



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ VYBRANÝCH BIOAKTIVNÍCH LÁTEK V HROZNECH RÉVY VINNÉ

DETERMINATION OF SELECTED BIOACTIVE SUBSTANCES IN GRAPES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Markéta Havlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1922/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Markéta Havlíková**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Stanovení vybraných bioaktivních látek v hroznech révy vinné

Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární rešerši tvořenou přehledem relevantních produktů sekundárního metabolismu, které se vyskytují v hroznech révy vinné, a možnostmi jejich extrakce a stanovení.
- Vyberte vhodné metody extrakce volatilních a fenolických látek z hroznů a proveďte stanovení těchto látek pomocí separačních metod (GC, LC).
- Získaná data zpracujte vhodnými statistickými metodami (základní popisná statistika, analýza rozptylu, korelační analýza), diskutujte rozdíly/podobnosti mezi vzorky.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Markéta Havlíková
studentka

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této diplomové práce bylo stanovení vybraných bioaktivních látek v hroznech révy vinné a následné porovnání rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Byly analyzovány dvě frakce hroznů (slupky a dužina se semeny) 4 odrůd révy vinné – Hibernál, Johanniter, Ryzlink rýnský a Aurelius.

Pro stanovení byly použity dvě metody: pro fenolické látky vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem a pro těkavé látky headspace mikroextrakce na pevnou fázi ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem. Pro každou z těchto metod byla nejprve vybrána optimální technika extrakce, která byla dále použita pro analýzu všech vzorků. Byla také ověřena linearita metodou vnějšího standardu, pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem byl koeficient spolehlivosti R^2 v rozsahu 0,9650–0,9989, pro headspace mikroextrakci na pevnou fázi ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem v rozsahu R^2 0,8571–0,9999.

Ve vzorcích bylo identifikováno 63 těkavých a 9 fenolických sloučenin. Z nich byly vybrány sloučeniny charakteristické pro hrozny (20 těkavých látek a 5 fenolických látek). Na základě množství sledovaných sloučenin byly mezi sebou porovnány obě frakce hroznu a následně i odrůdy révy vinné. Mezi frakcemi hroznu i napříč odrůdami byly prokázány rozdíly v obsahu vybraných látek, které mohly být pravděpodobně způsobeny geografickým původem vzorků.

KLÍČOVÁ SLOVA

hrozny, aromatické látky, fenolické látky, SPME, GC-MS, LC

ABSTRACT

The subject of this thesis was the determination of selected bioactive substances in grapes and the subsequent comparison of differences between the samples. Two fractions of grapes (skins and pulp with seeds) of 4 grape varieties - Hibernial, Johanniter, Riesling and Aurelius - were analysed.

Two methods were used for the determination: for phenolic substances, high-performance liquid chromatography with mass spectrometry and for volatile substances, headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry. For each of these methods, the optimal extraction technique was first selected and then used for the analysis of all samples. The linearity of the external standard method was also verified with a reliability coefficient R^2 in the range of 0.9650-0.9989 for high-performance liquid chromatography with mass spectrometry and 0.8571-0.9999 for headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry.

63 volatile and 9 phenolic compounds were identified in the samples. From these, specific compounds of grapes (20 volatile compounds and 5 phenolic compounds) were selected. On the basis of the amount of observed compounds, the two grape fractions and subsequently the grape varieties were compared with each other. There were differences in the content of selected compounds between grape fractions and across varieties, which could probably be due to the geographical origin of the samples.

KEYWORDS

grapes, aroma compounds, phenolic compounds, SPME, GC-MS, LC

HAVLÍKOVÁ, Markéta. Stanovení vybraných bioaktivních látek v hroznech révy vinné [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-03-28]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156548>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych především velice ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce, paní doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. a panu Ing. Michalu Grossovi za ochotu, trpělivost, odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytovali během konzultací v průběhu zpracování mé diplomové práce.

OBSAH

OBSAH.....	4
1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1. Réva vinná.....	7
2.2. PIWI odrůdy.....	8
2.3. Morfologie a fyziologie <i>Vitis vinifera</i>	8
2.3.1. Rostlina.....	8
2.3.2. Hrozen a vývoj bobule.....	10
2.4. Voda a minerální látky.....	12
2.5. Primární metabolity hroznů.....	12
2.6. Sekundární metabolity hroznů.....	13
2.6.1. Terpeny.....	15
2.6.2. Methoxypyraziny.....	16
2.6.3. Thiolové sloučeniny.....	16
2.6.4. Fenolické sloučeniny.....	16
2.6.4.1. Biosyntéza terpenoidů a fenolických látek.....	19
2.6.5. Alkoholy a aldehydy.....	20
2.7. Vnější faktory ovlivňující obsah těkavých látek.....	20
2.7.1. Vliv místa.....	20
2.7.2. Vliv použitých pěstebních postupů.....	21
2.8. Metody extrakce bioaktivních látek.....	21
2.9. Metody stanovení bioaktivních látek.....	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1. Použité vybavení.....	27
3.2. Použité chemikálie.....	27
3.3. Analyzované vzorky.....	27
3.4. Podmínky analýzy HPLC-MS.....	28
3.5. Extrakční metody pro analýzu pomocí HPLC-MS.....	28
3.5.1. Postup extrakce č. 1.....	28
3.5.2. Postup extrakce č. 2.....	28
3.5.3. Postup extrakce č. 3.....	29
3.5.4. Postup extrakce č. 4.....	29
3.6. Příprava kalibračních roztoků standardů pro HPLC-MS.....	29
3.7. Podmínky analýzy pomocí HS-SPME-GC-MS.....	29

3.8. Příprava kalibračních roztoků standardů pro HS-SPME-GC-MS	30
3.8.1. Linearita	30
3.9. Extrakční metody pro analýzu pomocí GC-MS	31
3.9.1. Postup přípravy vzorků pro výběr metody	31
3.10. Statistické zpracování dat	32
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	33
4.1. Výběr extrakční metody pro analýzu HPLC-MS	33
4.2. Výběr extrakční metody pro analýzu GC-MS	33
4.2.1. Potah vlákna a teplota extrakce	33
4.2.2. Působení ultrazvuku	38
4.2.3. Přídavek nasyceného roztoku chloridu sodného	38
4.3. Stanovení vybraných bioaktivních látek (slupky vs. dužina se semeny)	39
4.3.1. Sloučeniny stanovené pomocí HS-SPME-GC-MS	39
4.3.2. Sloučeniny stanovené pomocí HPLC-MS	40
4.4. Porovnání odrůd	41
4.4.1. Kvalitativní analýza	41
4.4.2. Kvantifikace vybraných sloučenin	43
4.4.3. Shluková analýza	46
4.4.4. Analýza hlavních komponent	48
5. ZÁVĚR	51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
SEZNAM PŘÍLOH	60
PŘÍLOHY	61

1. ÚVOD

Hrozny révy vinné (*Vitis vinifera* L.) jsou nejoblíbenějším ovocem na světě, a tudíž jednou nejvýznamnějších zahradnických plodin. Používají se především k výrobě vína, ale významné jsou i stolní hrozny a hrozny pěstované na rozinky. Pro různé styly vína se používají různé odrůdy révy vinné. Se svou bohatou historií trvající tisíce let je víno nápojem velkého kulturního významu, a také důkazem lidské vynalézavosti. Pěstování révy vinné se v zakavkazských oblastech datuje do období 5 000–6 000 let př. n. l.

Hrozny *Vitis vinifera* jsou nejen ovocem plným chuti a vůně, obsahují také řadu bioaktivních látek, které přispívají k chuti i potenciálním zdravotním účinkům. Mezi tyto sloučeniny patří např. polyfenoly, jako je resveratrol, a flavonoidy, které si získaly pozornost pro své antioxidační vlastnosti a potenciální zdraví podporující účinky.

Analýza bioaktivních látek přítomných v hroznech a víně *Vitis vinifera* je nezbytná pro pochopení jejich složení, kvality a potenciálních zdravotních přínosů. Využití některých bioaktivních látek z *Vitis vinifera* přesahuje rámec výroby vína. Extrakty bohaté na polyfenoly našly uplatnění v různých průmyslových odvětvích, včetně farmaceutického průmyslu, kosmetiky a funkčních potravin.

Analýza těkavých látek v hroznech a víně hraje významnou roli při zajišťování pravosti a kvality ve vinařském průmyslu. Umožňuje také nahlédnout do vztahu mezi složením hroznů a vlastnostmi vína. Využitím jedinečného otisku těkavých sloučenin, který je vlastní každé odrůdě hroznů, se může zabránit případným podvodům s falšováním či nesprávným označováním produktů.

Tato diplomová práce se proto zaměřuje na možné extrakční metody a metody stanovení vybraných bioaktivních látek hroznů révy vinné (jako možných markerů výše zmíněných nekalých praktik producentů), v odrůdách: Hibernál, Johanniter, Ryzlink rýnský a Aurelius.

2. TEORETICKÁ ČÁST

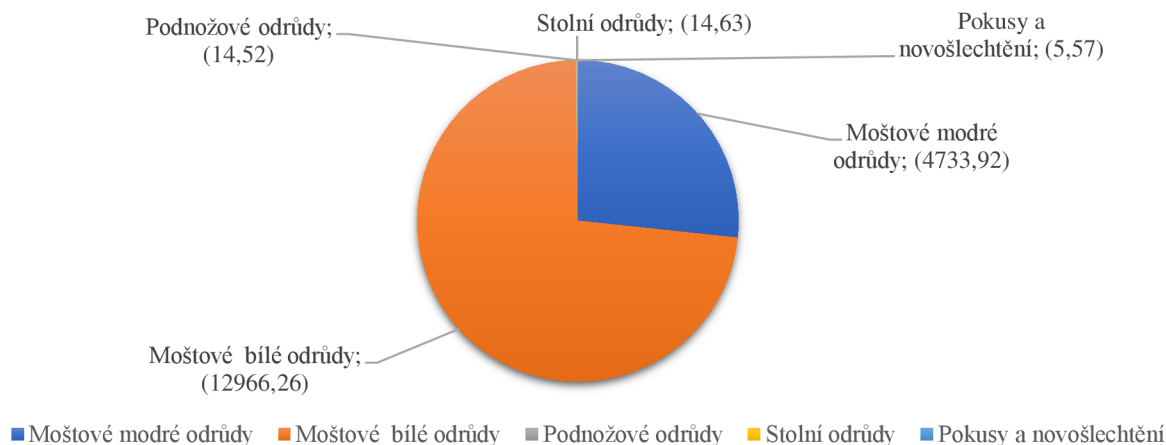
2.1. Réva vinná

Původním divokým druhem byla tzv. lesní réva vinná (*Vitis vinifera* subsp. *silvestris*), rostoucí v částech Evropy, Afriky a Asie, především v okolí Středozevního, Černého moře a v okolí velkých vodních toků (Dunaj a Rýn). Domestikovaným, celosvětově rozšířeným, pro vývoj vinohradnictví důležitým druhem je druh *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* (syn. *sativa*), neboli ušlechtilá réva vinná či evropská réva vinná. První výskyt botanického druhu *Vitis vinifera* L. byl zaznamenán již před 65 miliony let. Tato zahradnický významná rostlina je díky svému rozšíření a využití hojně šlechtěna. Z pohledu šlechtění je dobré znát i botanickou klasifikaci, viz Tabulka 1. Réva vinná patří do čeledi *Vitaceae* Juss. a rodu *Vitis* L., který se dále dělí na dva podrody *Euvitis* a *Muscadinia*, z nichž vychází nadále vznikající odrůdy [1][2].

Tabulka 1: Botanická klasifikace *Vitis vinifera* [1]

Říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	révnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád	révotvaré (<i>Vitales</i>)
Čeleď	révovité (<i>Vitaceae</i>)
Rod	réva (<i>Vitis</i>)

Podle situační a výhledové zprávy pro révu vinnou a víno, kterou vydalo Ministerstvo zemědělství v květnu 2023, byla v České republice v roce 2022 réva vinná pěstovaná na ploše cca 17 885 ha. Tato pěstitelská plocha je rozdělena do dvou vinařských oblastí: Čechy (697 ha) a Morava (17 188 ha). Celkem je ve Státní odrůdové knize zapsáno 77 odrůd, z toho 61 moštových odrůd, určených pro výrobu vína. Bílé moštové odrůdy zaujímají 73 % rozlohy vinic, modré moštové odrůdy pak 27 % a necelé 0,5 % tvoří stolní a podnožové odrůdy. K nejhojněji pěstovaným patřilo např. Veltlínské zelené (1 533 ha), Ryzlink rýnský (1 341 ha) a Müller Thurgau (1 329 ha) [3].

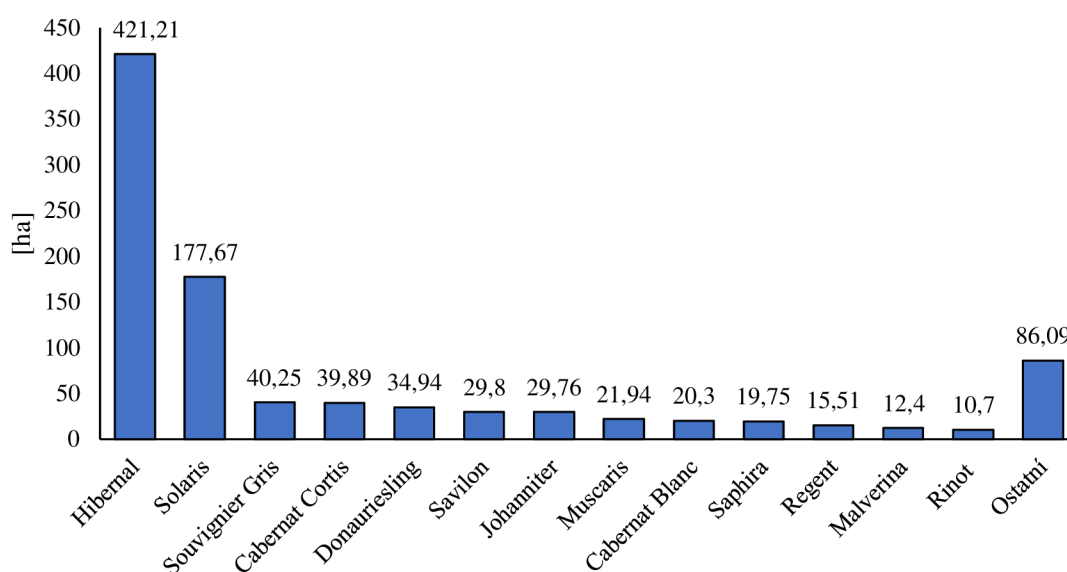


Graf 1: Struktura ploch vinic v ČR k 31.12. 2023 (v ha) [3]

2.2. PIWI odrůdy

V současnosti patří mezi velmi populární tzv. PIWI odrůdy. Termín "PIWI" pochází z německého "Pilzwiderstandsfähig", což v překladu znamená "odolný vůči houbám". Tyto specifické odrůdy révy vinné jsou vyšlechtěné speciálně pro svou odolnost vůči houbovým chorobám, jako je plíseň révová a padlí, botrytida a další běžné choroby vinic. Tyto odrůdy si v posledních letech získaly pozornost zejména díky rostoucí poptávce po udržitelných a ekologicky šetrných vinařských postupech, a také díky snaze omezit použití chemických fungicidů ve vinicích [4].

Od roku 2005 se ploch osázená těmito odrůdami zvětšila zhruba 32krát z 29,5 ha na celkových 960,2 ha. Z této skupiny je v ČR nejvíce zastoupen Hibernál, pěstovaný na půdě o rozloze 421 ha. Na druhém místě je odrůda Solaris s plochou 177,67 ha [3].



Graf 2: Zastoupení PIWI odrůd podle osázené plochy [3]

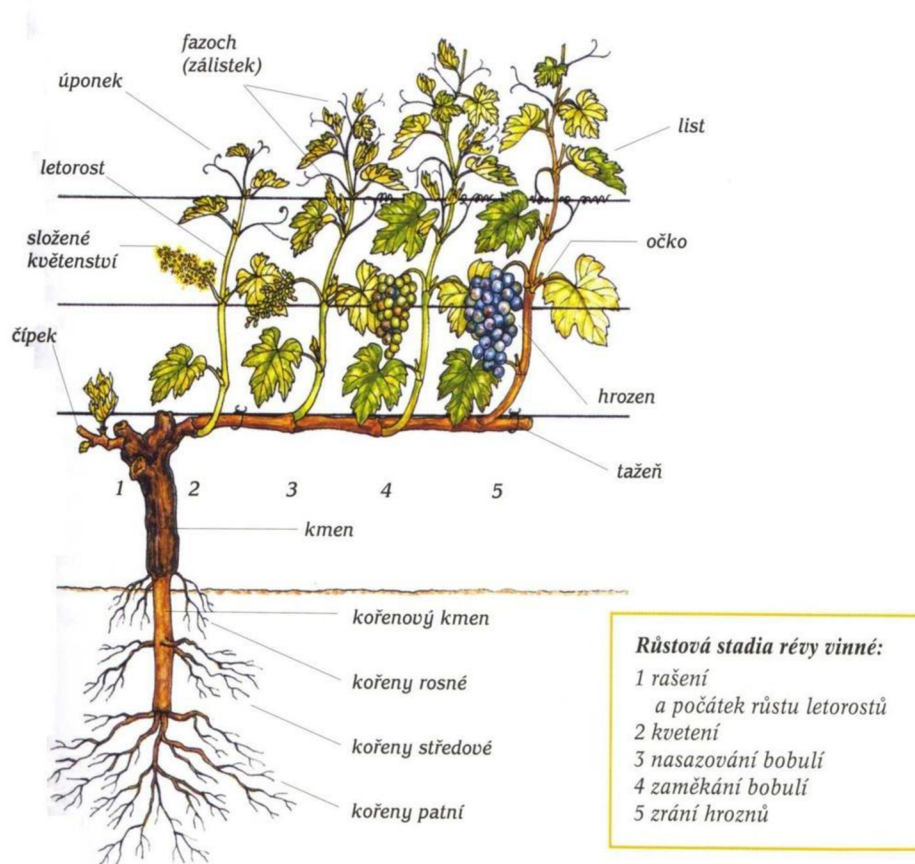
2.3. Morfologie a fyziologie *Vitis vinifera*

Podstatou moderního vinohradnictví je znalost morfologické stavby, fyziologie révového keře a biochemických pochodů probíhajících v hroznech. Tyto znalosti lze následně přenést do praxe a na jejich základě uplatňovat konkrétní agrotechnické zásahy. Rostlinu keře révy vinné je možné rozdělit na část *podzemní* (kořenový systém) a *nadzemní* (dřevnaté a zelené části keře) [5].

2.3.1. Rostlina

Kořenový systém zajišťuje životně důležité funkce jako je upevnění keře v půdě, tvorba rostlinných hormonů, ukládání sacharidů a jiných zásobních látek. Především je skrze kořeny přijímána voda i živiny z půdy. V pěstitelské praxi je réva rozmnožována především vegetativním způsobem, a to převážně roubováním. Kořenový systém takto rozmnožené rostliny vytváří tři typy kořenů (hlavní, vedlejší, povrchové). Hlavní kořeny dorůstají délky až několika metrů. Slouží k ukotvení rostliny v půdě a slouží k příjmu vody ze spodních vrstev půdy. Vedlejší kořeny zajišťují příjem vody a živin, a tím výrazně ovlivňují kvalitu růstu

a vývoje celého révového keře. Oproti tomu povrchové kořeny, také známé jako rosné, rostou těsně pod povrchem půdy a je nutné je pravidelně odstraňovat, aby nedocházelo pouze k povrchovému zakořenění rostliny, a tím se eliminovalo riziko nesprávného vývoje a růstu [5].

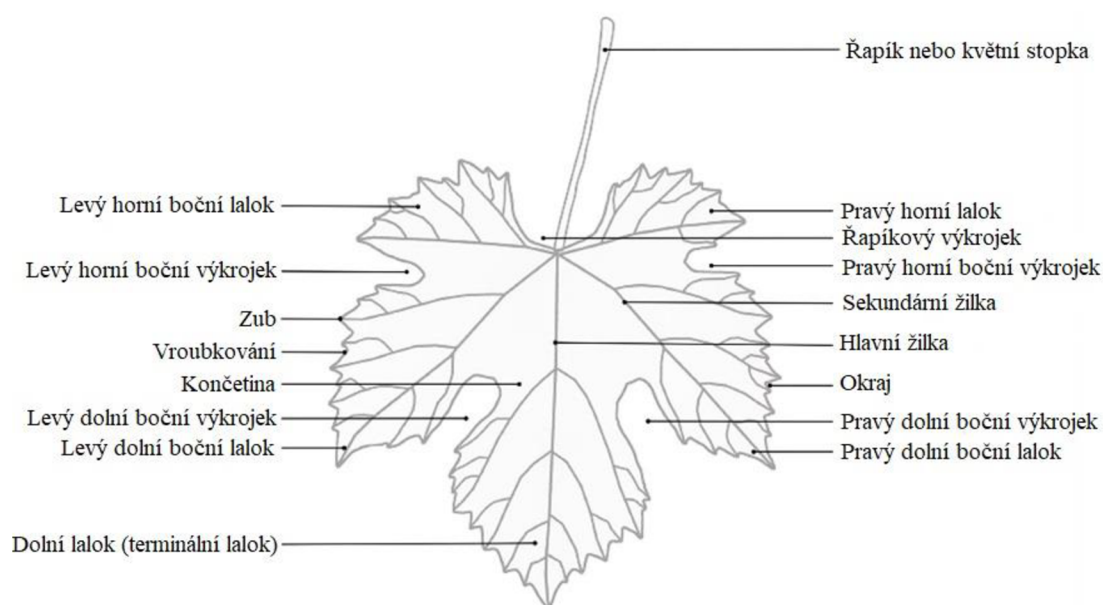


Obrázek 1: Stavba a růstové fáze keře révy vinné [6]

Dřevnaté části vytváří spojení mezi kořenovým systémem a nadzemními částmi keře. Dřevo obsahuje vodivá pletiva, které umožňují rozvádění živin ve směru od kořenů vzhůru, ale i přesun asimilátů, které vznikají v listech. Podobně jako v kořenech se i v dřevnatých částech ukládají zásobní látky, které se využívají v zimních stresových obdobích nebo mezi rašením a kvetením. Na podzemní část navazuje staré dřevo nejčastěji ve formě kmínku. Plodící částí rostliny je jednoleté dřevo, jinak známé i jako plodné dřevo. Spojnici mezi těmito celky tvoří tzv. dvouleté dřevo. Z jednoletého dřeva v místě zimních oček vyrůstají letorosty, které v pozdějších obdobích nesou hrozny [5][7].

Na dřevu révy vinné se rozlišují *pupeny (očka)* trojího typu: zimní, spící a zálistková. Vzhledem k tomu, že zimní pupeny obsahují základ pro květenství i listy, mají největší význam pro růst a plodnost keře. Vznikají během vegetačního období na jednoletém dřevě a skládají se ze tří částí (hlavní a dvou vedlejších). Nejvíce senzitivní k nízkým teplotám je hlavní část očka, která obsahuje největší násadu pro květenství a z níž se vyvíjí hlavní letorost. Celkem mohou z jednoho zimního pupenu vzniknout tři letorosty. Neaktivní zárodky vedlejších částí mohou přecházet na spící pupeny, které mohou rašit až v průběhu několika dalších let. Zálistkové pupeny se tvoří v období intenzivního růstu v úžlabí listů a v průběhu vegetace z nich vznikají zálistky [7][8].

Po kořenovém systému druhým nejdůležitějším orgánem pro výživu révy vinné jsou *listy*, v nichž probíhá fotosyntéza. Prostřednictvím fotosyntézy tedy rostlina vytváří látky dále použité pro růst a vývoj. Neméně důležitými funkcemi listů je i dýchání a transpirace. Listy rostou ve dvou svislých řadách podél výhonků letorostů. Dospělé listy, v porovnání s ostatními orgány, nesou nejvíce deskriptivních znaků pro fenotypizaci, kterou se zabývá vědní obor ampelografie. Dle kultivaru jsou listy celistvé, nebo mohou mít 3, 5, 7 či 9 laloků. Listová čepel je protkaná sítí cévních svazků (žilnatina), obvykle s 5 hlavními žilkami, a její okraje jsou zoubkované. Na horní straně čepel je epidermis na povrchu pokryta voskovitou kutikulou. Pod nimi se nachází fotosyntetizující, na chlorofyl bohatá, vrstva palisádového parenchymu. Dalších několik vrstev tvoří houbovitý parenchym, který zprostředkovává výměnu plynů a vody. Ve spodní straně čepel se na rozdíl od té horní vyskytují průduchy a listové trichomy, důležité pro transpiraci. Podrobnější morfologie listu je zobrazen na Obrázku 2 [5][9].



