89-102.

Šamánek, Milan a Urbanová, Zuzana. 2010. *Víno na zdraví*. Praha : Agentura Lucie, spol. s. r. o., 2010. ISBN798-80-87138-17-5.

Šinkorová, Zuzana a Zárybnická, Lenka. 2008. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY*. 2008, Sv. 3. Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové.

Šípek. 2000. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha : Grada Publishing, spol. s r. o., 2000. str. 320. ISBN 80-7169-704-4.

Šmidrkal, Jan, a další. 2001. Resveratrol. *Chemické listy* 95. 2001, stránky 602-609.

Taillandier a Bonnet. 2005. *Le vin. Composition et transformations chimiques*. Lavoisier Paris : autor neznámý, 2005. str. 204. ISBN: 2-7430-0804-0.

Trna, J., Táborská, E. Přírodní polyfenolové antioxidanty[online].2002
Dostupnéz:https://www.google.cz/webhp?sourceid=chrome_instant&ion=1&espv=2&ie=UTF8#q=p%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD%20polyfenolov%C3%A9%20antioxidanty. [Online] [Citace: 10. Únor 2015.]

Velíšek, Jan a Hajšlová, Jana. 2009. *Chemie potravin II.* Tábor : OSSIS - ing. Václav Šedivý, 2009. stránky 58-59. ISBN: 978-80-86659-16-9.

XIA, En-Qin, et al. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*,. 2010, stránky 622-646.

Zheng, a další. 2008. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: inhibition of microglial neurotoxicity. *European Journal of Pharmacology*. 2008.

Žory, a další. 2006 "Phenolic Compounds of Barley Grain and Their Implication in Food Product Discoloration"*Journal of Agricultural and Food Chemistry*9978-84