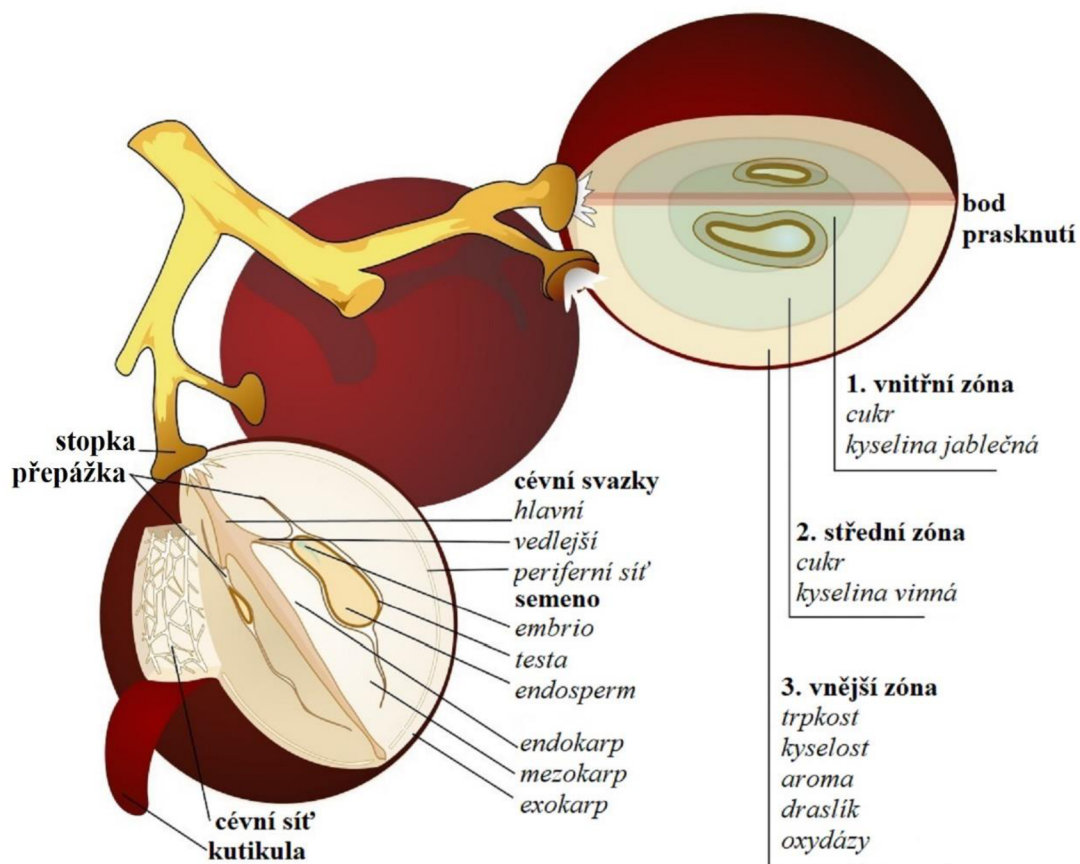
Obrázek 2: List révy vinné podle Mazadeho [10]

Vitis vinifera má květenství typu lata se samosprašnými, oboupohlavními květy, které tedy obsahují současně samičí (pestíkový) i samčí (tyčinkový) květ. Pouze ze 20–50 % květů se v konečné důsledku vyvine bobule, přičemž jedno květenství se skládá cca ze 100–300 květů. Teplotní optimum pro kvetení se pohybuje mezi 20–30°C. Naopak negativní vliv na květ révy vinné má deštivé počasí, při kterém může docházet k infekci šedou hnilobou (*Botrytis cinerea*) nebo smývání pylu. Také extrémně suché a větrné klima zhoršuje opylení, kvůli osychání blizny. Pro révu vinnou je charakteristický atypický způsob otevírání květu, a to odpadnutím části korunky, tj. čepičky, po jejím vyzdvižení tyčinkami a odtržení základu plátků od květního lůžka [5][8].

2.3.2. Hrozen a vývoj bobule

Z květenství jeho oplozením vzniká hrozen. Třápina je kostrou květenství i hroznu a ve fázi sběru tvoří 3–7 % celkové hmotnosti hroznu. Nejdelší větvená část je páteří, na kterou jsou vázána kratší větvení nazývaná stopečky, na jejich koncích jsou bobule. Tvar hroznu je, podobně jako tvar listu, ampelografickým znakem [11].

Z pohledu výroby vína se bobule hroznu skládá ze tří hlavních částí: slupka, dužina a semena, přičemž majoritní část bobule je tvořena dužinou. Semena jsou obklopena oplodím (perikarp), které obsahuje tři druhy pletiv: tzv. exokarp (slupka), mezokarp (dužina) a pletivo obklopující semena neboli endokarp. Samotnou slupku tvoří kutikula, epidermis a hypodermis. Vyznačuje se nižším obsahem cukrů a vyšším obsahem kyselin, neméně důležitý je výskyt sekundárních metabolitů. U odrůd zvaných barvířky jsou antokyanová barviva obsažena rovněž v dužině. Obecně se v dužině nachází cukry (převážně glukóza, fruktóza), kationty draslíku, vápníku, sodíku a zinku, organické i anorganické kyseliny a sekundární metabolity. Mezi odrůdové charakteristiky patří také morfologie semen. Jejich počet a velikost se odvíjejí od mnoha faktorů např. stanoviště a ročníku [5][12].



Obrázek 3: Morfologie bobule révy vinné [5]

Při vývoji se mění vlastnosti bobule, jako je velikost, složení, barva, textura, aromatický i chuťový profil. Vývoj bobule probíhá ve dvou po sobě jdoucích obdobích (období růstu a zrání), které jsou odděleny fází pomalého růstu tzv. „lag fáze“. Celý tento proces lze popsat dvojitě esovitou růstovou křivkou. První růstová fáze trvá cca 60 dní po odkvětu a dochází k tvorbě bobule a semen. Buněčné dělení je v prvních týdnech rychlé, postupem času zpomaluje a na konci první fáze je ustálen finální počet buněk bobule, které se nadále pouze vyvíjí. Na konci „lag fáze“ je krátké období s názvem „veraison“, kdy je zahájeno shromažďování cukru a také antokyanových barviv u červených odrůd. Aromatické sloučeniny a jejich prekurzory jsou syntetizovány koncem poslední vývojové fáze. Období od „veraison“ je dále charakteristické zvýšením množství kyseliny abscisové, jakožto hormonu podporujícího dozrávání bobulí [12][13][14].

2.4. Voda a minerální látky

Voda je neoddelitelnou složkou rostlin a jinak tomu není ani u révy vinné. Takřka 99 % z celkového množství tohoto významného rozpouštědla obsaženého v moštu, je přijímáno skrze kořenový systém. Hromaděním vody v bobulích dochází ke zvětšení jejich objemu. Tento růst je dle některých hypotéz regulován pomocí pozitivního gradientu celkového vodního potenciálu mezi bobulemi a zbylými orgány rostliny. Přičemž tento gradient souvisí s transpirací a osmotickým gradientem. Avšak přezráváním hroznů dochází k úbytku vody odparem či následkem napadení plodu ušlechtilou plísní *Botritis cinerea* [5].

I přes relativně vysoký obsah sacharidů (průměrně 15–18 g na 100 g bobulí), a tedy přibližně 27 kJ na 100 g bobulí, jsou hrozny z nutričního hlediska dobrým zdrojem např. manganu (3 % denní doporučené dávky (RDA)), draslíku (11 % RDA) a vitamínů B₆ (3 % RDA), B₁ (6 % RDA) a C (3 % RDA). Zastoupení a množství minerálních látek je významně ovlivněno půdou, klimatickými podmínkami, výživou keře atd. Celkově ovlivňují fyziologické děje, kvalitativní a organoleptické vlastnosti moštu a vína. Nejvýznamnější makroprvky a některé mikroprvky (K, P, S, Mg, B, Fe, Cu...) se akumulují postupně v průběhu vývoje, nejintenzivněji pak při zaměkání bobulí. Jedněmi z nejprozkoumanějších jsou draselné kationty, které se v hroznech nachází nejhojněji. Hrají důležitou roli v procesu regulace membránového potenciálu buněk, regulace pH. Také ovlivňují aktivitu některých enzymů, programovanou buněčnou smrt a stárnutí atd. Bobule mohou při sklizňové zralosti obsahovat přes 5 mg draselných iontů na 100 g bobulí a 60 % z toho je uloženo v mezokarpu, zbytek je rozdělen mezi exokarp a semena [5][15][16].

2.5. Primární metabolity hroznů

Sacharidy jsou primární metabolity, přičemž zastoupení jednotlivých cukrů je dáno genotypem, zatímco koncentrace se mění vývojem, působením prostředí a vinařských postupů. Například Shirashi a kol. [17] v roce 2010 analyzovali složení bobulí stolních hroznů různých kultivarů z Evropy, Severní Ameriky a Japonska se zastoupením vzorků: 57 *Vitis vinifera* a 72 *V. labruscana* × *V. hybridy vinifera*. Na základě poměru glukóza/ (fruktóza + sacharóza) identifikovali dva typy hroznů: akumulující hexózy v poměru > 0,8 a akumulující sacharózu, u nichž byl daný poměr < 0,8. Kultivary *Vitis vinifera* akumulují pouze stopová množství sacharózy a v době zralosti je poměr mezi glukózou a fruktózou přibližně roven 1. Syntéza cukrů je neodmyslitelně spjata s průběhem fotosyntézy, jakožto základním fyziologickým dějem. Jsou tvořeny v listech a následně jsou transportovány do bobulí. V hroznech jsou přítomny kromě glukózy, fruktózy a sacharózy i rafinóza, maltóza, galaktóza, arabinóza a xylóza. Jejich množství v bobulích hroznů je však velmi nízké [12][18].

Důležitým kvalitativním znakem při sklizni je *acidita* bobulí. Ta je závislá na poměru koncentrací *organických kyselin* ve formě volné a ve formě jejich draselných solí, který se v průběhu zrání zvyšuje. Kyseliny vinná a jablečná tvoří 70–90 % celkového obsahu organických kyselin v bobulích. Po „verasion“ začíná obsah organických kyselin klesat. Výjimkou je kyselina vinná, jejíž hladina zůstává po celou dobu procesu zrání přibližně stejná. Pokles množství kyseliny jablečné je zapříčiněn převážně její mitochondriální oxidací. Ve zralých bobulích bylo popsáno rozmezí koncentrací vinnanů mezi 4,0–9,4 g·l⁻¹, z toho 5–40 % tvoří kyselina vinná. Koncentrace jablečnanů se pohybuje obvykle mezi hodnotami 1,5–

6,8 g·l⁻¹, přičemž 30–70% část je tvořena kyselinou jablečnou. V malých koncentracích bylo v moštu identifikováno na 18 kyselin, např. kyselina citronová, askorbová, galakturonová, pyrohroznová a oxoglutarová. Mezi faktory, které ovlivňují obsah a spektrum kyselin, patří především klimatické podmínky prostředí [11][19].

2.6. Sekundární metabolity hroznů

Sekundární metabolity jsou sloučeniny produkované rostlinami, které se přímo nepodílejí na růstu, vývoji nebo reprodukci, ale hrají důležitou roli v obranných mechanismech, interakcích s životním prostředím. Hrozny révy vinné jsou bohatým zdrojem sekundárních metabolitů, z nichž mnohé přispívají k chuti, barvě a zdravotním účinkům vína.

Těkavé organické sloučeniny přispívající ke kvalitě vína jsou produkovány nejen při procesu fermentace či během zrání vína, velká část je přítomna už v samotných hroznech a kvašením prochází nezměněna nebo jen s drobnými změnami. Tyto látky vytvářející typické odrůdové aroma jsou obecně přítomny v moštích a vínech mnoha odrůd. Charakteristické aroma jednotlivých odrůd tedy není tvořeno přítomností jedné nebo několika vybraných látek, ale jejich kombinací. Bobule hroznů postrádají ve své anatomii struktury pro uskladnění lipofilních těkavých organických látek, a ty jsou proto skladovány jako ve vodě rozpustné glykosidy nebo konjugáty s aminokyselinami (např. s cysteinem). Nejdůležitějšími skupinami aromatických a chuťových sloučenin jsou organické kyseliny, proantokyanidiny (taniny), terpenoidy (monoterpenoidy, seskviterpenoidy a C₁₃ norisoprenoidy) a různé prekurzory aromatických aldehydů, esterů a thiolů. Skupiny těkavých látek jsou blíže charakterizovány v Tabulce 2 [20][21][22].

Tabulka 2: Charakteristika chemických tříd těkavých sloučenin ve vínech podle Carmen González-Barreiro a kol. [21]

Nestálé třídy	Podtypy	Nuance původu a vůně
Pyraziny		<ul style="list-style-type: none"> • Z hroznů • Rostlinný charakter – paprika, chilli, fazole, mrkev, brambory, arašidy, pečený ječmen
Terpeny vznikají z izoprenových jednotek – monoterpeny (C ₁₀) a vyšší terpeny (>C ₁₀)	Monoterpeny: uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, estery: volné nebo vázané (jako glykosidy)	<ul style="list-style-type: none"> • Obecně pocházejí z hroznů • Mohou být produkovány některými kvasinkami a plísněmi (ale ne <i>Saccharomyces</i>) • Sensoricky lze detekovat pouze volné terpeny • Ovocné/květinové aroma
	Vyšší terpeny (včetně derivátů naftalenu)	<ul style="list-style-type: none"> • Pocházejí z rostlin • Ovocné a palivové znaky
Deriváty kyseliny šikimové		<ul style="list-style-type: none"> • Syntetizují se metabolismem aromatických aminokyselin • Pochází z rostlin, mikrobusů a dubových sudů

Tabulka 2–pokračování: Charakteristika chemických tříd těkavých sloučenin ve vinech podle Carmen González-Barreiro a kol. [21]

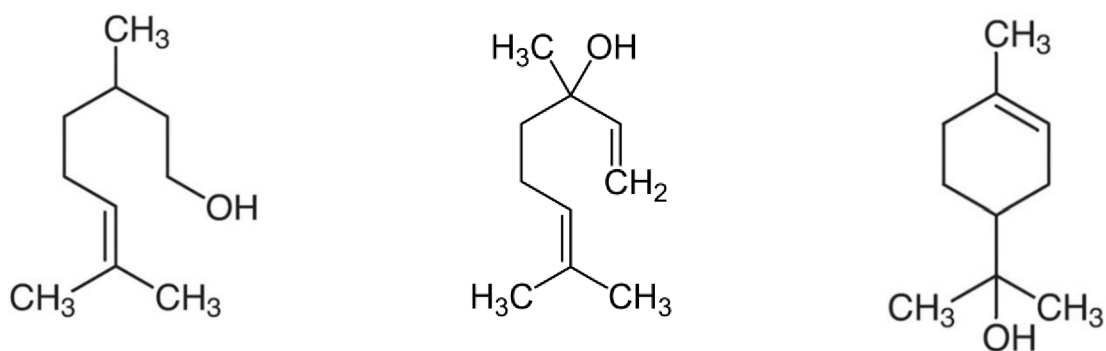
Nestálé třídy	Podtypy	Nuance původu a vůně
Laktony	5- nebo 6- členné cyklické sloučeniny obsahující kyslík	<ul style="list-style-type: none"> • Pocházejí z hroznů, mikrobů a dubových sudů • Typický charakter: cukrová vata, sladkosti, ovoce, kokos, máslo
Estery	Alkohol: ethanol nebo alkohol z degradace aminokyselin, purinu a pyrimidinu Kyselina: kyselina octová nebo kyselina z degradace aminokyselin nebo biosyntézy mastných kyselin	<ul style="list-style-type: none"> • Krátký řetězec: ovocný, květinový • Dlouhý řetězec: parfém, mýdlo • Nižší koncentrace: ovocný, květinový • Vyšší koncentrace: parfém • Příklady: ethylacetát (odlakovač), ethyl laurát (mýdlo), isoamyl acetát (banán), fenethyl-acetát (růžový olej)
Vyšší alkoholy	Vzniklé degradací aminokyselin nebo biosyntézami	<ul style="list-style-type: none"> • Původcem jsou většinou mikroorganismy nebo rostliny
Kyseliny		<ul style="list-style-type: none"> • Z rostliny nebo mikrobů • Kyselost • Charakteristické aroma: žluklé (kyselina máselná) nebo štiplavé (kyselina octová)
Fenolické sloučeniny	Flavonoidy a neflavonoidy	<ul style="list-style-type: none"> • Rostlinného původu • Mohou být mikroby přeměněny na vinylfenoly (kaz vína) • Hořkost, svíravost
Sloučeniny obsahující síru	Sulfidy	<ul style="list-style-type: none"> • Sirovodík (shnilé vejce), dimethylsulfid (zelí, konzervovaná kukuřice) dimethyldisulfid (škeble)
	Thioly	<ul style="list-style-type: none"> • Methanthiol (kaučuk), ethanthiol (cibule, kaučuk, skunk)
	Sulfoxidy	<ul style="list-style-type: none"> • Dimethylsulfoxid (plast, pryžová hadice)
	Thio alkoholy	<ul style="list-style-type: none"> • Merkptoethanol (stáj) thiomethylbutanol (česnek, pažitka) methionol (syrové brambory, sója)

2.6.1. Terpeny

Terpenoidy a *isoprenoidy* tvoří velkou třídu rostlinných produktů. Patří do ní nejméně 40 000 různých sloučenin s různým typem struktury (např. monoterpeny, diterpeny...). Obecně základ molekuly tvoří uhlíkový skelet s rozvětveným řetězcem a jednou či více funkčními skupinami. Terpenoidy se odvozují z kondenzace dvou pětiuhlíkatých jednotek, isopentenyl-difosfátu (IPP) a dimethyldifosfátu (DMAPP), přičemž existují dva různé způsoby vzniku těchto prekurzorů (dráha methylerythritol-4- fosfátu nebo cestou kyseliny mevalonové [23]).

V rostlinách jsou součástí fytohormonů a fotosyntetických pigmentů a stabilizují strukturní složky membrán. Jakožto sekundární metabolity hrají velkou roli ve fyziologickém systému rostlin a podílejí se na obraně před býložravci, patogeny i biotickými a abiotickými stresory. Zároveň díky svým ovocným a květovým vůním lákají opylovače, a druhy živící se semeny, čímž zlepšují schopnost přežití druhu [23].

Terpeny jakožto odrůdové sloučeniny byly a jsou v hroznech *Vitis vinifera* rozsáhle studovány. Bylo identifikováno na 40 terpenů, které se mohou vyskytovat jako uhlovodíky, alkoholy, ketony či estery a mají vzájemně synergický účinek. Tato skupina látek se výrazně podílí na ovocné (citrusové) a květinové vůni. Řada z nich má však spíše zápach podobný pryskyřici např. α -terpinen, p-cimen, myrcen a farnesol. K látkám nejvíce vonícím patří monoterpenové alkoholy, zejména linalool, α -terpineol, nerol, geraniol, citronellol a hotrienol. Struktury vybraných terpenů jsou zobrazeny na Obrázku 4. Množství i složení těchto sloučenin se liší v různých částech hroznu. Vyšší koncentrace, např. geraniol a nerol, se nachází ve slupce než v dužině a šťávě. Monoterpeny jsou přítomny jak v hroznech, tak ve vínech, avšak převládají zejména v odrůdách Muškátu a Ryzlinku rýnského [20][21].



Obrázek 4: Strukturální vzorce terpenů, v pořadí zleva: citronellol, α -terpineol, linalool

Terpenové glykosidy se vyskytují v hroznech častěji než volné terpeny, relativní poměr těchto dvou forem závisí na odrůdě. Aromatické odrůdy (např. muškátové) mají nejvyšší koncentrace terpenových glykosidů, které jsou při výrobě vína, během fermentace hydrolyzovány na volné těžké terpeny za pomoci kvasinkových glykosidáz a za podmínky kyselé fermentace (pH – 3,5) [21].

C13-Norisoprenoidy jsou odvozeny z karotenoidů a jsou přítomny pouze ve stopových množstvích. I přes jejich velmi malý obsah v hroznech, tato různorodá skupina aromatických

látek má velmi nízký senzorický práh (např. 700 ng·l⁻¹ pro β-ionon a 200 ng·l⁻¹ pro β-damascenon), a tím přispívají k aromatickému potenciálu mnoha odrůd (Sauvignon Blanc, Chardonnay). Podobně jako monoterpeny mohou být přítomny jako netěkavé glykosidy, které hydrolyzují v průběhu fermentace a skladování. Chemicky norisoprenoidy tvoří dvě formy: megastigmany (β-damascenon, β-ionon, 3-oxo-α-ionol, β-damaskon a 3-hydroxy-β-damaskon...) a nemegastigmany, kam patří TDN (1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen) s charakteristickým zápachem po petroleji, TPB ((E)-1-(2,3,6-trimethylfenyl)buta-1,3-dien) s aroma zelené či posekané trávy, aktinidioly a vitispiran, které svou vůní připomínají kafr [21].

2.6.2. Methoxypyraziny

Jedná se o 3-alkyl-2-methoxypyraziny, které hrají důležitou roli v aroma odrůd *Vitis vinifera*. Strukturně jsou to dusíkaté heterocyklické produkty vycházející z metabolismu aminokyselin. Výchozí aminokyselinou pro biosyntézu je leucin, který je nejprve převeden na leucinamid. Amid reaguje s 1,2-dikarbonylovou sloučeninou, přičemž vzniká pyrazinová forma. Ta je v posledním kroku metylována na methoxypyrazin [11].

Mezi nejvýznamnější sloučeniny této kategorie, z hlediska jejich potenciálního vlivu na chuť vína, patří 3-isobutyl-2-methoxypyrazin (IBMP), 3-secbutyl-2-methoxypyrazin (SBMP) a 3-isopropyl-2-methoxypyrazin (IPMP). Obsah methoxypyrazinů (MP) se v raném vývojovém stádiu hroznů zvyšuje a v průběhu dozrávání opět snižuje, přičemž byla zjištěna dobrá korelace mezi rozkladem kyseliny jablečné a IBMP. Tento jev podporuje expozice světla, které působí dvěma protichůdnými účinky: v nezralých hroznech podporuje biologickou syntézu MP a ve zralých hroznech naopak indukuje jejich fotorozklad [21][24].

2.6.3. Thiolové sloučeniny

Některé thiolové sloučeniny přispívají k buketu bílých i červených vín. Mezi tyto látky patří např. 4-methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on (4MSP), 4-methyl-4-sulfanyl-pentan-2-ol (4MSPOH), 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) a 3-sulfanylhexylacetát (3SHA). Zejména 4MSP, 3SM a 3SHA byly identifikovány ve vínech odrůd Ryzlink, Petit Arvine, Merlot, Cabernet Sauvignon a jsou významné pro jejich odrůdové atributy. V hroznech *V. vinifera* se však nachází pouze ve formě svých cysteinylových a glutathionylových prekurzorů bez zápachu [25].

Mechanismus biosyntézy S-cysteinu a S-glutathionu v révě není dosud zcela objasněn. Vybrané konjugáty S-cysteinu mohou vznikat rozkladem konjugátů S-glutathionu, účastnících se detoxikačního systému rostlin. U odrůdy Sauvignon Blanc byl prokázán vyšší obsah v buňkách slupky hroznů, které mají velké vakuoly. V moštu je obsaženo jen několik miligramů na litr prekurzorů, ačkoliv koncentrace vyšší než 100 μg·l⁻¹ byly zjištěny u konjugátů Cys-3SH a Glu-3SH. Výše uvedené senzoricky aktivní sloučeniny vznikají z konjugátů působením kvasinkové β-lyázy v procesu fermentace. Jejich množství ve výsledném víně pak závisí na obsahu prekurzorů v hroznech, ale také na kmeni použitých kvasinek [25].

2.6.4. Fenolické sloučeniny

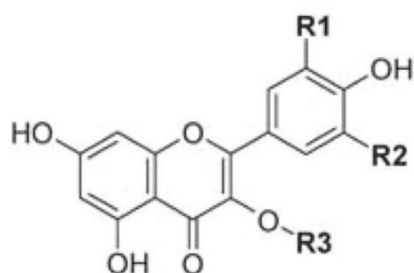
Množství fenolických látek se může výrazně lišit mezi různými odrůdami, ale i v jednotlivých částech hroznů. Tyto látky se výrazně podílí na barvě a chuťovém profilu bobulí a vína z nich vyrobeného. Zajímavé jsou také jejich antioxidační vlastnosti. Podle rozdílů v uhlíkatém

skeletu lze tuto skupinu rozdělit do dvou kategorií na *flavonoidy* a *neflavonoidy*. Přehled fenolických látek a rozsah jejich zastoupení podle Flanzy je uveden v Tabulce 4 [26][27].

Tabulka 3: Přehled fenolických látek v hroznech dle Flanzy [26]

Flavonoidy	
Antokyany	Slupka: 0,5–4,0 g na kg hroznu
Taniny – flavanoly (katechiny a proantokyanidiny)	Semena: 1–8 g na kg hroznu Dužiny: 1–80 mg na kg hroznu Slupka: 0,3–3 g na kg hroznu Třápina: 0,03–0,4 g na kg hroznu
Flavonoly	Slupka: 10–100 mg na kg hroznu
Flavanonoly	Slupka: 0–10 mg na kg hroznu Třápina: 0–35 mg na kg hroznu
Neflavonoidy	
Stilbeny	Slupka: 0–20 mg na kg hroznu Semena: 0–35 mg na kg hroznu
Hydroxyskořicové kyseliny	Slupka: 60–800 mg na kg hroznu

Základní strukturu *flavonoidů* tvoří difenylpropanový skelet (C6–C3–C6). Dle modifikací na centrálním uhlíkovém kruhu můžeme tuto skupinu dále rozdělit do tříd na flavonoly (viz Obrázek 5), flavony (např. apigenin), flavan-3-oly (např. (+)-katechin, (-)-epikatechin), flavanony (např. taxifolin) a antokyanidiny (kyanidin a malvidin). Skupina neflavonoidů zahrnuje třídy: C6-C1 fenolové kyseliny (např. kys. gallová), C6-C3 hydroxyskořicové kyseliny (kávová a *p*-kumarová kyselina) a jejich konjugáty a polyfenolické C6-C2-C6 stilbeny (např. *trans*-resveratrol). Celkový profil fenolických látek v hroznech je ovlivňován odrůdou, výnosností rostliny a dalšími vnějšími vlivy [27].

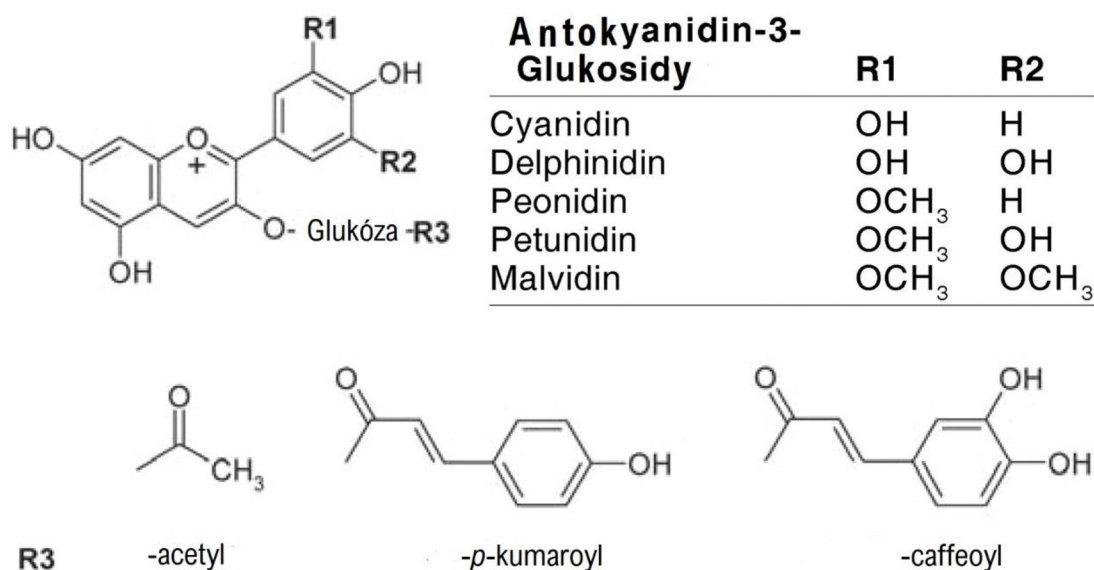


Flavonoly	R1	R2	R3
Kaempferol	H	H	H
Kvercetin	OH	H	H
Myricetin	OH	OH	H
Isorhamnetin	OCH ₃	H	H

Obrázek 5: Struktura flavonolů (V hroznech jako glykosidy, kde R3 je glukóza, galaktóza nebo kyselina glukuronová)[28]

Antokyany jsou sloučeniny odpovědné za barvu hroznů a potažmo i vína. Jejich obsah se používá jako tzv. otisk prstu pro charakterizaci jednotlivých kultivarů, které se mohou v množství antokyanů lišit. Ve *Vitis vinifera* se vyskytují 3-monoglukosidy těchto pěti antokyanidinů: delphinifin, kyanidin, petunidin, peonidin a malvidin. Základní struktury monoglukosidů jsou zobrazeny na Obrázku 6. U velkého množství kultivarů *Vitis vinifera* jsou dominantními antokyany deriváty malvidinu. Většina antokyanů se neslučuje s organickými

kyselinami, výjimku tvoří například *p*-kumaroylové deriváty. Akumulují se téměř výhradně ve slupce, u vybraných kultivarů se mohou vyskytovat i v dalších pletivech např. v dužině či stonku [12].



Obrázek 6: Antokyany obsažené v hroznech [28]

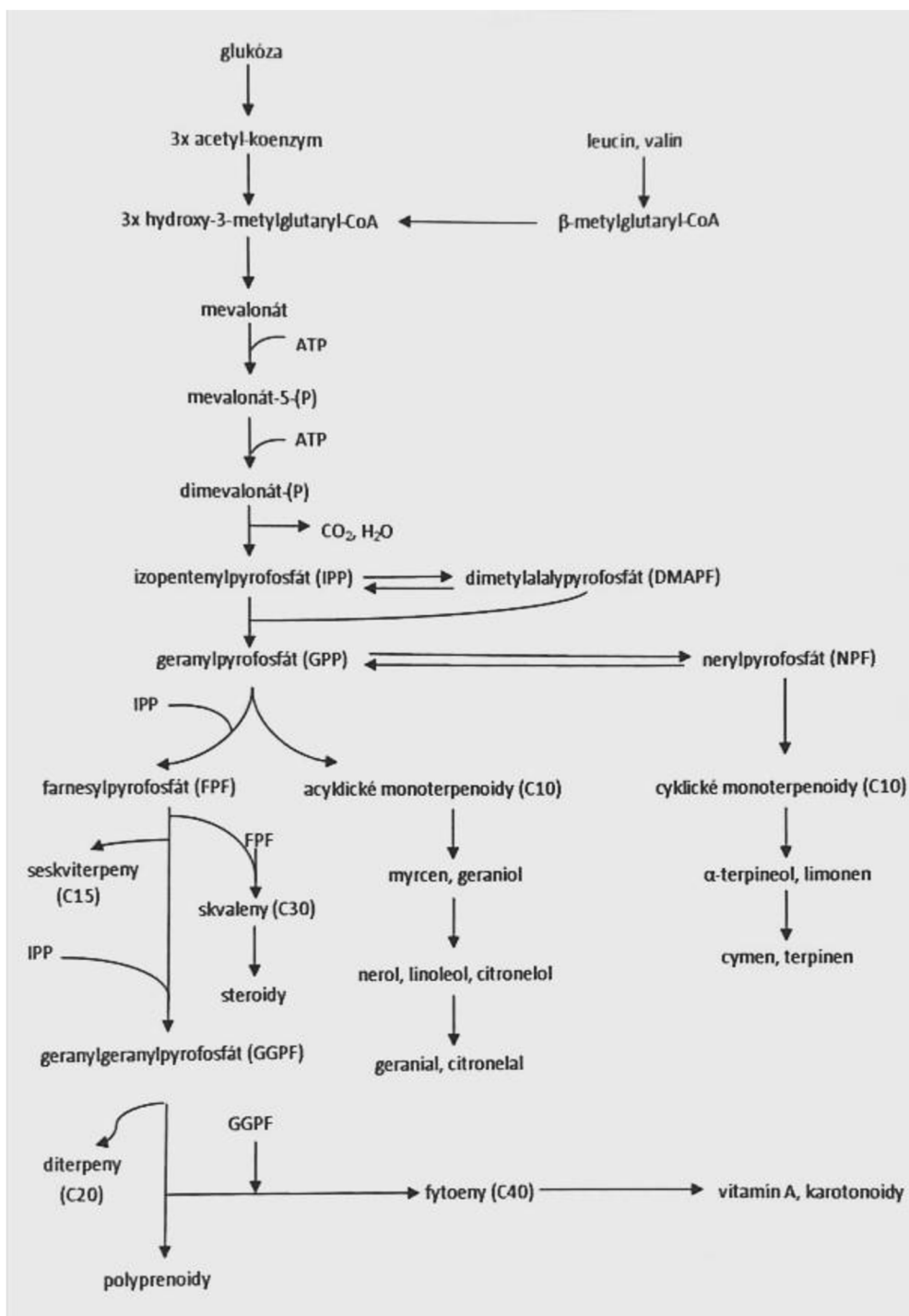
Biosyntéza většiny *kondenzovaných taninů*, a také hydroxyskořicových kyselin, flavonů, flavonolů a antokyanů, probíhá pomocí fenylypropanoidní dráhy. Obecně jsou taniny obsaženy ve stoncích, slupkách, dužině i semenech, ale jejich koncentrace může být odlišná v jednotlivých částech, a také v jednotlivých odrůdách. Například kondenzované taniny slupky představují cca 3–100 mg na g sušiny bobulí a skládají se z velké části z (-)-epikatechinu, dále (-)-epigalokatechinu, (-)-epikatechin-3-O-galátu a (+)-katechinu. Kondenzované taniny a jejich meziprodukty proantokynidiny jsou oligomery a polymery flavan-3-olu. Monomerní jednotky flavan-3-olů se běžně nazývají katechiny [29][30].

Skupina *hydrolyzovaných taninů* se dělí na gallotaniny a ellagitaniny, podle kyseliny gallové a ellagové získané po hydrolyze. Základem bývá nejčastěji molekula glukózy, méně často pak kyseliny šikimová či chinoová, které jsou esterifikovány až pěti jednotkami kyseliny gallové. Ty se mohou vzájemně vázat, čímž vzniknou jednotky kyseliny haxehydroxydifenové. Případně může kyselá část kys. gallové hydrolyzovat za vzniku jednotky kyseliny ellagové a mohou se tedy vytvářet ellagitaniny, které se běžně nachází v ovoci, semenech, dubovém dřevě, kde se nejhojněji vyskytují látky castalagin a vescalagin [29][30].

Nejhojnější třídou *ne-flavonoidů* jsou *hydroxyskořicové kyseliny*, které se v hroznech nachází společně s taniny a antokyany v hypodermálních buňkách a současně i dužině boule. Téměř výhradně se nachází ve formě *trans* izomerů, jejich *cis* forma se objevuje pouze minoritně. V reakci na napadení houbami nebo při expozici vysokým hladinám UV záření jsou v malém množství produkovány i *stilbeny* a jim příbuzné *viniferiny* [28].

2.6.4.1. Biosyntéza terpenoidů a fenolických látek

Všechny rostlinné fenoly mají počátek svého původu v kyselině šikimové, které vychází z meziprojektu pentózového cyklu (erytróza-4-fosfátu) a fosfoenolpyruvátu z glykolýzy. Pro vznik aromatického kruhu je důležitá kyselina chorismová, ze které se postupně vytváří L-fenylalanin. Ten je za pomoci enzymu fenylalanindeaminázy transformován na kys. skořicovou a následně kumarovou. Claisenovou kondenzací 4-kumaroyl-CoA a tří molekul malonyl-CoA vzniká další fenolový kruh. Působením dalších enzymů vzniká chalkonová struktura, ta se mění dále na flavanon-3-oly odvozené od naringeninu, které jsou prekurzory antokyanidinů [31].



Obrázek 7: Dráha syntézy terpenoidů [11]

V první fázi syntézy terpenoidních látek je prostřednictvím izoprenoidní dráhy z glukózy, či aminokyselin valinu a leucinu, vytvořena základní izoprenoidní jednotka izopentenylpyrofosfátu (IPP). Pomocí izomerázy je IPP přeměněn na dimethylallyl- pyrofosfát (DMAPF). Anteroposteriorní kondenzací IPP a DMAPF vzniká desetiuhlíkatý geranylpyrofosfát (GPP), ze kterého několika různými cestami vznikají acyklické a cyklické monoterpeny nebo kondenzovanější terpeny. Celá dráha biosyntézy je schematicky znázorněna na Obrázku 7 [11].

2.6.5. Alkoholy a aldehydy

Aromatické alkoholy vznikají během zrání a vykazují odrůdovou specifitu. Charakteristické je pro ně tzv. „zelené“ aroma, připomínající čerstvě posekanou travu. Alkoholy a aldehydy ve vínech vznikají především při kvašení, proto je jejich obsah v čerstvých bobulích malý. Alkoholy jsou charakteristické pro pozdní fáze vývoje bobulí, přičemž dominují alifatické šestiuhlíkaté molekuly, které, a stejně jako aldehydy, navazují na lipogenoxygenázovou dráhu. Z řady aldehydů se jedná především o hexanal a *E*-2-hexenal a z řady alkoholů konkrétně o 1-hexanol, *Z*-3-hexenol a *E*-2-hexenol [32][33][34].

2.7. Vnější faktory ovlivňující obsah těkavých látek

Kvalitu hroznového aroma ovlivňuje mnoho vnějších faktorů, jako např. agronomické techniky, půda, sluneční svit, počasí, vodní stres atd. Podrobněji budou tyto a další faktory rozebrány v následujících kapitolách [35].

2.7.1. Vliv místa

Francouzský termín terroir v sobě zahrnuje topografické, agropedologické i klimatické podmínky prostředí. Porozumění terroiru a jeho vlivům napomáhá vinařům k produkci kvalitnějších hroznů a též k racionálnímu rozšiřování vinařských oblastí.

Při pěstování na půdách, které mají dostatečný obsah živin, dochází k omezení vegetačního růstu, naopak využití metabolitů fotosyntézy ke zrání plodů, což podporuje tvorbu chuťových sloučenin. Půdy s malým množstvím živin bývají obvykle více porézní, proto může nastávat období slabého vodního deficitu, které může ovlivnit mikroklima v okolí révy. Následkem dobré drenáže také může dojít k urychlení počátku jarního růstu, omezení praskání plodů při vydatných deštích, potažmo zlepšení odolnosti vůči plísňovým a bakteriálním infekcím. Obecně je známo, že jílové a vápencové půdy lépe zadržují vodu, což může u některých odrůd (např. Merlot a Cabernet Sauvignon) vést k vyšším koncentracím methoxypyrazinů ve výsledných vínech. Coelho a kol. ve své studii [36] uvádí, že koncentrace odrůdově typických sloučenin (monoterpenů, seskviterpenů a norisoprenoidů C13) ve vínech, produkovaných na vápenaté jílové půdě, byla až dvakrát vyšší než u vín pěstovaných na jílových nebo písčitých půdách [20][21].

Složení půdy je, společně se sezónním počasím, jeden z nejdůležitějších faktorů. Celkově chladnější klimatické podmínky pozitivně působí na rozvoj a udržení typického hroznového aroma a ovocné acidity. Hrozny pěstované na teplejších půdách, kde dozrávají dříve, např. v údolí řeky Rhóny, se vyznačují vysokými koncentracemi β -damascenonu a geraniolu, kdežto hrozny pěstované na chladnějších půdách (dozrávají později) mají podle Sabon a kol. nižší množství β -damascenonu, ale jsou bohatší na β -ionon. S větší nadmořskou výškou stoupá riziko

poškození úrody v důsledku mrazu a kratšího vegetačního období. Je proto vhodné pro výsadbu volit svahy, či místa v blízkosti vodní plochy [37].

2.7.2. Vliv použitých pěstebních postupů

Ve vinohradnictví se používá mnoho postupů a technik, které ovlivňují aromatický profil bobulí např. zpřístupněním hroznu pro dopad slunečního záření atd. Množství působícího záření totiž není závislé pouze na lokalitě vinice, ale i na způsobu jejího vedení, kdy vinař může ovlivnit celkové procento listové plochy, a tím schopnost révy efektivně fotosyntetizovat. Působení přímého slunečního záření může vyvolat stresové stavy, v důsledku zvýšení teploty a dehydratace. Vyvolává však i příznivé zvýšení množství karotenoidů, jakožto prekurzorů C13-norisoprenoidů, současně zvyšuje i hladinu terpenových a fenolových glykosidů. Naopak neprospívá methoxypyrazinům, kvůli jejich citlivosti na světlo [21][35].

Hnojení půdy dusíkem může vést k bujnému růstu révového keře a náchylnosti k napadení rostliny šedou hnilobou. Zvýšený přísun dusíku např. u odrůdy Sauvignon Blanc přispěl k vyššímu obsahu cysteinových prekurzorů v moštu. Dusík lze aplikovat hnojením do půdy, případně postřikem na listy, a to zejména pokud se podává společně se sírou [38][39].

Jedním z nejproblematictějších faktorů vinohradnictví je bezesporu ochrana révy proti houbovým chorobám (např. padlí). V dnešní době již existuje řada nechemických přístupů, které dokáží minimalizovat výskyt těchto chorob. Nadále však nejúčinnějším způsobem prevence zůstává profylaktická aplikace fungicidů, která však s sebou nese některé nežádoucí účinky. Jedním z nich je přetrvávání reziduí fungicidů v hroznové šťávě a vínech. Jedná se pouze o stopová množství i ta však mají jisté toxikologické nebezpečí, a také ovlivňují aroma [40].

2.8. Metody extrakce bioaktivních látek

Vzhledem k zaměření práce jsou v této kapitole stručně popsány různé metody extrakce, použitelné pro získání těkavých látek z vína/hroznů. Jako extrakce se označuje separační technika, která využívá rozdílných fyzikálně-chemických vlastností analytu, jako je těkavost, rozpustnost či schopnost absorpce na konkrétní materiál. Podle toho, kterou z daných vlastností technika využívá, je lze rozdělovat, viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**5 [41].

Extrakce je velmi často nedílnou součástí přípravy vzorku před analýzou. Správná volba postupu přípravy může pozitivně ovlivnit spolehlivost a přesnost analýzy, zejména pokud se vybrané látky nachází ve složitých maticích a v malých koncentracích [41].

Tabulka 4: Rozdělení extrakčních metod dle vlastností analytů [41]

Rozpustnost	kapalina-kapalina (LLE); extrakce na pevné fázi (SPE)...
Těkavost	Destilace; head space (HS)...
Absorpce	Mikroextrakce na pevnou fázi (SPME); dynamická extrakce v pevné fázi (SPDE)...

Obecně široce používanou metodou pro extrakci těkavých sloučenin z hroznů je LLE, umožňující separaci sloučenin s různou polaritou a těkavostí i při malém objemu vzorku. Má však i řadu nevýhod jako je např. nízká reprodukovatelnost a selektivita, ztráta analytů,

velké množství organických rozpouštědel, a s tím spjatá vysoká cena, riziko pro životní prostředí a také pro pracovníky [41].

Při analýze těkavých látek v hroznech se využívá hojně i metoda extrakce na pevnou fázi (SPE), kde dochází k selektivní retenci analytu v adsorpčním materiálu a následně k eluci pomocí rozpouštědla s větší afinitou k analytu než k adsorbentu. Je proto důležité správně zvolit jak stacionární fázi (adsorbent), tak rozpouštědlo, záleží např. na polaritě, pH či jeho průtoku [42].

Další technikou, využívající tavené křemičité vlákno potažené absorpčním polymerem jakožto stacionární fázi, je mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Výhodou je možnost analýzy pevných, kapalných i plynných vzorků. Provádí se přímým ponořením vlákna do kapalného vzorku (DI-SPME) nebo v režimu head space (HS-SPME), kdy je vlákno vystaveno plynnému vzorku či parní fázi nad vzorkem. Pro analýzu hroznů je upřednostňován režim HS-SPME, protože je vlákno vystaveno pouze těkavým sloučeninám a eliminují se tak možné interference a netěkavé látky. Nespornými výhodami SPME jsou jednoduchost, rychlost, malý objem použitého vzorku, cena. Nevýhodou může být složitost optimalizace, proto se řada prací zabývá optimalizací podmínek HS-SPME např. ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS). Je tomu tak i v článku Perestrelo a kol. [70], kde se zabývali optimalizací parametrů SPME (povlakem vlákna, teplotou, iontovou silou...) pro stanovení charakteristických těkavých látek v dužině a slupce hroznů *Vitis vinifera* [41][70].

Podobnou metodou je sorpční extrakce na míchací tyčinku (SBSE), která je založena na použití magnetické lišty, zapouzdřené ve skleněném obalu potaženém absorpčním materiálem – stacionární fázi (SF). Analyt je absorbován do SF a jako u SPME probíhá desorpce termicky. Uvolněné látky jsou dále podrobeny kryokoncentraci (v chladničce nebo kapalném dusíku), pro jejich zachycení a koncentraci. Pro vnesení do GC-MS je však nutné aplikovat opět vyšší teploty. Rovněž může probíhat ve dvou režimech: head space (HS-SBSE) nebo ponořením (SBSE) [41].

Vhodnou extrakční technikou pro fenolické látky může být extrakce za asistence mikrovln. Jedná se o rychlou a efektivní metodu srovnatelnou např. s ultrazvukem. Mikrovlny zajišťují rychlé dodání energii do celého objemu rozpouštědla a současně dochází k účinnému a homogennímu ohřevu rozpouštědla i pevné matrice [63].

V práci Negro a kol. [46] byly extrahovány fenolické látky (antokyany a flavonoidy) z matolin pomocí 80% ethanolu okyseleného pomocí 0,5% ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) HCl [46].

V článku Perestrelo a kol. [70] byla pro stanovení celkových fenolů ve slupkách využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem a detekcí pomocí diodového pole. Pro přípravu extraktů byly slupky z bobulí ručně oloupany a lyofilizovány. Množství 2,5 g takto upravených slupek bylo extrahováno dle Soxhleta dichlormethanem po dobu 6 hodin, aby byla odstraněna lipofilní frakce. Zbylé slupky bez lipofilní části byly dále extrahovány ve 100 ml ethanolu, respektive v jeho 49,5% vodném roztoku s 1% kyselinou octovou o celkovém pH 2, po dobu 24 hodin, za konstantního míchání (400 rpm), při pokojové teplotě 25 °C. Následně byla suspenze

zfiltrována a organické rozpouštědlo odpařeno za nízkého tlaku. Finální vodný roztok byl lyofilizován a analyzován [70].

Další možnost, jak extrahovat fenolické látky, v tomto případě deriváty hydroxyskořicové kyseliny z bobulových plodů Patagonského ovoce Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst), uvádí Ruiz a kol. [49]. Byla použita extrakce pevná látka–kapalina, kde bylo 10 gramů ovoce rozmixováno společně s 10 ml roztoku methanolu a vody (93:7%, obj./obj.). Extrakt byl po dobu 60 s ošetřen ultrazvukovou tyčinkou a 16 hod třepán ve tmě. Tento proces byl třikrát opakován. Po centrifugaci byl supernatant oddělen a třikrát promyt extrakčním rozpouštědlem. Spojené supernatanty byly následně analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fotodiodovým polem a detekcí pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (HPLC–DAD–MS/MS) [49].

Ke zjištění rozdílů v antokyanovém profilu různých odrůd červených stolních hroznů použil Pomar a kol. [50] 40 ml 2% kyseliny mravenčí v methanolu. Ta byla přidána k 5 g ručně oloupaných slupek a směs byla 30 min třepána ve vodní lázni a tmě. Získaný extrakt byl zfiltrován a odpařen do sucha při 35 °C. Odparek byl resolubilizován destilovanou vodou a 3krát extrahován *n*-hexanem a 5krát octanem ethylnatým, pro promytí polyfenolických sloučenin. Vodná frakce byla opět odpařena do sucha a smíchána s 2% kyselinou mravenčí v methanolu. Vzorek byl nanesen na polyvinylpolypyrrolidonovou kolonu. Následně byla kolona promyta vodou a antokyany byly eluována 2% kyselinou mravenčí v methanolu, opět odpařeny do sucha a resolubilizovány 10% kyselinou mravenčí v methanolu [50].

Extrakční postupy volných a glykosylovaných aromatických sloučenin ve slupkách a šťávě z dužiny bobulí studovali i Genovese a kol. [51]. Ve své práci využívají k extrakcím šest různých směsí ethanol/voda se dvěma různými hodnotami pH (viz Tabulka 6) a dobou extrakce 24 h. Přičemž tlumivý roztok o pH 3,2 obsahoval 5 g·l⁻¹ kyseliny vinné, 10 g·l⁻¹ polyvinyl-polypyrrolidon (PVPP), 2 g·l⁻¹ azidu sodného a byl upraven na pH 3,2 pomocí hydroxidu sodného (c = 1 mol·l⁻¹). Pufr s pH 7,0 byl připraven smícháním 375 ml K₂HPO₄ (c = 0,25 mol·l⁻¹) ke 125 ml KH₂PO₄ (c = 0,05 mol·l⁻¹), 10 g PVPP a 2 g azidu sodného, následně byl roztok zředěn vodou do celkového objemu 1 liter. Pro rychlé určení vázaných těkavých sloučenin byl jako rozpouštědlo použit methanol, působící po dobu 4 h [51].

Tabulka 5: Složení extrakčních roztoků podle Genovese a kol. [51]

Zkratka směsi	Ethanol [%]	Pufr pH 3,2 [%]	Pufr pH 7,0 [%]
PS 3,2 (Et 0 %)	0	100	0
PS 3,2 (Et 6 %)	6	94	0
PS 3,2 (Et 12 %)	12	88	0
PS 7,0 (Et 0 %)	0	0	100
PS 7,0 (Et 6 %)	6	0	94
PS 7,0 (Et 12 %)	12	0	88

PS 3,2 – pufrovací směs o pH 3,2; PS 7,0 – pufrovací směs o pH 7,0; Et – ethanol

K extrakci těkavých látek z výlisků Chardonnay byla ve studii Liang a kol. [52] optimalizována metoda s použitím enzymatické hydrolýzy. Jako nejučinnější byl vyhodnocen tento způsob

extrakce... Hroznové výlisky, skladované při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly rozemlety za přítomnosti tekutého dusíku a následně prosyty přes síto s velikostí ok $500\text{ }\mu\text{m}$. K 50 g získaného prášku bylo přidáno 30 ml 70 % roztoku ethanolu a Milli-Q vody (Millipore) a pomocí uhličitanu sodného bylo upraveno pH na hodnotu 5. Ke vzorku bylo přidán, v množství 0,9 g enzymu na 10 ml vzorku, komerční enzym Rapidase (pektináza $\geq 25000\text{AVJP/g}$, β -glukosidáza $\geq 4000\text{BDG/g}$, DSM Food, USA), a takto upravený vzorek byl inkubován při 120 rpm a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hod. Směs byla 15 min centrifugována při 3000 rpm. Dále byl odebrán supernatant, který byl destilován na rotační odparce při $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, přičemž destilát byl jímán po dobu 20 min [52].

Pro určení profilu volatilních látek ve fortifikovaném portugalském víně Madeira byla, z důvodů jednoduchosti a časové náročnosti, zvolena headspace mikroextrakce pevnou fází (HS-SPME). V této studii Perestrelo a kol. [53] následně použili analýzu pomocí plynové chromatografie (GC) [53].

Další metoda, kterou ve své práci použil Ghaste a kol. [54], analyzovala prášek z hroznů připravený rozdrcením bobulí v kapalném dusíku pomocí analytického mlýnku. Ke 30 g takto získaného prášku bylo přidáno 80 ml vody, 0,5 g glukonolaktonu a 25 μl vnitřního standardu, kterým byl 1-heptanol ($1257\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v ethanolu). Následovala homogenizace (3 min při 20 000 rpm) a centrifugace (5 min při 10 000 rpm a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Získaný supernatant byl filtrován přes filtrační papír a extrakt byl použit pro SPE. Extrakční patrony Isolute ENV+ byly nejprve kondicionovány za pomoci 20 ml methanolu a následně Milli-Q vodou, až poté byl eluován hroznový extrakt. Navazujícím krokem bylo promytí patron 20 ml vody, aby došlo k vymytí nečistot. Volné těkavé látky byly eluovány 20 ml dichlormethanu. K jímanému eluátu bylo přidáno 40 ml pentanu a také bezvodého síranu sodného. Tato frakce byla zakoncentrována pomocí Vigruxovy kolony na 200 μl . Glykosylované prekurzory byly eluovány 30 ml methanolu z toho 1 ml eluátu byl později analyzován kapalinovou chromatografií ve spojení s vysoce rozlišovací hmotnostní spektrometrií (LC-HRMS). Zbytek frakce byl do sucha odpařen na vakuové rotační odparce. Baňka po odpaření byla promyta 10 ml dichlormethanem, čímž byly odstraněny veškeré volné těkavé látky. Vázaná frakce byla opětovně rozpuštěna v 5 ml citrátového pufru (pH 5) a k ní bylo přidáno 200 μl komerční enzymatické směsi AR2000. Celá tato směs byla ponechána po dobu 24 hod ve $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ vodní lázni. Po uplynutí 24 hod bylo přidáno 10 ml vnitřního standardu a volné těkavé látky byly třikrát extrahovány, tentokrát pomocí 3 ml roztoku pentanu/dichlormethanu (2:1 obj./obj.). Organická fáze s volnými sloučeninami byla shromážděna a zakoncentrována pro GC-MS analýzu na 200 μl . Vodná fáze byla analyzována pomocí LC-HRMS [54].

Fernández-González a Di Stefano [55] se ve svém článku zabývali frakcionací prekurzorů glykosidového aroma hroznů. Nejprve byl z hroznů ručním drcením a lisován získán mošt. Zbylé části bez pecek byly macerovány v pufru kyseliny vinné (pH 3,2; koncentrace kys. vinné $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) při laboratorní teplotě po dobu 24 hod. V další fázi byly extrakt a mošt spojeny. K tomuto roztoku byl přidán komerční pektolytický enzym bez sekundární glykosidázové aktivity (Vinozym FCE G) k pročištění směsi. Jeho působení bylo omezeno na dobu 2 hod při laboratorní teplotě. Izolace byla provedena pomocí 10 g C18-RP patrony, která byla aktivována

30 ml methanolu a následně 50 ml vody rozdělených na části. Po promytí 100 ml vody, byly volné těkavé látky eluovány 50 ml dichlormethanu a glykosidy 50 ml methanolu. Autoři s dichlormethanovou fází v této práci už dále nepracovali. Avšak methanolická frakce byla odpařena do sucha ve vakuu při laboratorní teplotě a odparek byl rozpuštěn v 5 ml vody. Vzniklý roztok se nechal projít 5 g patronou C18-RP, aktivovanou 15 ml methanolu a 30 ml vody. Patrona byla opět promyta 50 ml vody a dále byly jímány frakce eluované těmito rozpouštědly (pro každé rozpouštědlo vždy dvě frakce po 25 ml): a) methanol/voda (20:80 obj./obj.) b) methanol/voda (30:70 obj./obj.) c) methanol/voda (40:60 obj./obj.) d) methanol. Pro další účely studie byly dané frakce dále upravovány a zaočkovány kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* [55].

Cabredo-Pinillos a kol. [56] porovnávali různé extrakční metody pro těkavé látky ve vínech. Konkrétně srovnávali diskontinuální (dLLE) a kontinuální (cLLE) extrakci kapalina-kapalina a extrakci na pevnou fázi (SPE). Pro cLLE bylo v této práci vyhodnoceno jako nejlepší rozpouštědlo dichlormethan. Do separační nálevky bylo přidáno 25 ml simulátoru vína a poté třikrát extrahováno pomocí 10+10+10 ml činidla. Roztok byl následně intenzivně třepán po dobu 5 min a poté nechán stát do oddělení fází. Bylo odebráno 5 ml organické fáze, která byla podrobena analýze. Kontinuální extrakce byla provedena opět s dichlormethanem, jako extrakčním činidlem. Do extraktoru bylo umístěno 250 ml simulantu společně se 100 ml dichlormethanu. Po uplynutí 2 hodin byla extrakce ukončena a bylo odebráno 5 ml extraktu. Pro metodu SPE byly použity Zorbax SPE C18 kolnky, které byly nejprve kondicionovány 3 ml methanolu a 3 ml destilované vody. Vzorek byl aplikován pomocí injekční stříkačky a následně eluován dichlormethanem [56].

V současné době nejčastěji používanou metodou extrakce těkavých látek z hroznů je mikroextrakce na pevnou fázi. SPME využívá vlákno potažené stacionární fází, která selektivně absorbuje sloučeniny ze vzorku. Tato metoda je upřednostňována pro svou jednoduchost, nízké náklady a schopnost zachytit širokou škálu těkavých sloučenin bez nutnosti rozsáhlé přípravy vzorku. Kromě toho se používají i další metody uvedené výše, ale SPME zůstává jednou z nejvyužívanějších a nejkompaktnějších technik v takto zaměřených analýzách.

2.9. Metody stanovení bioaktivních látek

Dlouhodobým trendem ve stanovení těkavých látek v hroznech a vínech je plynová chromatografie (GC) s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (MS), nebo plamenově ionizačního detektoru (FID) [41].

Řada článků se věnuje také vývoji metod pro rychlé stanovení volatilních látek v hroznech. Jednu z těchto technik zkoumá v článku Ripoll a kol. [57]. Jedná se o spektroskopii v ultrafialovém (UV), viditelném (VIS) a blízkém infračerveném (NIR) spektru. UV-VIS-NIR spektroskopie může být, díky své nenáročnosti a rychlosti, výhodná pro vinaře k určení aromatické zralosti během procesu zrání hroznů. Další, jednoduché, rychlé a bezrozpouštědlové, hojně využívané metodě se věnují Sánchez-Palomo a kol. [58], kteří se zabývají HS-SPME ve spojení s GM-MS a optimalizací podmínek analýzy. Variantou může být analýza pomocí dynamického headspace spojeného s GC-MS. Touto alternativou se zabývají Rosillo a kol. [59] ve svém článku, kde ji využívají k diferenciaci odrůd *Vitis vinifera*.

Celkově analyzovali 7 odrůd révy vinné, které se diferenciovaly do 3 skupin podle 4 diskriminačních proměnných (obsah hexylacetátu, benzylalkoholu, fenylethylalkoholu a benzaldehydu). Obecně je SPME-GC-MS účinnou a využívanou technikou profilování specifických tříd hroznového aroma [57][58][59][60].

Celkový obsah fenolických látek lze stanovit metodou Folin–Ciocalteu, která je založena na redukci směsi fosfomolybdenanu a fosfowolframu působením fenolických látek v alkalickém prostředí. Vzniká modře zbarvený produkt, jehož množství může být stanoveno spektrofotometricky při 760 nm. Obvykle se hodnoty uvádí jako ekvivalenty kyseliny gallové. [61][62]. Pro stanovení obsahu proantokyanidových taninů byly navrženy 3 spektrofotometrické testy. Vanilinový a DMACH test, jsou založeny na tvorbě barevných produktů vycházejících z reakce taninů a aldehydového činidla. Principem Bate–Smithova testu je depolymerace proantokyanidinů po rozpadu jejich intra-flavonolových vazeb v kyselém teplém médiu. To vede k tvorbě červených kyanidů se specifickou absorpcí při vlnové délce 550 nm. Tyto spektrofotometrické metody však mohou vést k nadhodnocení obsahu polyfenolů kvůli možným interferencím s látkami, které absorbují UV záření [61][62][63].

Ke kvantifikaci a charakterizaci polyfenolů slouží také některé elektrochemické metody, např. cyklická voltametrie či diferenční pulzní voltametrie, které využívají elektrochemické aktivity polyfenolů. Pro pozorování vybraných složek v reálném čase je vhodná infračervená spektroskopie. Blízká (NIR) a střední (MIR) infračervená spektroskopie v kombinaci s vícerozměrnými analýzami je další vhodnou, rychlou a výkonnou metodou pro analýzu fenolických látek. Kupříkladu Ferrer-Gallego a kol. [64] využívá NIR spektroskopii v průběhu dozrávání hroznů ke stanovení fenolických sloučenin ve slupkách [63][64].

Široce používanou chromatografickou technikou je HPLC. V současné době je pro účely těchto analýz pomocí HPLC k dispozici velká škála různých nosičů, mobilních fází, kolon a detektorů. LC kolony s reverzní fází (RP) s C18 nebo jinou ekvivalentní stacionární fází (SF) jsou nejběžněji používané pro separaci polyfenolů. Jejich nevýhodou je časová náročnost zejména náročný může být krok čištění. Z těchto důvodů byly navrženy monolitické nosiče se spojitou porézní strukturou, díky které je zajištěn vyšší průtok rozpouštědla, potažmo zkrácení doby analýzy až na 8 min. LC s normální fází (NP) jsou oproti RP-LC výhodnější k analýze materiálu s vysokou molekulovou hmotností. Kolony „core-shell“ jsou alternativou pro UPLC. Jsou však navrženy tak, aby fungovaly na standardních HPLC přístrojích. Fenolické látky se ve spojení s HPLC běžně detekují pomocí UV-VIS, DAD či fluorescenčních a hmotnostních detektorů. Avšak nejpoužívanějším detektorem zůstává UV, kvůli přirozené absorpci této skupiny látek v UV oblasti. Pro identifikaci se využívají strukturální informace získané pomocí hmotnostní spektrometrie. Zároveň lze získaná data použít ke studiu struktur polyfenolů [63] [65][66].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité vybavení

Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), Hmotnostní spektrometr ISQTM LT Single Quadrupole (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), Xcalibur 2.2 (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), Knihovna hmotnostních spekter NIST/EPA/NIH (Gaithersburg, MA, USA), Microsoft Excel 2020 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Statistica 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA), SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), SPME vlákno CAR/PDMS 85 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), SPME vlákno PA 85 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), Kapilární kolona LN-WAX (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm) (CHROMSERVIS, Praha, Česká republika), Kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), LC Kolona Kinetex 5 µm EVO C18 (250 × 4,6 mm) (Phenomex), Vakuová rotační odparka Rotovapor RV06-ML s vodní lázní HB4 Basic (IKA Werke, Staufen, Německo), Předvážky EK-1200i a analytické digitální váhy GR-202 (A&D Instrument Ltd, Abingdon, Spojené království), vialky (10 ml; 1,5 ml), náhradní septa, běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2. Použité chemikálie

Helium 4.8 (SIAD Czech s.r.o., Rajhradice, Česko), Ethanol 96%, p.a. (Penta Chemicals, Chrudim, Česko), Linalool 97% (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Německo), α -Terpineol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Citronellol 96% (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Německo), Geraniol 97% (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Německo), Dekan-1-ol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), (R)-(+)-Limonen 97% (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Německo), Methanol 99,9% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), n-Hexan 99% p.a. (Penta Chemicals, Chrudim, Česko), Octan ethylnatý 99,5% p.a. (LACHEMA n.p. Brno; Neratovice; Česko), Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), (\pm)-Katechin hydrát 98% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Ferulová kyselina 99% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Gallová kyselina $\geq 97,5\%$ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Rutin hydrát $\geq 94\%$ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Hexanal 98% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Hexanová kyselina (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Německo), Damascenon (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Oktanal (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Německo), trans-2-Hexen-1-ol 98% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 1-Hexanol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Německo), trans-2-Hexen-1-ol 96% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Chlorid sodný, p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česko)

3.3. Analyzované vzorky

V této práci byly analyzovány 4 odrůdy hroznů révy vinné (Hibernal, Johanniter, Ryzlink rýnský, Aurelius). Celkem bylo zanalyzováno 18 vzorků (další informace viz Tabulka 6). Všechny vzorky hroznů byly k účelům této diplomové práce věnovány jednotlivými vinaři. Ihned po sběru byly hrozny zmrazeny a ponechány při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy, kdy byly 1 hodinu před přípravou vzorků ponechány v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby bylo možné oddělit slupku od zbytku bobule.

Tabulka 6: Přehled analyzovaných vzorků

Vzorek	Odrůda	Vinařská oblast	Vinařská podoblast
1.	Hibernal	Morava	Velkopavlovická
2.	Hibernal	Morava	Velkopavlovická
3.	Hibernal	Morava	Velkopavlovická
4.	Hibernal	Morava	Velkopavlovická
5.	Hibernal	Morava	Znojemská
6.	Hibernal	Morava	Znojemská
7.	Johanniter	Morava	Mikulovská
8.	Johanniter	Morava	Mikulovská
9.	Johanniter	Morava	Velkopavlovická
10.	Johanniter	Morava	Velkopavlovická
11.	Ryzlink rýnský	Morava	Velkopavlovická
12.	Ryzlink rýnský	Morava	Velkopavlovická
13.	Ryzlink rýnský	Morava	Znojemská
14.	Ryzlink rýnský	Morava	Znojemská
15.	Aurelius	Morava	Velkopavlovická
16.	Aurelius	Morava	Velkopavlovická
17.	Aurelius	Morava	Znojemská
18.	Aurelius	Morava	Znojemská

3.4. Podmínky analýzy HPLC-MS

- Vzorek v 1,5 ml vialce; objem nastříknutého vzorku: 5 µl;
- Doba analýzy 30 min; teplota analýzy 35 °C
- Průtok mobilní fáze 1 ml/min
- Mobilní fáze: A – 0,1 % kyselina methanová; B – 10 % methanol
- Gradient mobilní fáze: 0 min – 90% A, 10% B; 2,5 min – 10% A, 90% B; 25 min – 50% A, 50% B; 25,01 min – 90% A, 10% B

3.5. Extrakční metody pro analýzu pomocí HPLC-MS

Pro získání optimální extrakce bioaktivních látek z hroznů byly testovány 4 druhy extrakce vhodné pro následnou analýzu pomocí HPLC-MS.

3.5.1. Postup extrakce č. 1

Bobule hroznu byly ručně oloupany a obě vzniklé frakce byly odděleně podrobeny následující extrakci. 2 g vzorku slupek/dužiny se semeny byly umístěny do plastové zkumavky a zality 8 ml acetonitrilu. Takto připravená směs byla třepána po dobu 20 hod. Následně byl vzorek zcentrifugován při 2500 rpm po dobu 15 minut. Odebraná kapalná fáze byla pomocí injekční stříkačky přefiltrována přes nylonový filtr (0,45 µm, Clarify). Pro analýzu bylo následně do odebráno 1,5 ml vzorku.

3.5.2. Postup extrakce č. 2

Bobule hroznu byly ručně oloupany a obě vzniklé frakce byly extrahovány tímto způsobem: 2 g vzorku slupek/dužiny se semeny byly umístěny do plastové zkumavky a zality 8 ml

50% ethanolu. Takto připravená směs byla třepána po dobu 20 hod. Následně byl vzorek zcentrifugován při 2500 rpm po dobu 15 minut. Odebraná kapalná fáze byla pomocí injekční stříkačky přefiltrována přes nylonový filtr (0,45 μm , Clarify). Pro analýzu bylo následně do odebráno 1,5 ml vzorku.

3.5.3. Postup extrakce č. 3

Vzorky hroznů byly ručně oloupany. Slupky a dužina se semeny byly separátně podrobeny extrakcí podle Jara-Palacios a kol. [67] s drobnými úpravami. Zkráceně: 2 g vzorku (slupky/dužina se semeny) byly rozetřeny ve třecí misce společně s 10 ml 75% methanolu a třepány po dobu 1 hodiny. Dále byl vzorek centrifugován při 2500 rpm po dobu 15 min. Supernatant byl odebrán a usazenina byla ještě dvakrát podrobena stejnému procesu. Supernatanty byly spojeny a přefiltrovány přes nylonový filtr (0,45 μm , Clarify). Pro analýzu bylo následně do vialky odebráno 1,5 ml vzorku.

3.5.4. Postup extrakce č. 4

Ručně oddělené slupky a dužina se semeny byly extrahovány podle Masa a kol. [68] s drobnými úpravami. Stručně: 2 g vzorku (slupky/dužina se semeny) byly rozetřeny ve třecí misce s 10 ml deionizované vody. Takto připravený vzorek byl převeden do plastové zkumavky a 15 min centrifugován při 2500 rpm. Supernatant byl přefiltrován přes nylonový filtr (0,45 μm , Clarify). K filtrátu byl přidán dvojnásobný objem 96% ethanolu a po 1 hodinu byl uschován v lednici a opět přefiltrován. Ethanol byl ze vzorku odpařen pomocí vakuové rotační odparky při 35 °C. Zbýlý vodný extrakt byl zbaven tuků trojnásobnou extrakcí n-hexanem v dělicí nálevce a pětkrát extrahován octanem ethylnatým v dělicí nálevce. Získané extrakty byly spojeny, odpařeny do sucha a resolubilizovány 2 ml roztoku methanol/voda (1:1 obj./obj.). Bylo odebráno 1,5 ml takto připraveného vzorku, který byl před analýzou ještě jednou přefiltrován přes nylonový filtr (0,45 μm , Clarify).

3.6. Příprava kalibračních roztoků standardů pro HPLC-MS

Pro kvantifikaci byli vybráni 4 zástupci fenolických látek. Nejprve byl připraven zásobní 75% methanolký roztok standardů obsahující katechin hydrát, rutin hydrát, kyseliny gallovou a ferulovou v koncentraci 1 g·l⁻¹. Z něj bylo následně připraveno 7 kalibračních bodů o koncentracích 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 50 a 100 mg·l⁻¹.

Ze získaných dat byly v MS Excel vytvořeny kalibrační křivky pro každou frakci hroznů zvlášť s koeficientem spolehlivosti R² v rozsahu 0,9650 pro rutin až 0,9989 pro kys. gallovou. Všechny koeficienty spolehlivosti, rozsah linearit a další informace viz Tabulka 7.

3.7. Podmínky analýzy pomocí HS-SPME-GC-MS

- HS-SPME: DVB/CAR/PDMS vlákno, vzorek v 10ml vialce, inkubace 10 min při teplotě 70 °C, extrakce po dobu 30 min při 70 °C, doba desorpce: 7 min, míchání
- Teplota inletu: 250 °C; nástřik v režimu splitless po dobu 7 min
- Průtok nosného plynu: 1 ml/min He 4.8
- Teplotní program: 40 °C po dobu 1 min, 5 °C/min do 100 °C po dobu 3 min, 5 °C/min do 130 °C po dobu 5 min, 5 °C/min do 200 °C po dobu 14 min
- MS detekce: teplota transfer line: 220 °C, iontový zdroj: elektronová ionizace při 70 eV, teplota iontového zdroje: 220 °C, skenovací rozsah 30–300 m/z

3.8. Příprava kalibračních roztoků standardů pro HS-SPME-GC-MS

Nejprve byl připraven zásobní roztok standardů o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Základem zásobního roztoku byl 12% ethanolický roztok („simulátor vína“), který obsahoval $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ glukózy, $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ fruktózy, $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny vinné, $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny jablečné, $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny mléčné, $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ glycerinu, $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,3-butandiolu, $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-fenylethanolu. K „simulátoru vína“ byly přidány tyto standardy: hexanal, D-limonen, oktanal, hexanol, linalool, oktanol, α -terpineol, citronellol, β -damascenon, geraniol, kyselina hexanová, a tím byl připraven zásobní roztok. Kvůli složitosti matrice, kterou je slupka a dužina bobule hroznu, byl zásobní roztok přidáván přímo do vialek s předem připravenými 2 g slupek či dužiny se semeny, tak aby koncentrace standardů ve vialce odpovídala 5; 10; 50; 100; 500 a $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto bylo připraveno 6 bodů kalibrace a slepý vzorek, tedy vzorek bez přídavku standardů. Před analýzou bylo do každé vialky přidáno 20 μl heptan-2-olu ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) jako vnitřního standardu.

Ze získaných dat byly v MS Excel vytvořeny kalibrační křivky pro každou frakci hroznu zvlášť s nejnižším koeficientem spolehlivosti pro 1-oktanol ($R^2=0,8632$) a nejvyšším ($R^2=0,9988$) pro frakci slupek. Nejnižší koeficient spolehlivosti měl v dužině se semeny D-limonen s hodnotou koeficientu 0,9919. Naopak nejvyšší hodnotu R^2 v této frakci měl hexanol, a to 0,9999. Všechny koeficienty společně s rozsahem linearity jsou uvedeny v Tabulce 8.

Na základě těchto standardů byly látky kvantifikovány: podle hexanalů – hexanal, trans-hex-2-enal; podle D-limonenu – β -pinen, D-limonen; podle oktanalů – oktanal; podle hexanolů – 1-hexanol, trans-2-hexenol, diallyl disulfid; podle linaloolů – linalool; podle 1-oktanolů – oktanol; podle geraniolů – hotrienol, α -farnesen, geraniol; podle α -terpineolů – α -terpineol; podle citronellolů – citronellol; podle β -damascenonů – β -damascenon, 2,3,6-trimethylnaftalen; podle kyseliny hexanové – kyseliny hexanová, oktánová, n-dekanová.

3.8.1. Linearita

Pro ověření linearity byly vybráni zástupci fenolických látek, terpenoidů, karboxylových kyselin a C6 sloučenin, které jsou pro hrozny charakteristické. Linearity bylo ověřeno technikou vnějšího standardu, za použití roztoků připravených dle kapitoly 3.6 a 3.8.

Tabulka 7: Ověření linearity fenolických látek

Sloučenina	Kalibrace ($A=ac$)	Koeff. spolehlivosti R^2	Rozsah [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
	a		
Gallová kyselina	4962	0,9989	0,01–50
Ferulová kyselina	2599	0,9892	0,01–50
Katechin	13326	0,9867	0,01–50
Rutin	25703	0,9650	0,01–50

A – plocha píku; c – koncentrace analytu

Tabulka 8: Ověření linearitu těkavých látek

Sloučenina	Kalibrace ($A=ac$)		Koef. spolehlivosti R^2		Rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	
	a		S	D	S	D
	S	D				
Hexanal	0,0174	0,00154	0,9977	0,9961	5–100	5–1000
D-Limonen	0,0072	0,00316	0,9988	0,9919	5–300	5–1000
Oktanal	0,03688	0,00135	0,9532	0,9998	5–50	5–1000
Hexanol	0,0061	0,01048	0,9814	0,9999	5–1000	5–500
Linalool	0,00288	0,00132	0,9912	0,9937	5–100	5–1000
1-Oktanol	0,0102	0,00175	0,8632	0,9926	5–50	5–1000
α -terpineol	0,00267	0,00207	0,9987	0,9893	5–1000	5–1000
Citronellol	0,0044	0,00661	0,9957	0,9999	5–1000	5–100
β -Damascenon	0,00035	0,00025	0,8571	0,9999	5–1000	5–1000
Geraniol	0,0024	0,00224	0,9763	0,9981	5–1000	5–1000
Hexanová kyselina	0,00013	0,00062	0,9437	0,9962	5–1000	5–1000

A – plocha píku; c – koncentrace analytu; S – slupky; D – dužina se semeny

3.9. Extrakční metody pro analýzu pomocí GC-MS

Dle provedené literární rešerše byla vybrána headspace mikroextrakce pevnou fází. Pro výběr optimální extrakce byly připraveny 3 sady 24 vzorků (možných variant extrakcí, viz Tabulka 8), každá pro jedno ze tří testovaných vláken: DVB/CAR/PDMS – divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan; CAR/PDMS – carboxen/polydimethylsiloxan; PA – polyamid). Současně byla polovina vzorků analyzována při teplotě extrakce 40 °C a druhá polovina při teplotě 70 °C.

3.9.1. Postup přípravy vzorků pro výběr metody

Slupka hroznu byla ručně oddělena od zbytku bobule. Do 10 ml vialky byly umístěny 2 g vzorku, ke kterým byl přidán nasycený roztok chloridu sodného v daném hmotnostním poměru. Před uzavřením bylo do vialky napipetováno 20 μl heptan-2-olu, jakožto vnitřního standardu. Dále byly vybrané vialky se vzorkem (viz Tabulka 7) umístěny do vodní lázně a bylo na ně působeno ultrazvukem po dobu 30 minut. Posledním krokem byla analýza vzorků.

Tabulka 9: Sada vzorků pro výběr optimálních podmínek extrakce pomocí HS-SPME

Číslo vzorku	Poměr hmotnosti vzorku : nasyc. roztoku NaCl	Působení ultrazvuku	Teplota extrakce [°C]	Frakce hroznu
1.	1:0	*	40	S
2.	1:1	*	40	S
3.	1:3	*	40	S
4.	1:0	×	40	S
5.	1:1	×	40	S
6.	1:3	×	40	S

* – na vzorek bylo působeno ultrazvukem; × – na vzorek nebylo působeno ultrazvukem; S – slupky;

D – dužina se semeny

Tabulka 9 – pokračování: Sada vzorků pro výběr optimálních podmínek extrakce pomocí HS-SPME

Číslo vzorku	Poměr hmotnosti vzorku : nasyc. roztoku NaCl	Působení ultrazvuku	Teplota extrakce [°C]	Frakce hroznů
9.	1:3	*	40	D
10.	1:0	×	40	D
11.	1:1	×	40	D
12.	1:3	×	40	D
13.	1:0	*	70	S
14.	1:1	*	70	S
15.	1:3	*	70	S
16.	1:0	×	70	S
17.	1:1	×	70	S
18.	1:3	×	70	S
19.	1:0	*	70	D
20.	1:1	*	70	D
21.	1:3	*	70	D
22.	1:0	×	70	D
23.	1:1	×	70	D
24.	1:3	×	70	D

* – na vzorek bylo působeno ultrazvukem; × – na vzorek nebylo působeno ultrazvukem; S – slupky; D – dužina se semeny

3.10. Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování byl použit program Statistica. Data byla analyzována pomocí základní popisné statistiky, analýzy rozptylu, korelační analýzy, shlukové analýzy a analýzy hlavních komponent (PCA). Vzhledem k nehomogennímu rozptylu a nenormálnímu rozložení dat (ověřeno pomocí Shapiro-Wilkova testu a Leveneho testu) byl pro analýzu rozptylu použit Kruskal-Wallis ANOVA test. Před provedením shlukové analýzy a PCA byla data standardizována. Pro grafické zobrazení výsledků byly použity programy Microsoft Excel a Statistica.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro analýzu bioaktivních látek v hroznech byly použity techniky HPLC-MS a HS-SPME-GC-MS. Pro každou z těchto technik byla nejprve vybrána extrakční metoda pro maximalizaci extrakce těchto látek.

4.1. Výběr extrakční metody pro analýzu HPLC-MS

Byly vyzkoušeny 4 metody pro extrakci bioaktivních látek z hroznů révy vinné (viz kapitola 3.5). Optimální metoda byla vybrána na základě celkové integrované plochy píků v chromatogramu a podle počtu identifikovaných sloučenin. Fenolické sloučeniny nalezené v jednotlivých extraktech jsou uvedeny v Tabulce 10. Látky byly identifikovány porovnáním retenčních časů (RT) a poměru m/z (hmotnost/náboji), které byly získány z chromatografu a hmotnostního spektra, retenčního času a m/z standardů. Některé z detekovaných látek nebyly identifikovány, jedná se např. o látku detekovanou v retenčním čase 3,35 min s poměrem m/z 152,9 a 319,9. Může se jednat o sloučeninu, jejíž standard nebyl touto metodou dosud analyzován, případně se může v takto brzkém čase jednat o nečistoty z předchozí analýzy, kolony či mobilní fáze.

Vybrané metody se v praxi běžně používají k extrakci fenolických látek. Pro každou frakci bobule byla extrakční metoda vybrána separátně. Největší celkovou plochu píků (248 498) měl pro slupky typ extrakce č. 3, kde byl jako extrakční činidlo použit 75% methanol. Také počet látek detekovaných v tomto extraktu byl nejvyšší, a to 14 sloučenin, včetně zástupců vybraných pro kvantifikaci. Nejmenší celkovou plochu píků pro frakci dužiny se semeny měla extrakce č. 4 (25 785), tato plocha se od ostatních lišila o celý jeden řád, což mohlo být způsobeno již při přípravě extraktu, ztrátami při odpařování extrakčního činidla ze vzorku. Největší celkovou plochu (478 343) měla metoda č.1 využívající acetonitril jako extrakční činidlo. Přesto byla i pro tuto frakci zvolena extrakční metoda č. 3, která ve svém extraktu měla nejvíce detekovaných látek.

4.2. Výběr extrakční metody pro analýzu GC-MS

Podle literární rešerše a četných výhod metody, jako např. rychlost a absence jakéhokoliv rozpouštědla, byla vybrána HS-SPME. Účinnost SPME je ovlivněna hned několika faktory, např. povrch vlákna, teplota extrakce, iontová síla. Nejlepší podmínky byly opět vybrány pro každou frakci hroznu zvlášť na základě celkové integrované plochy píků v chromatogramu a podle počtu identifikovaných sloučenin.

4.2.1. Potah vlákna a teplota extrakce

Byla testována tři komerčně dostupná vlákna s různým potahem. Z grafů 3 a 4 je patrné, že celková integrovaná plocha píků při použití vlákna s polyamidovým povrchem je v některých případech až 10krát menší v porovnání s celkovou plochou píků pro zbylá dvě vlákna. Pouze vzorky, které nebyly před analýzou upraveny sonikací a přidavkem solného roztoku, mají i při extrakci na PA vlákno při 40 °C porovnatelné plochy s ostatním typem vláken, a to pro obě frakce bobulí. To mohlo být způsobeno lepším těkáním analytů ze vzorku, díky nepřítomnosti roztoku, a také lepším teplotním podmínkám analýzy v porovnání se vzorkem s extrakční teplotou 70 °C. PA vlákno je díky své nízké citlivosti na polární sloučeniny nevhodné ke

stanovení tohoto typu sloučenin, což potvrzuje např. článek Pozo-Bayón a kol. [69], který se věnuje stanovení terpenů a fermentačních sloučenin ve vínech.

Mikroextrakce na vlákno CAR/PDMS při teplotě 70 °C byla nejefektivnější z hlediska celkové integrované plochy píků v chromatogramu. Nicméně počet identifikovaných látek ve vzorku extrahovaného tímto vláknem byl ve slupkách průměrně 46 sloučenin a 35 sloučenin ve zbytku hroznu. Ve slupkách extrahovaných DVB/CAR/PDMS vláknem byl nalezeno průměrně 56 sloučenin a v dužině se semeny bylo identifikováno 42 látek.

Pro bližší srovnání bylo vybráno 10 sloučenin uvedených v Tabulce 11, která zobrazuje v kolíka ze 12 vzorků dané frakce byla látka identifikována. Z Tabulky 8 je patrné, že CAR/PDMS vlákno není schopno zachytit některé sloučeniny podílející se na aroma hroznů a vína z nich vyrobeného jako např. limonen, α -farnesen a 2,3,6-trimethylnaftalen. Díky schopnostem vlákna DVB/CAR/PDMS extrahovat nejvyšší počet sloučenin a všechny vybrané, bylo toto vlákno zvoleno za nejvhodnější pro všechny následující analýzy. Podobných výsledků dosáhl ve své studii i Perestrelo a kol. [70], kde nejvíce látek bylo identifikováno při analýze s použitím DVB/CAR/PDMS vlákna a současně mělo toto vlákno nejvyšší účinnost pro extrakci karbonylových sloučenin, alkoholů a monoterpenoidů ze všech testovaných vláken.

Tabulka 10: Četnost identifikace vybraných látek ve frakcích hroznu při použití různých typů vláken

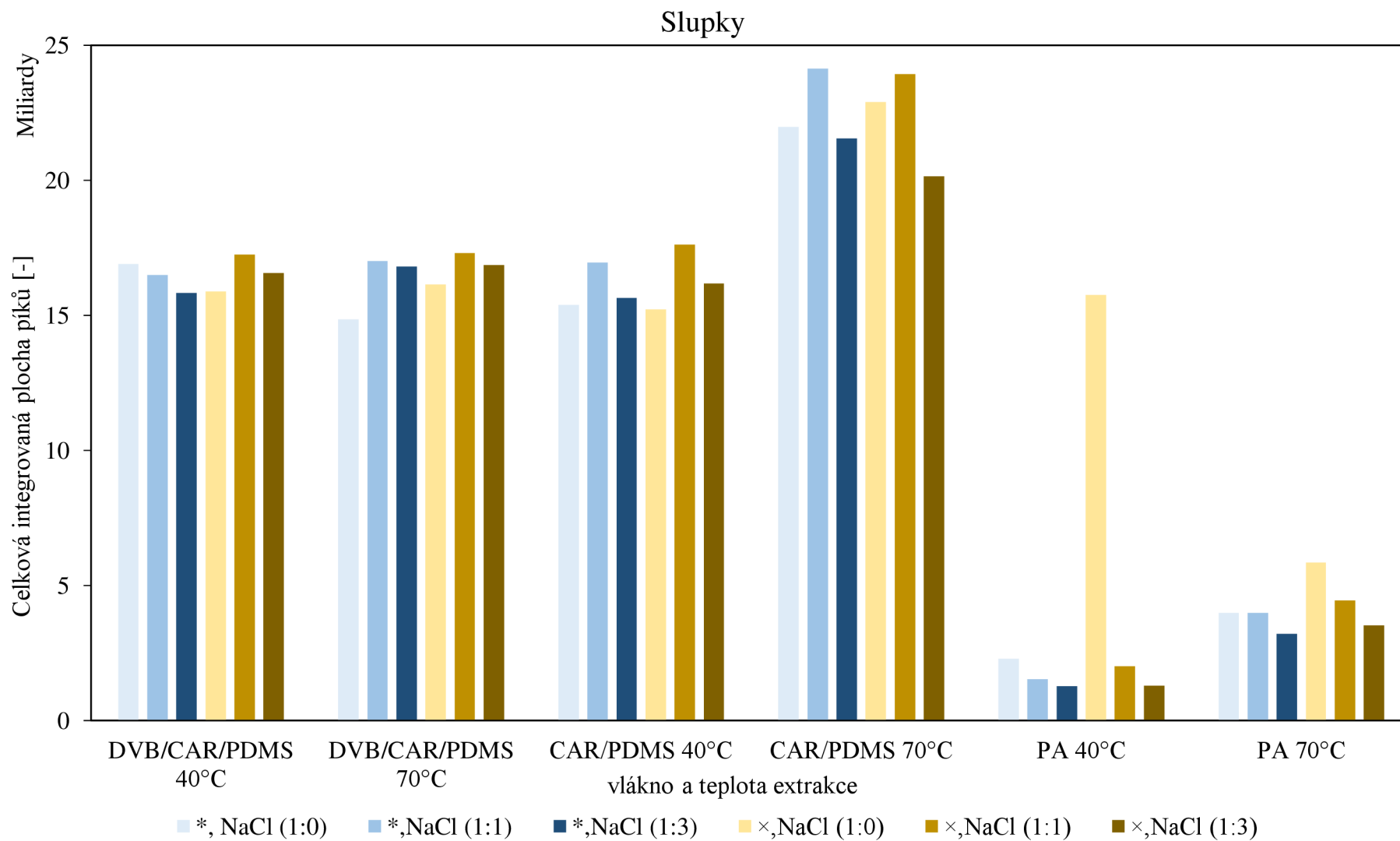
Sloučenina	Četnost identifikací ze 12 vzorků		Četnost identifikací ze 12 vzorků	
	DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS	
	Slupky	Dužina se semeny	Slupky	Dužina se semeny
limonen	4	3	0	0
trans-hex-2-enal	12	12	12	11
1-hexanol	12	12	12	12
trans-2-hexenol	12	12	12	11
hotrienol	10	12	10	12
α -terpineol	10	9	10	11
α -farnesen	5	2	0	0
β -damascenon	7	8	7	10
geraniol	12	9	12	10
2,3,6-trimethylnaftalen	12	12	0	0

Souvisejícím parametrem je teplota extrakce. Teploty 40 °C i 70 °C byly porovnávány na základě celkové plochy píků, které jsou zobrazeny v Grafu 3 a 4. Celková plocha píků při analýze slupek je pro obě teploty srovnatelná. Nicméně průměrný počet identifikovaných látek ve vzorcích byl odlišný. Při 70 °C bylo identifikováno průměrně 59 látek, kdežto při 40 °C pouze 53 sloučenin. V Grafu 4, který zobrazuje data pro dužinu, je možné pozorovat nárůst celkové plochy při teplotě extrakce 70 °C oproti extrakci při 40 °C. Stejně tak se teplota projevila v průměrném počtu všech identifikovaných látek ve vzorcích dužiny. Při teplotě 40 °C bylo průměrně nalezeno 39 sloučenin, oproti tomu bylo ve vzorcích extrahovaných při 70 °C nalezeno 45 látek. Pro následující analýzy byla tedy vybrána teplota 70 °C pro slupky i dužinu.

Tabulka 11: Fenolické látky extrahované pomocí porovnávaných metod

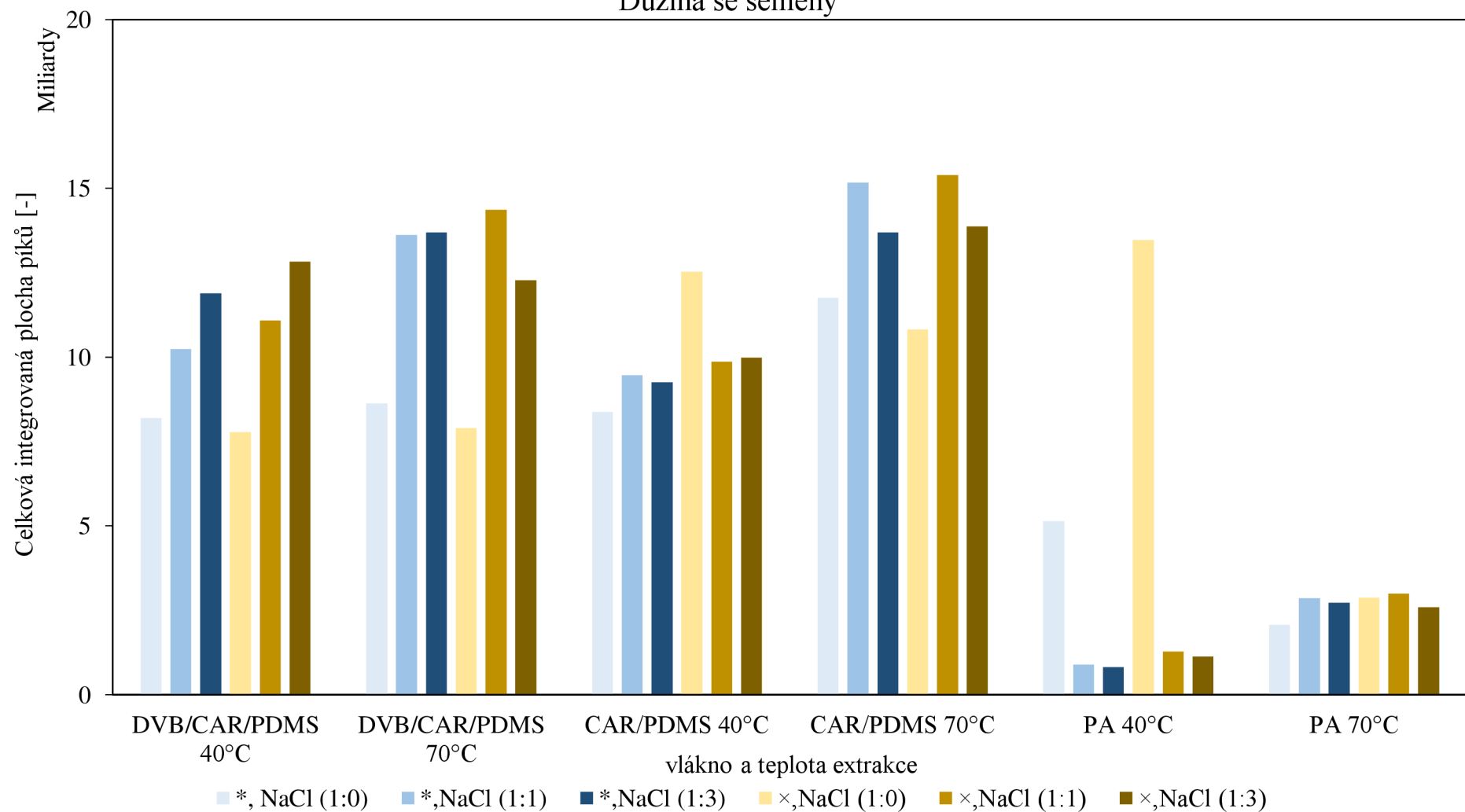
RT [min]	Sloučenina	m/z	m/z	Plocha píku [-]							
				Extrakce č. 1		Extrakce č. 2		Extrakce č. 3		Extrakce č. 4	
				S	D	S	D	S	D	S	D
3,35	NI	152,9	316,9	25532	0	0	0	1820	4619	7390	0
4,68	Gallová kyselina	168,9	-	6469	95282	0	13164	16581	10106	23372	6176
6,40	Hb. kyselina	136,9	-	3034	0	0	0	0	956,0	0	1648
7,81	Katechin	288,9	-	31080	209643	30142	153716	7634	196065	31973	0
8,60	NI	178,9	-	5338	0	0	0	0	0	0	0
9,65	Epikatechin	228,9	-	16201	128574	9252	70958	0	116188	55245	1574
10,38	Ferulová kyselina	192,9	-	30649	16054	17006	25607	13433	2003	4435	4333
10,86	NI	609,1	-	0	0	0	0	5961	0	0	0
11,23	Epikatechin gallát	441,1	-	3742	10830	6672	5236	0	11555	0	0
11,79	NI	609,1	305	0	0	0	0	3610	0	0	0
12,10	Rutin	609,1	-	10620	17956	6329	0	9577	3138	0	0
12,58	NI	609,1	-	0	0	0	0	3302	0	0	0
13,41	NI	609,1	300,9	0	0	0	0	64632	0	0	12055
14,35	Ellagová kyselina	300,9	-	4978	0	0	0	103695	3069	0	0
15,10	NI	285,0	-	0	0	0	0	3013	0	0	0
15,26	NI	491,2	492	0	0	0	0	4974	0	0	0
15,56	Kvercetin	301,0	-	0	0	0	0	19884	0	0	0
16,74	Kamferol	285,0	-	0	0	0	0	8784	0	0	0
Suma ploch píků				107312	478343	69400	268681	248499	347707	122416	25785

NI – nebylo identifikováno; Hb. kyselina – hydroxybenzoová kyselina; m/z – hmotnost/náboj částice; S – slupky; D – dužina se semeny



Graf 3: Porovnání celkových integrovaných ploch piků při daných podmínkách ve vzorcích slupek (* – vzorek bylo působeno ultrazvukem; × – na vzorek nebylo působeno ultrazvukem; NaCl – hmotnostní poměr nasyceného roztoku NaCl a vzorku)

Dužina se semeny



Graf 4: Porovnání celkových integrovaných ploch píků při daných podmínkách ve vzorcích dužiny se semeny (* – vzorek bylo působeno ultrazvukem; × – na vzorek nebylo působeno ultrazvukem; NaCl – hmotnostní poměr nasyceného roztoku NaCl a vzorku)

Sánchez-Palomo a kol. [58] v článku prováděli extrakce při teplotách 40, 50, 60 a 70 °C po dobu 10, 20, 30, 40 a 50 minut. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při 20minutové extrakci při 70 °C. Druhé nejlepší výsledky byly získány opět při 70 °C a době 30 minut, což odpovídá podmínkám, jaké jsou použity v této diplomové práci.

4.2.2. Působení ultrazvuku

Pro porovnání účinnosti působení ultrazvukových vln na zlepšení extrakce volatilních látek v hroznech byl použit neparametrický test Kruskal-Wallis (K-W) ANOVA v programu Statistica. Pomocí K-W ANOVA byly porovnány celkové plochy píků 2 skupin, každá o 12 vzorcích. Na první skupinu bylo působeno ultrazvukem (U.S.) po dobu 30 minut a na druhou skupinu U.S. působeno nebylo. Skupiny byly hodnoceny na základě ploch píků 10 vybraných sloučenin (limonen, trans-hex-2-enal, 1-hexanol, trans-2-hexenol, hotrienol, α -terpineol, α -farnesen, β -damascenon, geraniol, 2,3,6-trimethylnaftalen). Z výsledků vyplývá, že na hladině spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) se skupiny vzorků v ploše píků vybraných látek statisticky významně neliší, což je patrné i z Grafu 3 a 4, kde se celkové plochy píků příliš neliší, a proto byla při finální přípravě vzorků úprava ultrazvukem vynechána.

Ve článku Comarella a kol. [71] byl použit ultrazvuk při posklizňovém ošetření hroznů. Bylo zjištěno, že ošetření ultrazvukem podpořilo extrakci některých bioaktivních látek např. antokyanů. Avšak tyto účinky se lišily v závislosti na podmínkách sklizně, a také na testovaném kultivaru hroznů. V práci Tao a kol. [72] byly testovány parametry ultrazvukové extrakce (hustoty akustické energie 6,8–47,4 W/L a teploty 20–50 °C) na extrakční výtěžky fenolických látek a vinných esterů z matolin. Difuzní koeficienty analytů se se zvyšující teplotou a hustotou akustické energie zvyšovaly. Je tedy možné, že na odrůdy hroznů testované v této práci nemá ošetření ultrazvukem signifikantní vliv. Také podmínky při působení ultrazvuku nebyly nijak upravovány, a proto mohla být extrakce neefektivní.

4.2.3. Přídavek nasyceného roztoku chloridu sodného

Byly testovány 3 hmotnostní poměry vzorku a nasyceného roztoku chloridu sodného (1:0; 1:1; 1:3). V Grafu 3 lze vidět, že pro frakci slupek patrně není poměr solného roztoku a vzorku zásadním faktorem pro dosažení lepší extrahovatelnosti těkavých látek. I když pro vzorky s poměrem 1:1 je možné pozorovat mírný nárůst ploch a se zvýšením poměru na 1:3 opět pokles. Tento jev mohl být způsoben příliš velkým množstvím chloridu sodného, se kterým následně molekuly mohly reagovat a tím se snížila schopnost látek dostat se z roztoku až k vláknu [73]. Pro dužinu se semeny však lze sledovat nárůst celkové plochy píků při větším poměru, a to zejména pro vybrané vlákno DVB/CAR/PDMS, což by mohla nasvědčovat pozitivnímu vlivu vyššího poměru na extrahovatelnost látek.

Byl také porovnán průměrný počet identifikací 10 vybraných látek (viz Tabulka 11) ve vzorcích, které byly rozděleny do 3 skupin podle poměru solného roztoku a vzorku ve vialce. Toto porovnání bylo provedeno pro vzorky extrahované pomocí vlákna DVB/CAR/PDMS, které bylo vybráno jako nejlepší pro danou analýzu (viz kapitola **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Ve 4 vzorcích slupek s poměrem NaCl:vzorku 1:0 bylo průměrně identifikováno 9 z 10 vybraných látek. Při poměru 1:1 a 1:3 bylo průměrně identifikováno 8 z 10 látek. Proto byl pro tuto frakci za nejvhodnější zvolen hmotnostní poměr nasyceného NaCl roztoku:vzorku

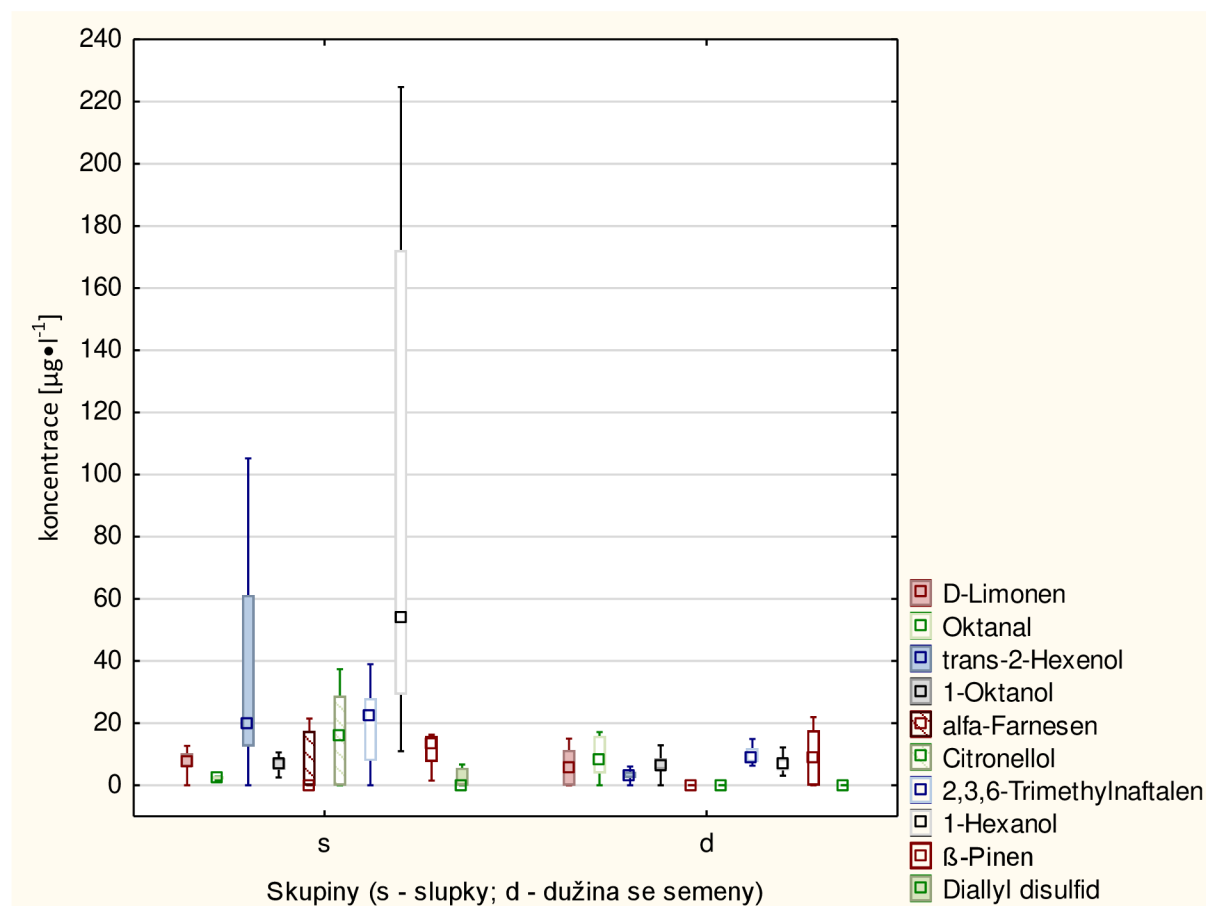
1:0, tedy bez přídavku solného roztoku. Pro druhou frakci byl průměrný počet identifikací vybraných látek ve vzorku stanoven opět ve 4 vzorcích. Ve skupině vzorků s poměrem 1:0 a 1:3 bylo nalezeno průměrně 7 z 10 sloučenin. Ve skupině s poměrem 1:1 byl průměr nalezených sloučenin 9 z 10, díky tomu byl tento poměr zvolen jako nejvhodnější pro další analýzu této části hroznů. Vysolovací efekt se v současné době v podobných typech analýz hodně využívá. Xiaofeng a kol. [74] ve své práci přidávali před analýzou ke vzorku šťávy z hroznů či vína 1 g NaCl. Pro analýzu celých pevných částí hroznů by se krystalická sůl neměla v čem rozpustit, a proto byl zvolen nasycený roztok NaCl. Tato technika se pro dužiny osvědčila, pro slupky nebyl pozorován žádný vliv na zlepšení extrakce. To mohlo být způsobeno rozdílnou strukturou matrice dužiny a slupek, nebo skutečností, že dužina sama o sobě obsahuje větší množství vody než slupky, které se z dužiny samovolně uvolňuje.

4.3. Stanovení vybraných bioaktivních látek (slupky vs. dužina se semeny)

V této kapitole jsou vzájemně porovnány dvě frakce bobule hroznů z hlediska obsahu vybraných bioaktivních látek.

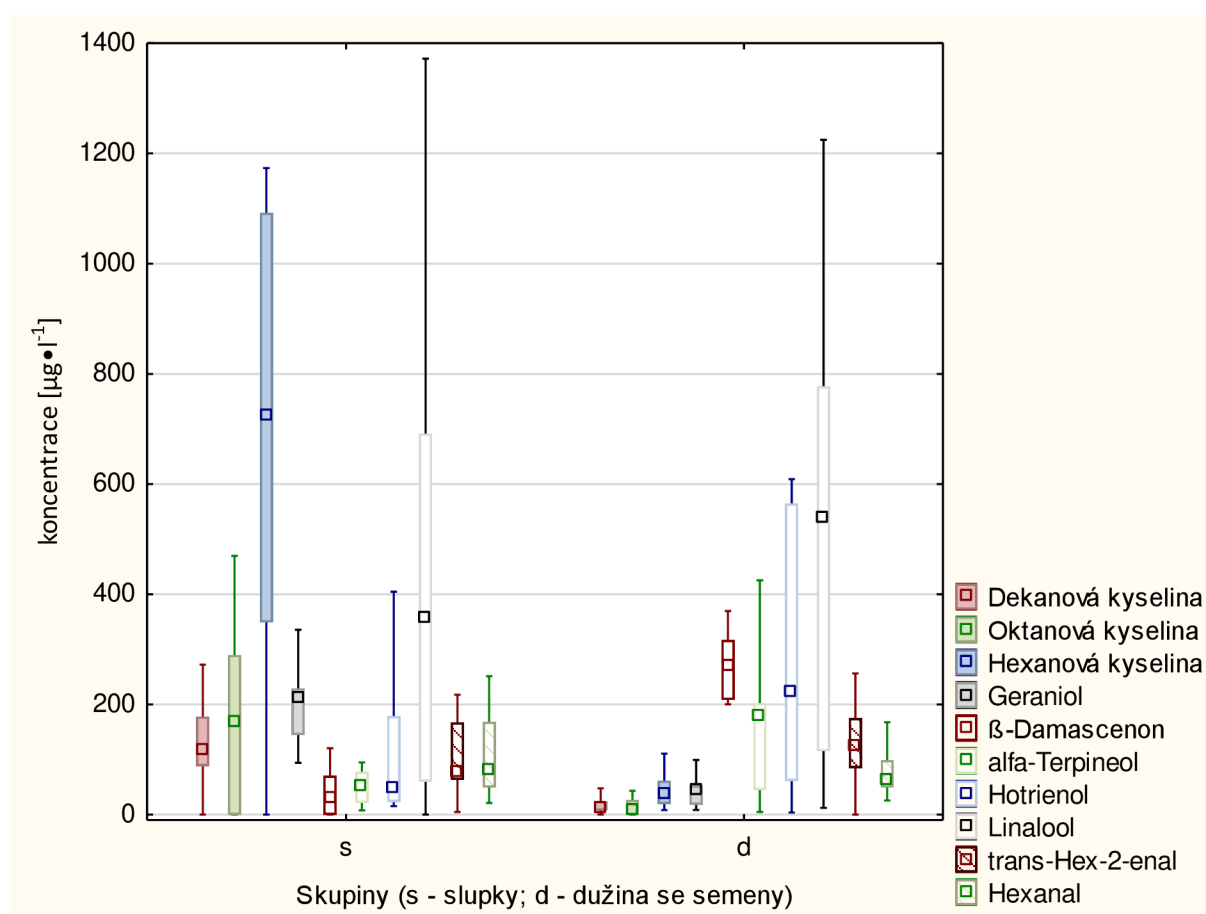
4.3.1. Sloučeniny stanovené pomocí HS-SPME-GC-MS

Slupky byly obecně na přítomnost těkavých látek bohatší než dužina se semeny. Průměrně v nich bylo identifikováno o 14 sloučenin více než v dužině. Pro další srovnání bylo vybráno 20 látek, které tvoří aroma hroznů révy vinné, jejich koncentrace jsou zobrazeny v Grafu 5 a 6.



Graf 5: Koncentrace vybraných těkavých látek ve slupkách a v dužině se semeny

Data byla statisticky analyzována pomocí neparametrického testu K-W ANOVA, který ukázal, že na hladině spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) se tyto dvě skupiny od sebe vzájemně signifikantně liší v obsahu těchto látek: oktanal, 1-hexanol, trans-2-hexenol, diallyl disulfid, hotrienol, α -terpineol, α -farnesen, citronellol, β -damascenon, geraniol, 2,3,6- trimethylnaftalen a kyseliny hexanová, oktanová a n-dekanová. Přičemž diallyl disulfid, α -farnesen a citronellol byly nalezeny pouze ve vzorcích slupek. Lze tedy předpokládat, že tyto látky jsou pouze ve slupce hroznu a v dužině se nenachází. Toto tvrzení podporuje také práce Perestrelo a kol. [70], ve které byly při stanovování těkavých látek v odrůdách Bastardo a Bual, citronellol nalezen pouze ve slupkách obou odrůd. Dužina se semeny však byla v porovnání se slupkami bohatší na oktanal, hotrienol, α -terpineol a β -damascenon. Oproti tomu obsahovala dužina menší množství ostatních výše zmíněných sloučenin. Průměrně bylo také ve frakci slupek identifikováno 56 látek a v dužině průměrně o 12 látek méně.



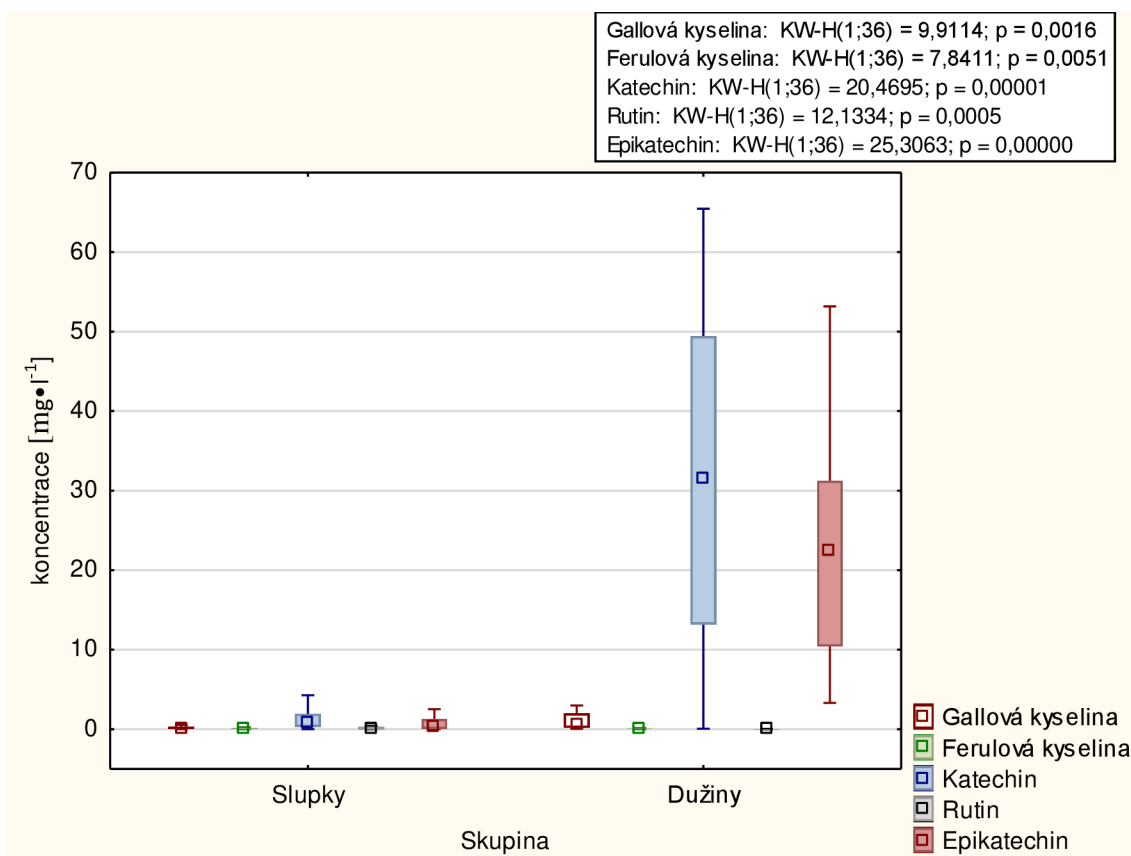
Graf 6: Koncentrace vybraných těkavých látek ve slupkách a v dužině se semeny

4.3.2. Sloučeniny stanovené pomocí HPLC-MS

Metodou HPLC-MS byly stanoveny fenolické látky v extraktu ze slupek a dužin se semeny. Skupiny extraktů byly porovnány na základě koncentrací kyseliny gallové, kyseliny ferulové, katechinu, epikatechinu a rutinu. Kruskal-Wallis ANOVA prokázala na hladině spolehlivosti ($\alpha = 0,05$), s p hodnotou menší než 0,05 (viz Graf 7), signifikantní rozdíly v obsahu těchto 5 látek. Tento rozdíl lze vidět v Grafu 7, a to především u katechinu a epikatechinu. Obsah všech fenolických látek byl v dužině se semeny vyšší než ve slupce. Průměrná koncentrace

epikatechinu v dužině se semeny byla cca 23krát vyšší než ve slupkách, podobně byla v této frakci téměř 18krát vyšší průměrná koncentrace katechinu, než ve slupkách a 5krát vyšší průměrná koncentrace kyseliny gallové. Tyto markantní rozdíly mohly být alespoň částečně způsobeny tím, že obě frakce byly před extrakcí homogenizovány a došlo tedy k narušení struktury semen, jakožto bohatého zdroje těchto látek, a tím k lepší extrakci.

Katechin, epikatechin, rutin i kyseliny gallová a ferulová se běžně nachází ve slupkách, dužině i semenech hroznů, což potvrzuje článek Farhadi a kol. [75], ve kterém bylo analyzováno několik odrůd révy vinné.



Graf 7: Obsah vybraných fenolických látek ve slupce a dužině se semeny

4.4. Porovnání odrůd

V této práci bylo analyzováno 18 vzorků čtyř odrůd *Vitis vinifera*: Hibernál (6 vzorků), Johanniter (4 vzorky), Ryzlink rýnský (4 vzorky) a Aurelius (4 vzorky) (viz Tabulka 6). Odrůdy byly vzájemně porovnány na základě obsahu vybraných analyzovaných látek. Tabulka 12 a 13 obsahuje mediány koncentrací kvantifikovaných látek pro každou odrůdu.

4.4.1. Kvalitativní analýza

Pro každou z těchto odrůd byla provedena kvantitativní analýza bioaktivních látek pomocí HS-SPME-GC-MS. Bylo detekováno 63 těkavých látek napříč všemi odrůdami, jejich přehled je uveden v Tabulce 13. Každá odrůda má své specifické aroma, to je tvořeno celou řadou látek. Jejich kombinace a obsažené množství v hroznech se tedy může mezi odrůdami lišit. I drobné změny v obsahu jedné látky mohou vytvořit významné odlišnosti v aroma.

Tabulka 12: Přehled detekovaných těkavých látek

RT [min]	Sloučenina	Hi		Jo		RR		Au	
		S	D	S	D	S	D	S	D
7,36	Hexanal	x	x	x	x	x	x	x	x
9,16	β-Pinen	x	x	x	nd	x	x	x	x
9,86	5-Methyl-2-hexanon	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10,02	2-Heptanon	nd	nd	nd	x	nd	x	nd	x
10,08	Methyl hexanoát	x	x	x	nd	nd	nd	x	x
10,15	β-Terpinyl acetát	x	nd	nd	nd	nd	nd	x	x
10,27	D-Limonen	x	x	x	nd	x	x	x	x
10,97	trans-Hex-2-enal	x	x	x	x	x	x	x	x
11,34	Ethyl hexanoát	x	x	x	x	nd	nd	x	nd
11,51	2-Fenethyl hexanoát	x	x	nd	nd	nd	nd	x	nd
11,90	o-Cymen	x	x	x	nd	x	x	nd	nd
12,67	Terpinolen	nd	x	nd	nd	nd	x	nd	nd
12,79	Oktanal	x	x	x	x	x	x	x	x
13,05	Dihydrokarveol	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13,73	cis-Hept-2-enal	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14,32	6-Methyl-5-hepten-2-on	x	x	x	x	x	x	x	x
14,93	1-Hexanol	x	x	x	x	x	x	x	x
15,64	3-Methyl-4-penten-1-ol	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
16,08	Methyl oktanoát	nd	nd	nd	x	x	nd	nd	nd
16,22	Nonanal	x	x	x	x	x	x	nd	x
16,95	trans-2-Hexenol	x	x	x	x	x	x	x	x
17,63	trans-2-Oktenal	x	x	nd	x	x	x	x	x
17,82	Ethyl oktanoát	x	x	nd	nd	x	nd	nd	nd
18,22	Linalool oxide	x	x	nd	x	nd	x	nd	x
18,44	1-Okten-3-ol	x	x	x	x	x	x	x	x
18,88	trans,trans-2,4-Heptadienal	x	x	x	nd	nd	x	nd	x
18,96	3,5-Dimethyl-1-hexen	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19,07	Nerol oxide	x	x	nd	x	x	x	nd	x
19,29	Diallyl disulfid	x	nd	x	nd	x	nd	x	nd
19,64	Dekanal	x	nd	x	x	x	nd	x	nd
19,82	2-Ethylhexanol	x	nd	nd	x	nd	nd	nd	x
20,23	β-Bourbonen	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
20,77	Benzaldehyd	x	x	x	x	x	x	x	nd
21,14	trans-2-Nonenal	x	x	x	x	x	x	x	x
21,59	Linalool	x	x	x	x	x	x	x	x
21,97	1-Oktanol	x	x	x	x	x	x	x	x

RT – retenční čas; S – slupky; D – dužina se semeny; x – detekováno; nd – nebylo detekováno; Hi – Hibernál; Jo – Johaniter; RR – Ryzlín rýnský; Au – Aurelius

Tabulka 12 – pokračování: Přehled detekovaných těkavých látek

RT [min]	Sloučenina	Hi		Jo		RR		Au	
		S	D	S	D	S	D	S	D
22,90	Methyl dekanóát	x	nd	x	nd	x	nd	x	x
22,69	Geranyl vinyl ether	nd	nd	nd	x	nd	nd	nd	nd
23,34	Terpinen-4-ol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	x	nd
23,54	Hotrienol	x	x	x	x	x	x	x	x
25,49	1-Nonanol	x	x	x	x	x	nd	x	x
16,42	2,4-Nonadien-1-al	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
27,13	α -Terpineol	x	x	x	x	x	x	x	x
28,44	β -Citral	x	nd	x	nd	x	nd	x	nd
28,89	α -Farnesen	x	nd	x	nd	x	nd	x	nd
29,31	δ -Cadinen	x	nd	x	nd	x	nd	nd	nd
29,83	Epoxylonallol	nd	x	x	nd	nd	x	nd	nd
29,99	Citronellol	x	nd	x	nd	x	nd	x	nd
30,39	Lavandulol	nd	nd	x	nd	nd	nd	nd	nd
31,21	Nerol	x	nd	nd	nd	nd	x	x	nd
31,71	β -Damascenon	x	x	x	x	x	x	x	x
31,96	α -Ionone	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd
32,73	Geraniol	x	x	x	x	x	x	x	x
33,02	Hexanová kyselina	x	x	x	x	x	x	x	x
33,55	Benzyl alkohol	x	x	x	x	x	x	x	x
34,55	Fenylethyl alkohol	x	x	x	x	x	x	x	x
35,18	β -Ionon	x	x	x	x	x	x	x	x
37,22	β -Ionon epoxid	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
38,59	Oktanová kyselina	x	x	x	nd	x	x	x	x
39,18	2,3,6-Trimethylnaftalen	x	x	x	x	x	x	x	x
40,19	Olivetol	nd	nd	nd	x	nd	x	x	nd
41,56	Eugenol	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd
43,27	Dekanová kyselina	x	x	x	x	x	x	x	x

RT – retenční čas; S – slupky; D – dužina se semeny; x – detekováno; nd – nebylo detekováno; Hi – Hibernál; Jo – Johanniter; RR – Ryzlín rýnský; Au – Aurelius

Nejvíce látek bylo detekováno v odrůdě Hibernál, konkrétně 55 sloučenin ve slupkách a 41 sloučenin v dužině a semenech. V ostatních odrůdách: v Johanniteru 39 látek ve slupkách a 33 v dužině, ve slupkách Ryzlinku 38 sloučenin, v dužině 35 sloučenin a v odrůdě Aurelius 36 sloučenin ve slupkách a v dužině pouze 32 sloučenin.

4.4.2. Kvantifikace vybraných sloučenin

Průměrné koncentrace vybraných látek byly porovnány s literaturou. Nejvyšší průměrná koncentrace hexanalů byla experimentálně stanovena ve slupce ($175 \pm 47 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a dužině ($88 \pm 60 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) odrůdy Hibernál. Sánchez-Palomo a kol. [58] uvádí koncentraci hexanalů ve

slupkách $2291,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($\pm 10,5\%$) a v dužině $394,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($\pm 4,4\%$) muškátových odrůd. Také uvádí koncentraci trans-2-hexenal ve slupkách $1477,6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($\pm 4,6\%$) a v dužině $313,8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ($\pm 4,1\%$). Nejvyšší experimentálně stanovená hodnota koncentrace byla $172\pm 25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ve slupce a $192\pm 179 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabulka 13: Průměrná koncentrace vybraných sloučenin ve slupkách jednotlivých odrůdách

	Sloučenina	Hibernal	Johanniter	Ryzlík rýnský	Aurelius
Těkavé látky					
Průměrná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Hexanal	175 ± 47	51 ± 7	63 ± 25	47 ± 28
	β -Pinen	17 ± 9	15 ± 2	10 ± 4	4 ± 3
	D-Limonen	9 ± 6	7 ± 1	7 ± 5	4 ± 3
	trans-Hex-2-enal	172 ± 25	73 ± 10	77 ± 17	42 ± 19
	Oktanal	3 ± 0	3 ± 0	24 ± 32	2 ± 1
	1-Hexanol	168 ± 48	40 ± 16	86 ± 93	20 ± 9
	trans-2-Hexenol	63 ± 27	9 ± 8	21 ± 5	12 ± 4
	Diallyl disulfid	4 ± 3	3 ± 3	0 ± 0	1 ± 3
	Linalool	539 ± 458	120 ± 81	638 ± 253	83 ± 53
	1-Oktanol	7 ± 1	8 ± 4	31 ± 38	4 ± 1
	Hotrienol	257 ± 139	25 ± 13	49 ± 3	22 ± 3
	α -Terpineol	70 ± 21	14 ± 5	113 ± 66	30 ± 11
	α -Farnesen	14 ± 34	0 ± 0	9 ± 11	30 ± 60
	Citronellol	17 ± 14	22 ± 16	11 ± 6	2 ± 4
	β -Damascenon	45 ± 56	29 ± 23	141 ± 137	20 ± 26
	Geraniol	182 ± 32	327 ± 148	260 ± 53	115 ± 14
	Hexanová kyselina	1438 ± 761	165 ± 152	647 ± 172	468 ± 295
Oktanová kyselina	159 ± 193	75 ± 87	464 ± 524	178 ± 171	
2,3,6-Trimethylnaftalen	19 ± 15	13 ± 15	21 ± 2	13 ± 9	
Dekanová kyselina	213 ± 164	69 ± 46	99 ± 27	118 ± 43	
Fenolické látky					
Průměrná koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Gallová kyselina	$0,15 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,16$	$0,08 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,01$
	Ferulová kyselina	$0,43 \pm 0,84$	$0,19 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,06$
	Katechin	$2,15 \pm 4,12$	$2,40 \pm 2,00$	$2,10 \pm 1,72$	$0,32 \pm 0,20$
	Rutin	$0,17 \pm 0,15$	$0,08 \pm 0,10$	$0,34 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,02$
	Epikatechin	$1,09 \pm 1,89$	$1,44 \pm 1,81$	$1,26 \pm 1,02$	$0,29 \pm 0,21$

Tabulka 14: Průměrná koncentrace vybraných sloučenin v dužině se semeny jednotlivých odrůdách

	Sloučenina	Hibernal	Johanniter	Ryzlík rýnský	Aurelius
Těkavé látky					
Průměrná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Hexanal	88 ± 60	54 ± 7	52 ± 43	78 ± 55
	β -Pinen	16 ± 8	0 ± 0	14 ± 7	1 ± 3
	D-Limonen	11 ± 3	0 ± 0	7 ± 5	0 ± 1
	trans-Hex-2-enal	192 ± 179	96 ± 18	125 ± 102	111 ± 27
	Oktanal	6 ± 126	5 ± 3	14 ± 4	16 ± 38
	1-Hexanol	6 ± 1	5 ± 2	8 ± 2	7 ± 3
	trans-2-Hexenol	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 2	5 ± 2
	Diallyl disulfid	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Linalool	750 ± 286	21 ± 6	816 ± 347	154 ± 79
	1-Oktanol	5 ± 4	6 ± 1	8 ± 3	12 ± 6
	Hotrienol	599 ± 537	30 ± 9	235 ± 29	93 ± 27
	α -Terpineol	195 ± 87	6 ± 1	268 ± 122	60 ± 20
	α -Farnesen	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Citronellol	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	β -Damascenon	275 ± 254	252 ± 47	326 ± 50	227 ± 201
	Geraniol	52 ± 23	11 ± 2	67 ± 28	29 ± 13
	Hexanová kyselina	80 ± 31	10 ± 1	39 ± 3	32 ± 31
Oktanová kyselina	0 ± 19	0 ± 0	16 ± 9	26 ± 32	
2,3,6- Trimethylnaftalen	12 ± 7	8 ± 4	9 ± 1	8 ± 5	
Dekanová kyselina	19 ± 18	8 ± 1	8 ± 2	16 ± 8	
Fenolické látky					
Průměrná koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Gallová kyselina	0,41 ± 0,33	2,29 ± 0,94	0,30 ± 0,23	1,49 ± 0,93
	Ferulová kyselina	0,08 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,02 ± 0,01
	Katechin	41,04 ± 27,49	37,42 ± 8,46	17,86 ± 9,14	26,37 ± 16,17
	Rutin	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00
	Epikatechin	24,12 ± 12,71	27,24 ± 5,91	12,52 ± 6,46	28,91 ± 24,98

RT – retenční čas; S – slupky; D – dužina se semeny; x – detekováno; nd – nebylo detekováno; Hi – Hibernal; Jo – Johanniter; RR – Ryzlík rýnský; Au – Aurelius

V případě monoterpenových sloučenin uvádí studie Yue a kol. [74], která se zaměřuje na odrůdu Muštát Hamburg z různých regionů tyto hodnoty: pro limonen $9,78 \pm 0,55 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, linalool $307,41 \pm 2,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pro α -terpineol $199,13 \pm 4,71 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, což se alespoň přibližuje k naší nejvyšší experimentálně stanovené hodnotě $268 \pm 122 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší koncentrace experimentálně stanoveného geraniolu byla $327 \pm 148 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Zatímco ve studii [74] byla

nejvyšší uvedená hodnota až $453,77 \pm 148 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ geraniolu, pro citronellol byla uvedena koncentrace až $61,4 \pm 3,83 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, což je téměř 2krát více než bylo zjištěno v odrůdách analyzovaných v této práci.

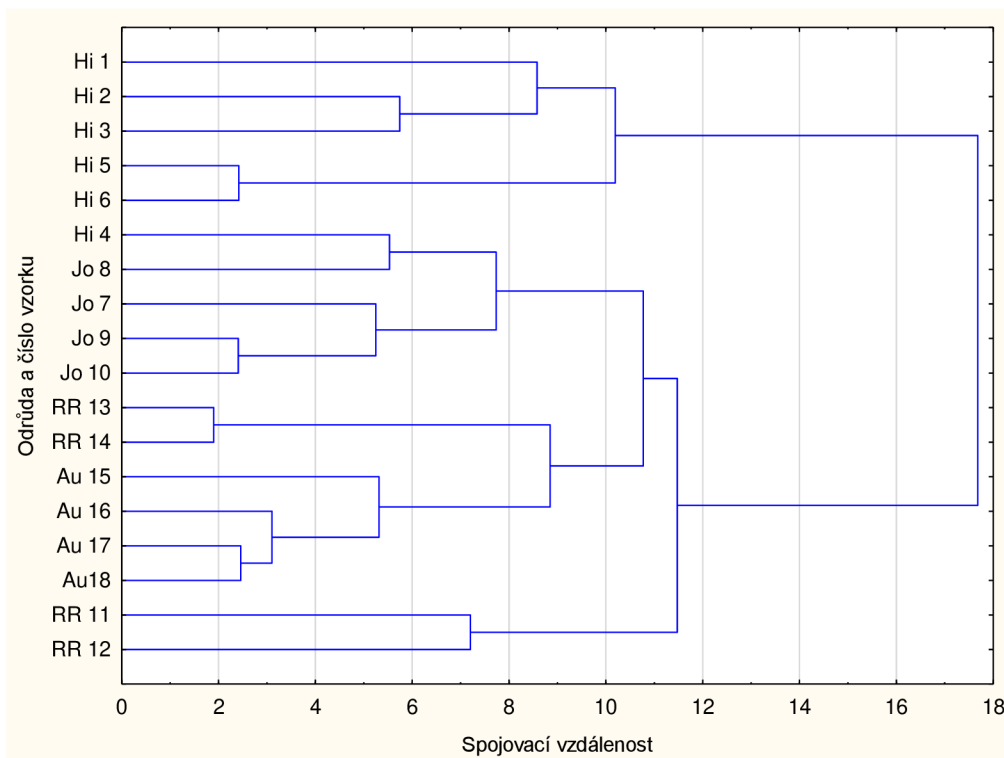
Fenolické látky v různých pletivech bobule zkoumala práce Farhadi a kol. [75]. Například kultivar Muškát Alexandria obsahoval kys. gallovou v koncentracích: $122 \pm 7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ve slupce, $109 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v dužině a $87 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v semenech. Koncentrace rutinu v této odrůdě byla $223 \pm 7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ve slupce, $78 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v dužině a v semenech $16 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Koncentrace katechinu $775 \pm 35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ve slupce, $489 \pm 27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Koncentrace epikatechinu v této odrůdě byla $412 \pm 24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ve slupce a $194 \pm 14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v dužině se semeny. Ve studii Di Lecce a kol. [76] však kys. gallová nebyla, na rozdíl od slupky a semen, v dužině odrůdy Albariño detekována. Což by mohlo znamenat, že kys. gallová se v dužině některých odrůd nemusí vyskytovat, nicméně ve vzorcích analyzovaných v této práci nebyla dužina oddělena od semen, a tím pádem nelze zjistit, jestli se ve vybraných odrůdách nachází pouze v semenech nebo i v dužině. Pro katechin a epikatechin literatura uvádí nižší hodnoty. Článek Samotich a kol. [77] uvádí v Ryzlinku $287,3 \mu\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvé hmoty katechinu a $156,8 \mu\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvé hmoty epikatechinu. Nejvyšší experimentálně stanovená hodnota pro epikatechin byla $28,91 \pm 24,98 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a $41,04 \pm 27,49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Na obsah těchto látek mohl mít vliv methanol, jako použité rozpouštědlo. Literatura také uvádí, že semena hroznů, která byla ve frakci s dužinou, obsahují více katechinu a epikatechinu než slupka [78].

4.4.3. Shluková analýza

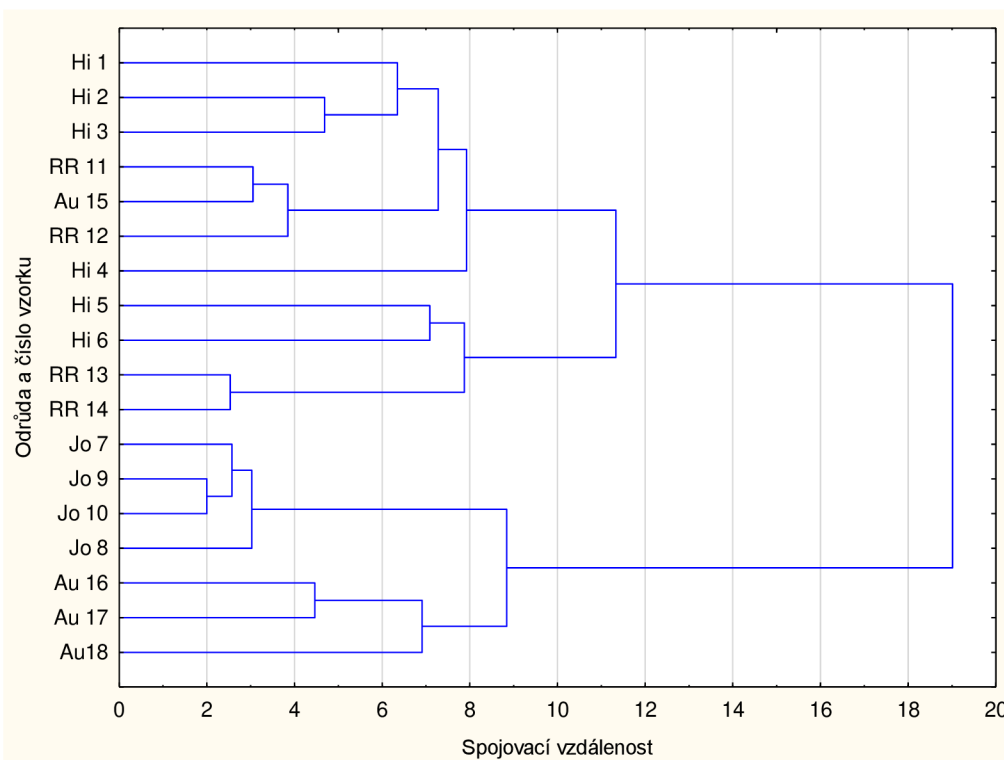
Pro obě frakce byly vytvořeny dendrogramy na základě obsahu vybraných fenolických a těkavých látek. V Grafu 8 lze vidět, že se odrůdy podle tohoto kritéria opravdu shlukují do skupin. Vzorky číslo 13 a 14 odrůdy Ryzlink rýnský (viz Tabulka 6) jsou spojeny na celkově nejnižší vzdálenosti, která je menší než 2. S dalšími dvěma vzorky ryzlinku se spojují až ve spojovací vzdálenosti cca 11,5, to ale mohlo být způsobeno odlišnou geografii pěstování. Vzorky 13 a 14 pochází ze Znojemske podoblasti, kdežto vzorky 11 a 12 z Velkopavlovické podoblasti. Vzorky Hibernalu tvoří, kromě vz. 4, celou jednu ze dvou větví dendrogramu a byly si tedy v obsahu vybraných látek podobné. Jedinou výjimkou je Hibernál č. 4, který se přiřadil spíše k odrůdě Johanniter. Vzorky odrůdy Aurelius rozdělují již dříve zmíněné vzorky ryzlinku a ve vzdálenosti cca 9,5 se s nimi shlukují.

Graf 9 znázorňuje dendrogram vytvořený pro dužiny se semeny. Na rozdíl od Grafu 8 se zde odrůdy více promíchaly a netvoří už tak celistvé skupiny. I přes to se všechny 4 vzorky Johanniteru shlukují ve vzdálenosti 3 a následně se shlukují ve vzdálenosti cca 9 se třemi vzorky odrůdy Aurelius, které tvoří skupinky. Pouze Aurelius č. 15 se nachází v druhé z hlavních větví a byl nejdříve spojen se vzorky Ryzlinku a Hibernalu. Vzorky Ryzlinku rýnského se jako v předchozím případě rozdělily podle geografického původu. Odrůda Hibernál vytvořila dvě skupiny spojující se ve vzdálenosti cca 10,5. Všechny vzorky tvořící polovinu horní větve, od Hibernalu č. 1 po Hibernál č. 4, mají společného jmenovatele, a tím je Velkopavlovická podoblast. Vzorky tvořící druhou část této větve (Hibernál č. 5 a 6, Ryzlink rýnský č. 13 a 14) pochází z podoblasti Znojemske. Právě geografický původ by mohl být rozhodujícím faktorem, který v tomto případě tyto vzorky spojuje. Nelze také pominout fakt, že odrůdy Hibernál,

Johanniter i Aurelius vznikly křížením Ryzlinku rýnského s dalšími odrūdami, a proto jejich podobnost může být velká.



Graf 8: Dendrogram pro frakci slupek (Hi – Hibernál; Jo – Johanniter; RR – Ryzlink rýnský; Au – Aurelius)



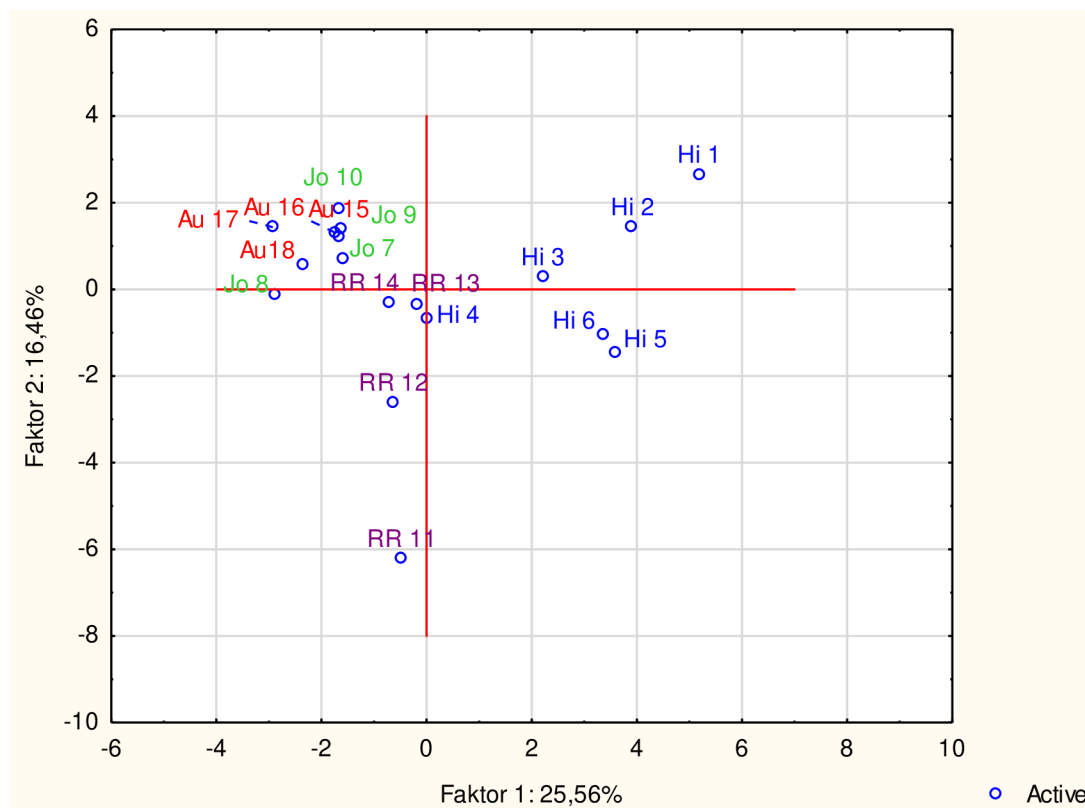
Graf 9: Dendrogram pro frakci dužiny se semeny (Hi – Hibernál; Jo – Johanniter; RR – Ryzlink rýnský; Au – Aurelius)

4.4.4. Analýza hlavních komponent

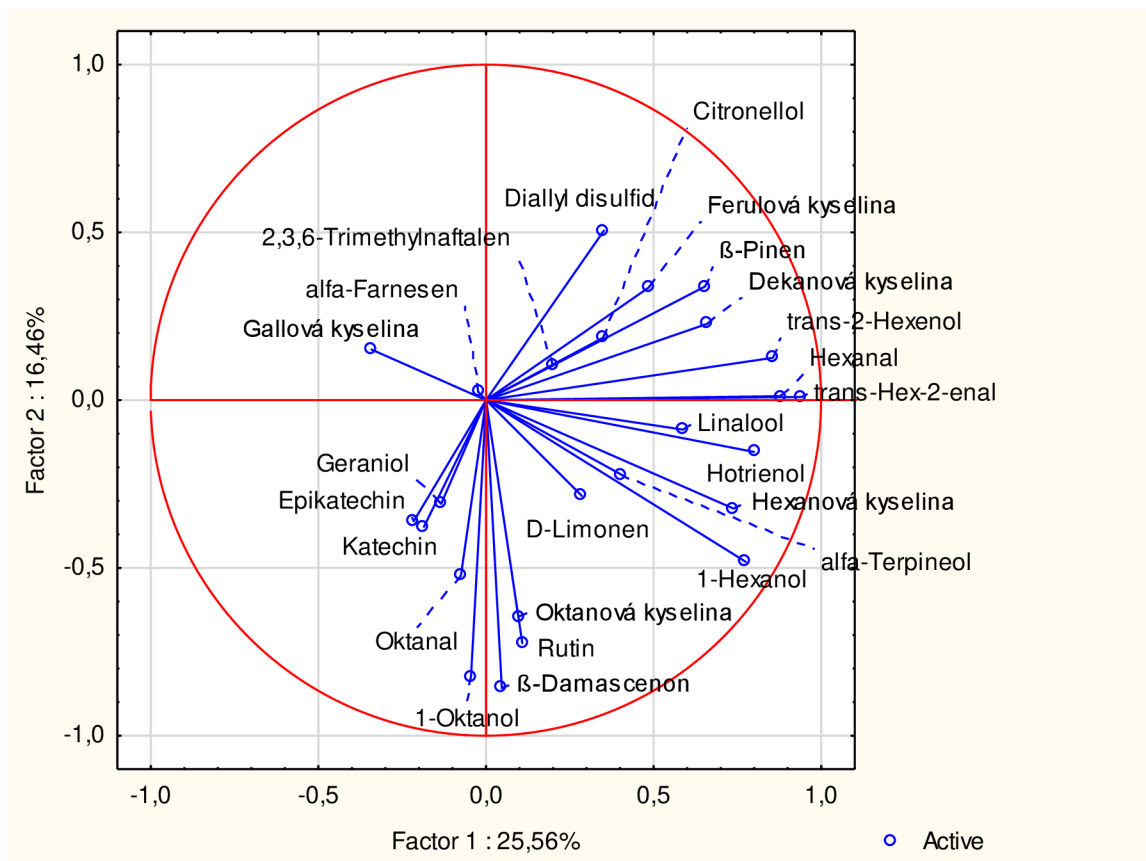
Pro grafické zobrazení analýzy hlavních komponent (PCA) byly podle hodnot „Eigenvalues“ korelačních matic vybrány dva projekční faktory (1 a 2), tak aby obsahovaly co nejvíce celkové variability.

Z Grafu 10 je patrné, že odrůda Hibernál byla jako jediná vyprojektována do oblasti s pozitivním skóre pro faktor 1. Všechny ostatní odrůdy byly naopak zobrazeny do oblasti se záporným skóre pro tuto komponentu. Dá se tedy říci, že vzorky č. 1, 2 a 3, odrůdy Hibernál v porovnání s ostatními odrůdami mají vyšší obsah citronellolu, 2,3,6-trimethylnaftalenu, β -pinenu a také kyseliny ferulové a dekanové. Všechny sloučeniny byly v Grafu 11 vyprojektovány do stejného kvadrantu jako zmíněné vzorky.

Vzorky Hibernálu č. 5 a 6 jsou současně v oblasti se záporným skóre pro faktor 2, proto by obsah linaloolu, hotrienolu, kyseliny hexanové, α -terpineolu a 1-hexanolu v nich měl být vyšší než u ostatních vzorků. Hibernál č. 4 byl zobrazen přímo na ose y blízko středu, což by odpovídalo vyššímu obsahu α -farnesenu. Všechny vzorky Ryzlinku rýnského se nachází v kvadrantu se záporným skóre pro obě komponenty, a oproti ostatním odrůdám je v nich obsaženo vyšší množství epikatechinu, katechinu, geraniolu, oktanolu a 1-oktanolu. Kromě Johanniteru č. 8, všechny vzorky Aurelia a Johanniteru leží v kvadrantu s kladným skóre pro komponent 2 a záporným skóre pro faktor 1, což naznačuje, že jsou si v obsahu těchto látek podobné. Mají v porovnání s ostatními více kyseliny gallové a obsahují menší množství látek jako linalool a hotrienol, které byly v Grafu 11 zobrazeny v protějším kvadrantu.



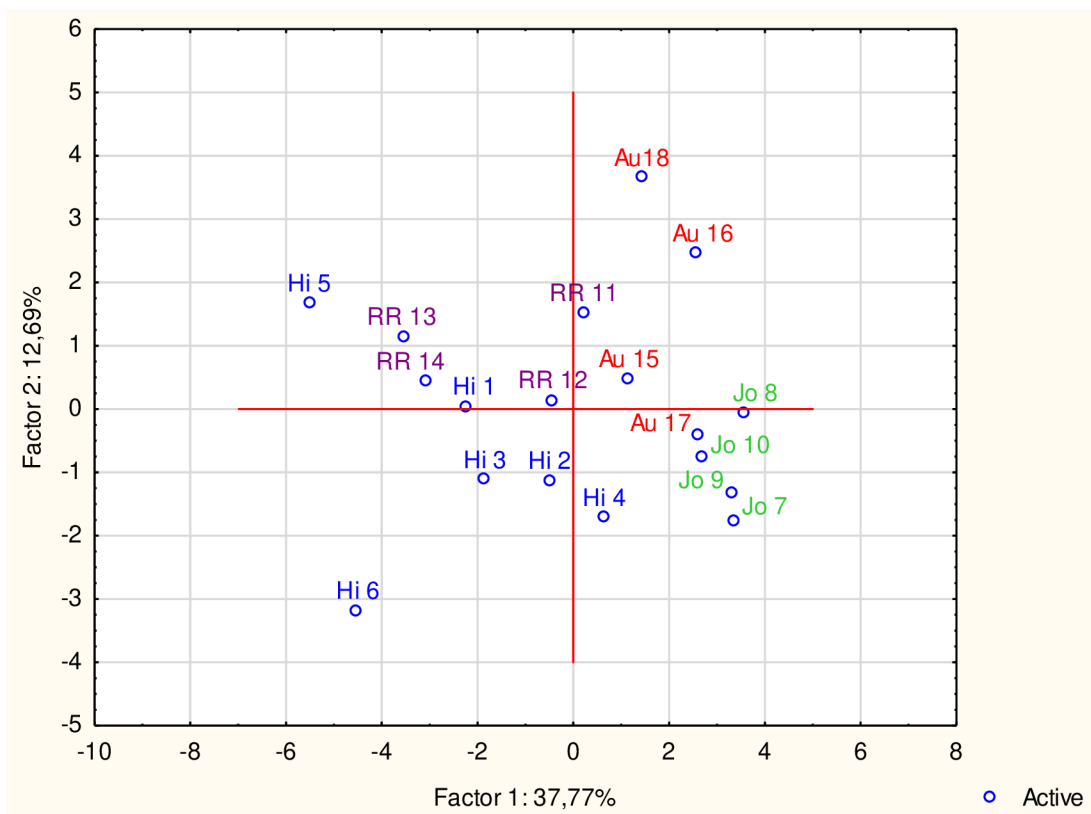
Graf 10: Projekce případů (vzorky-odrůdy) do faktorové roviny 1 a 2 (frakce slupek)



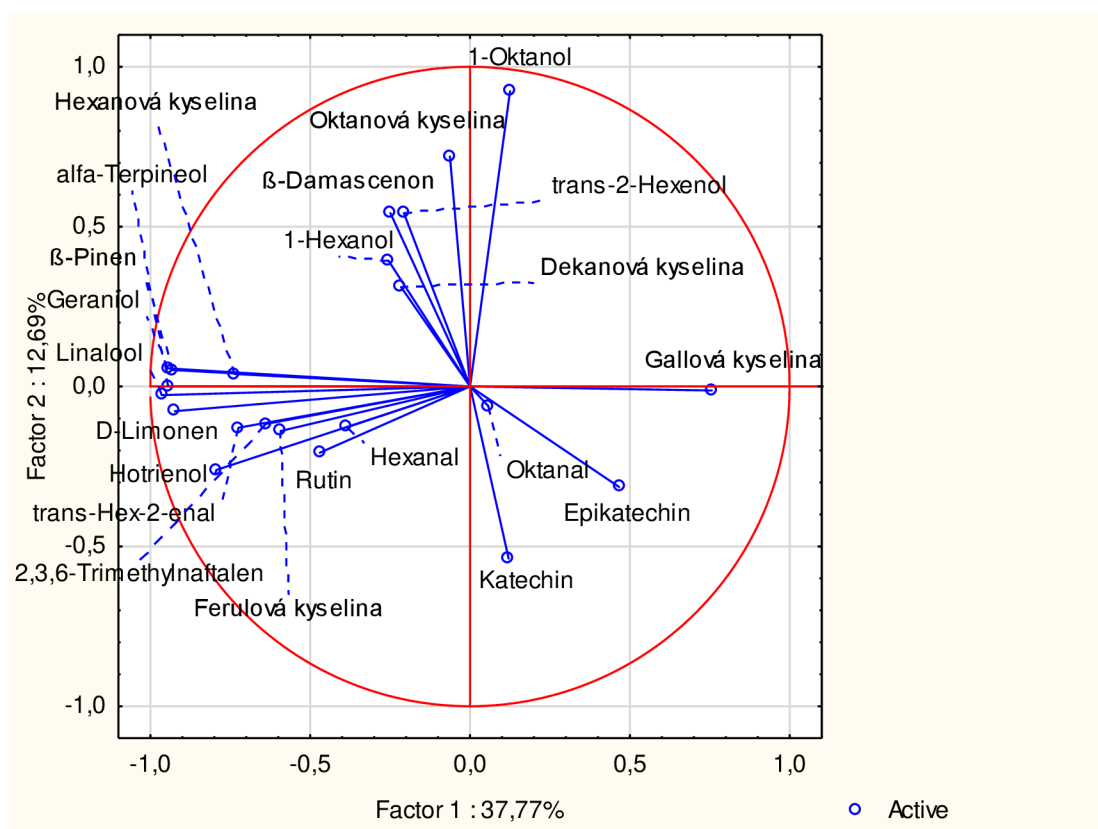
Graf 11: Projekce proměnných (vybrané sloučeniny) do faktorové roviny 1 a 2 (frakce slupek)

Vzhledem k tomu, že citronellol, diallyl disulfid a α -farnesen, nebyly v dužině se semeny vůbec nalezeny, byly tyto sloučeniny z analýzy PCA vynechány. Podle Grafu 12 a 13 obsahují vzorky dužiny se semeny odrůdy Johanniter v porovnání s ostatními vyšší množství kyseliny gallové (zejména vzorek č. 8) a epikatechinu. Podobně je na tom i Aurelius č. 17. Ostatní vzorky Aurelia jsou vyprojektovány v kvadrantu s kladným skóre pro obě komponenty, kde je v Grafu 12 vykreslen také 1-oktanol. Vzorky dužiny Hibernalu byly v obsahu vybraných látek nesourodé. Hibernál č. 4 má oproti ostatním vyšší obsah katechinu. Celkově se dužiny odrůdy Hibernál vyznačují oproti ostatním spíše vyšším obsahem látek vyprojektovaných v kvadrantu se záporným skóre pro oba faktory (např. hexanal, rutin, 2,3,6-trimethylnaftalenu, atd). Vzorky Ryzlinku byly vyprojektovány v horní části Grafu 12 s kladným skóre pro komponentu 2. Vzorky 11 a 12 byly znázorněny v blízkosti osy y, což by odpovídalo vyššímu obsahu např. kyseliny oktanové, 1-oktanolu a trans-2-hexenolu, v porovnání se zbylými dvěma vzorky Ryzlinku, u kterých převládají jako hlavní složky spíše linalool, geraniol, β -pinen, α -terpineol a kyselina hexanová.

Rozdíly mezi vzorky v rámci jedné odrůdy mohly být způsobeny různým geografickým původem, a s tím souvisejícím mikroklimatem, různým úhrnem srážek atd.



Graf 12: Projekce případů (vzorky-odrůdy) do faktorové roviny 1 a 2 (frakce dužina se semeny)



Graf 13: Projekce proměnných (vybrané sloučeniny) do faktorové roviny 1 a 2 (frakce dužina se semeny)

5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá stanovením vybraných bioaktivních látek v hroznech révy vinné. Celkově bylo analyzováno 18 vzorků hroznů odrůd Hibernál, Johanniter, Ryzlink rýnský a Aurelius. Každý vzorek byl ještě rozdělen na slupky a dužinu se semeny, které byly dále analyzovány samostatně pomocí metod HS-SPME-GC-MS a HPLC-MS.

Pro každou z frakcí hroznů byla nejprve vybrána optimální metoda extrakce. Pro HPLC-MS byly testovány 4 různé druhy extrakce. S ohledem na celkovou integrovanou plochu píků a počet identifikovaných látek byla pro obě frakce vybrána extrakční metoda č.3, která jako extrakční činidlo využívá 75% methanol. Pro HS-SPME-GC-MS byl testován přídavek nasyceného roztoku NaCl, teplota extrakce a působení ultrazvuku. Na základě celkové integrované plochy píků, četnosti identifikací vybraných sloučenin a statistické analýzy byly vybrány tyto parametry extrakce pro slupky: teplota extrakce 70 °C, bez přídatku roztoku NaCl a bez působení ultrazvuku; pro dužinu se semeny: teplota extrakce 70 °C, přídavek roztoku NaCl v poměru 1:1, bez působení ultrazvuku.

Za využití 11 standardů těkavých látek a 4 standardů fenolických látek byla ověřena linearita v předpokládaném rozmezí. Pro těkavé látky byla linearita ověřena v rozsahu 5–1000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ s koeficientem spolehlivosti R^2 v rozmezí 0,8632–0,9999. Obdobně byla linearita ověřena pro fenolické látky od 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ do 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ s koeficientem spolehlivosti R^2 0,9650–0,9989. Takto optimalizovanými metodami byly analyzovány vzorky všech odrůd.

Na základě retenčních časů, hmotnostních spekter, srovnáním s knihovnou spekter bylo napříč všemi odrůdami identifikováno celkem 63 těkavých a 9 fenolických látek. Z nich byli vybráni zástupci obou skupin (20 těkavých látek a 5 fenolických látek). Na základě množství vybraných sloučenin byla následně provedena analýza rozptylu, shluková analýza a analýza hlavních komponent pro jednotlivé vzorky.

Podle výsledků vyplývajících z těchto analýz se dá říci, že frakce hroznů se od sebe v obsahu některých vybraných látek liší. Obsah vybraných fenolických látek byl signifikantně vyšší v dužině se semeny, kdežto v případě těkavých látek 3 z vybraných zástupců nebyly v dužině nalezeny vůbec.

Porovnávání vzorky obou frakcí se podle obsahu vybraných látek rozčlenily ve shlukové analýze i analýze hlavních komponent do skupin odpovídajících dané odrůdě. Některé odchylky mohly být způsobeny geografickým původem vzorků, a s tím spojenými odlišnými podmínkami pro vývoj a dozrávání hroznů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PAVLOUŠEK, Pavel. *Encyklopedie révy vinné*. Brno: Computer Press, 2007. ISBN 978-80-251-1704-0.
- [2] HLUŠEK, Jaroslav; BAROŇ, Mojmír; BURG, Patrik; LOŠÁK, Tomáš; PAVLOUŠEK, Pavel et al. *Réva vinná*. Praha: Profi Press, 2015. ISBN 978-80-86726-67-0.
- [3] *Situační a výhledová zpráva: Réva vinná a víno*. PDF. Ministerstvo zemědělství, 2023.
- [4] PAVLOUŠEK, Pavel. *Bio odrůdy révy vinné*. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 97880-247-4330-1.
- [5] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, c2011. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [6] KRAUS, Vilém; FOFFOVÁ, Zuzana a WURM, Bohumil. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, c2005-c2008. ISBN 80-867-6700-0.
- [7] PAVLOUŠEK, Pavel a LAMPÍŘ, Lubomír. *Réva vinná: pro malopěstitele*. Olomouc: Agriprint, 2016. ISBN 978-80-87091-65-4.
- [8] MONTEIRO, Ana I.; MALHEIRO, Aureliano C. a BACELAR, Eunice A. Morphology, Physiology and Analysis Techniques of Grapevine Bud Fruitfulness: A Review. Online. *Agriculture*. 2021, roč. 11, č. 2, s. 1-5. ISSN 2077-0472. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/agriculture11020127>. [cit. 2024-02-25].
- [9] BODOR-PESTI, Péter; TARANYI, Dóra; DEÁK, Tamás; NYITRAINÉ SÁRDY, Diána Ágnes a VARGA, Zsuzsanna. A Review of Ampelometry: Morphometric Characterization of the Grape (*Vitis* spp.) Leaf: Morphometric Characterization of the Grape (*Vitis* spp.) Leaf. Online. *Plants*. 2023, roč. 12, č. 3, s. 1. ISSN 2223-7747. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants12030452>. [cit. 2024-02-25].
- [10] MAZADE, Marcel. *First steps in ampelography: a guide to facilitate the recognition of vines, by Marcel Mazade ... Tr. by Raymond Dubois ... and W. Percy Wilkinson*. Australia: R.S. Brain, government printer, 1900, 1900.
- [11] MICHLOVSKÝ, Miloš. *Bobule*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014. ISBN 978-80-9053.
- [12] KUHN, Nathalie; GUAN, Le; DAI, Zhan Wu; WU, Ben-Hong; LAUVERGEAT, Virginie et al. Berry ripening: recently heard through the grapevine. Online. *Journal of Experimental Botany*. 2013, roč. 65, č. 16, s. 4543-4559. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/ert395>. [cit. 2024-02-26].
- [13] Understanding grape berry development. *Practical winery & vineyard*. 2002, č. 4, s. 1-5. ISSN 415-479-5819.

- [14] Anatomical aspects of grape berry development. Online. *Vitis*. 1968, roč. 7, č. 2, s. 106-119. ISSN 2367-4156. Dostupné z: <https://doi.org/10.5073/vitis.1968.7.106-119>. [cit. 2023-12-17].
- [15] ROGIERS, Suzy Y.; COETZEE, Zelmari A.; WALKER, Rob R.; DELOIRE, Alain a TYERMAN, Stephen D. Potassium in the Grape (*Vitis vinifera* L.) Berry: Transport and Function. Online. *Frontiers in Plant Science*. 2017, roč. 8. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01629>. [cit. 2024-02-28].
- [16] COLOMBO, Francesca; DI LORENZO, Chiara; REGAZZONI, Luca; FUMAGALLI, Marco; SANGIOVANNI, Enrico et al. Phenolic profiles and anti-inflammatory activities of sixteen table grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. Online. *Food & Function*. 2019, roč. 10, č. 4, s. 1797-1807. ISSN 2042-6496. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C8FO02175A>. [cit. 2024-02-28].
- [17] SHIRAIISHI, Mikio; FUJISHIMA, Hiroyuki a CHIJIWA, Hiroyuki. Evaluation of table grape genetic resources for sugar, organic acid, and amino acid composition of berries. Online. *Euphytica*. 2010, roč. 174, č. 1, s. 1-13. ISSN 0014-2336. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0084-4>. [cit. 2024-02-26].
- [18] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [19] EYÉGHÉ-BICKONG, Hans A.; ALEXANDERSSON, Erik O.; GOUWS, Liezel M.; YOUNG, Philip R. a VIVIER, Melané A. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. Online. *Journal of Chromatography B*. 2012, roč. 885-886, č. 1, s. 43-49. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.011>. [cit. 2024-02-26].
- [20] RIBÂÉREAU-GAYON, Pascal. *Handbook of enology*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, c2006. ISBN 04-700-1037-1.
- [21] GONZÁLEZ-BARREIRO, Carmen; RIAL-OTERO, Raquel; CANCHO-GRANDE, Beatriz a SIMAL-GÁNDARA, Jesús. Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014, roč. 55, č. 2, s. 202-218. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.650336>. [cit. 2023-12-13].
- [22] PEYROT DES GACHONS, Catherine; TOMINAGA, Takatoshi a DUBOURDIEU, Denis. Measuring the Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc Grapes by Assaying S-Cysteine Conjugates, Precursors of the Volatile Thiols Responsible for Their Varietal Aroma. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, roč. 48, č. 8, s. 3387-3391. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf990979b>. [cit. 2023-12-21].

- [23] MELE, Mahmuda Akter; KANG, Ho-Min; LEE, Young-Tack a ISLAM, Mohammad Zahirul. Grape terpenoids: flavor importance, genetic regulation, and future potential. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021, roč. 61, č. 9, s. 1429-1447. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1760203>. [cit. 2023-12-21].
- [24] ZHAO, Xianfang; JU, Yanlun; WEI, Xiaofeng; DONG, Shuo; SUN, Xiangyu et al. Significance and Transformation of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazines Through Grapes to Wine: Olfactory Properties, Metabolism, Biochemical Regulation, and the HP–MP Cycle. Online. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 24. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24244598>. [cit. 2024-02-09].
- [25] CERRETI, M.; ESTI, M.; BENUCCI, I.; LIBURDI, K.; DE SIMONE, C. et al. Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during grape ripening of *Vitis vinifera* L. cvs Grechetto, Malvasia del Lazio and Sauvignon Blanc. Online. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2015, roč. 21, č. 3, s. 411-416. ISSN 13227130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ajgw.12152>. [cit. 2024-02-09].
- [26] FLANZY, Claude. *Oenologie. Fondements scientifiques et technologiques*. 7. Editorial Lavoisier Tec & Doc., 1999. ISBN 2-7430-0243-3.
- [27] PERESTRELO, Rosa; LU, Ying; SANTOS, Sónia A.O.; SILVESTRE, Armando J.D.; NETO, Carlos P. et al. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC–DAD–ESI–MSn. Online. *Food Chemistry*. 2012, roč. 135, č. 1, s. 94-104. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.102>. [cit. 2023-11-06].
- [28] ADAMS, Douglas O. Phenolics and Ripening in Grape Berries. Online. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2006, roč. 57, č. 3, s. 249-256. ISSN 0002-9254. Dostupné z: <https://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.3.249>. [cit. 2024-02-28].
- [29] NARDUZZI, Luca; STANSTRUP, Jan a MATTIVI, Fulvio. Comparing Wild American Grapes with *Vitis vinifera*: A Metabolomics Study of Grape Composition. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, roč. 63, č. 30, s. 6823-6834. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01999>. [cit. 2024-02-27].
- [30] WATRELOT, Aude A. a NORTON, Erin L. Chemistry and Reactivity of Tannins in *Vitis* spp: A Review. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 9, s. 1-4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25092110>. [cit. 2024-02-27].
- [31] BALÍK, Josef. *Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthocyanin pigments in grapes and wines*. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010. ISBN 978-80-7375-412-9.
- [32] COELHO, Elisabete; ROCHA, Silvia M.; BARROS, António S.; DELGADILLO, Ivonne a COIMBRA, Manuel A. Screening of variety- and pre-fermentation-related volatile

- compounds during ripening of white grapes to define their evolution profile. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2007, roč. 597, č. 2, s. 257-264. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.010>. [cit. 2024-02-29].
- [33] KALUA, Curtis M. a BOSS, Paul K. Evolution of Volatile Compounds during the Development of Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L.). Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, roč. 57, č. 9, s. 3818-3830. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf803471n>. [cit. 2024-02-27].
- [34] ILC, Tina; WERCK-REICHHART, Danièle a NAVROT, Nicolas. Meta-Analysis of the Core Aroma Components of Grape and Wine Aroma. Online. *Frontiers in Plant Science*. 2016, roč. 7. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01472>. [cit. 2024-03-30].
- [35] CATALDO, Eleonora; SALVI, Linda; PAOLI, Francesca; FUCILE, Maddalena a MATTII, Giovan Battista. Effect of Agronomic Techniques on Aroma Composition of White Grapevines: A Review. Online. *Agronomy*. 2021, roč. 11, č. 10, s. 1-5. ISSN 2073-4395. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/agronomy11102027>. [cit. 2024-03-29].
- [36] COELHO, Elisabete; COIMBRA, Manuel A.; NOGUEIRA, J.M.F. a ROCHA, Sílvia M. Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2009, roč. 635, č. 2, s. 214-221. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.013>. [cit. 2024-03-01].
- [37] SABON, Isabelle; DE REVEL, Gilles; KOTSERIDIS, Yorgos a BERTRAND, Alain. Determination of Volatile Compounds in Grenache Wines in Relation with Different Terroirs in the Rhone Valley. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 50, č. 22, s. 6341-6345. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf025611k>. [cit. 2024-03-01].
- [38] Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential:: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grape juice. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*. 2006, roč. 40, č. 1, s. 1-6. ISSN 1151-0285.
- [39] Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*. 2008, roč. 42, č. 3, s. 125-132. ISSN 1151-0285.
- [40] GONZÁLEZ ÁLVAREZ, M.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; CANCHO-GRANDE, B. a SIMAL-GÁNDARA, J. Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC-MS. Online. *Food Chemistry*. 2011, roč. 129, č. 3, s. 890-898. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.040>. [cit. 2024-03-01].

- [41] MARÍN-SAN ROMÁN, Sandra; RUBIO-BRETÓN, Pilar; PÉREZ-ÁLVAREZ, Eva P. a GARDE-CERDÁN, Teresa. Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. Online. *Food Research International*. 2020, roč. 137, č. 137, s. 109712-109712. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>. [cit. 2023-11-15].
- [42] ANDRADE-EIROA, Auréa; CANLE, Moisés; LEROY-CANCELLIERI, Valérie a CERDÀ, Víctor. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, roč. 80, s. 641-654. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>. [cit. 2023-11-20].
- [46] NEGRO, C; TOMMASI, L a MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. Online. *Bioresource Technology*. 2003, roč. 87, č. 1, s. 41-44. ISSN 09608524. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00202-X). [cit. 2023-11-06].
- [49] RUIZ, Antonieta; MARDONES, Claudia; VERGARA, Carola; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, Isidro; VON BAER, Dietrich et al. Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. Online. *Journal of Chromatography A*. 2013, roč. 1281, č. 1, s. 38-45. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.059>. [cit. 2024-03-30].
- [50] POMAR, F.; NOVO, M. a MASA, A. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 2005, roč. 1094, č. 1-2, s. 34-41. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.096>. [cit. 2024-03-30].
- [51] GENOVESE, Alessandro; GAMBUTI, Angelita; LAMORTE, Simona A. a MOIO, Luigi. An extract procedure for studying the free and glycosilated aroma compounds in grapes. Online. *Food Chemistry*. 2013, roč. 136, č. 2, s. 822-834. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.061>. [cit. 2023-11-22].
- [52] LIANG, Zijian; PAI, Ahalya; LIU, Di; LUO, Jiaqiang; WU, Jihong et al. Optimizing extraction method of aroma compounds from grape pomace. Online. *Journal of Food Science*. 2020, roč. 85, č. 12, s. 4225-4240. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15533>. [cit. 2024-02-13].
- [53] PERESTRELO, Rosa; SILVA, Catarina a CÂMARA, José S. Madeira Wine Volatile Profile. A Platform to Establish Madeira Wine Aroma Descriptors. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 17. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24173028>.
- [54] GHASTE, Manoj; NARDUZZI, Luca; CARLIN, Silvia; VRHOVSEK, Urska; SHULAEV, Vladimir et al. Chemical composition of volatile aroma metabolites and their glycosylated precursors that can uniquely differentiate individual grape cultivars. Online.

- Food Chemistry*. 2015, roč. 188, s. 309-319. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.056>. [cit. 2024-02-29].
- [55] FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. a DI STEFANO, R. Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2004, roč. 37, č. 4, s. 467-473. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.11.003>. [cit. 2024-02-29].
- [56] CABREDO-PINILLOS, S.; CEDRÓN-FERNÁNDEZ, T. a SAENZ-BARRIO, C. Comparison of Different Extraction Methods Applied to Volatile Compounds in Wine Samples Previous to the Determination by Gas Chromatography. Online. *Analytical Letters*. 2004, roč. 37, č. 14, s. 3063-3084. ISSN 0003-2719. Dostupné z: <https://doi.org/10.1081/AL-200035906>. [cit. 2024-03-11].
- [57] RIPOLL, Gabriel; VAZQUEZ, Manuel a VILANOVA, Mar. Ultraviolet – visible - near infrared spectroscopy for rapid determination of volatile compounds in white grapes during ripening. Online. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 2017, roč. 32, č. 1, s. 53-61. ISSN 2416-3953. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/ctv/20173201053>. [cit. 2024-03-28].
- [58] SANCHEZPALOMO, E; DIAZMAROTO, M a PEREZCOELLO, M. Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC-MS. Online. *Talanta*. 2005, roč. 66, č. 5, s. 1152-1157. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.01.015>. [cit. 2024-03-28].
- [59] ROSILLO, Laurentino; SALINAS, M^a Rosario; GARIJO, José a ALONSO, Gonzalo L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Online. *Journal of Chromatography A*. 1999, roč. 847, č. 1-2, s. 155-159. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00036-9). [cit. 2024-03-28].
- [60] PANIGHEL, Annarita a FLAMINI, Riccardo. Applications of Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) in the Study of Grape and Wine Volatile Compounds. Online. *Molecules*. 2014, roč. 19, č. 12, s. 21291-21309. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules191221291>. [cit. 2024-04-03].
- [61] STRATIL, Pavel; KUBÁŇ, Vlastimil a FOJTOVÁ, Jitka. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. Online. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, roč. 26, č. 4, s. 242-253. ISSN 12121800. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/1119-CJFS>. [cit. 2024-03-30].
- [62] NALEWAJKO-SIELIWONIUK, Edyta; NAZARUK, Jolanta; KOTOWSKA, Jolanta a KOJŁO, Anatol. Determination of the flavonoids/antioxidant levels in *Cirsium oleraceum* and *Cirsium rivulare* extracts with cerium(IV)-rhodamine 6G chemiluminescence detection. Online. *Talanta*. 2012, roč. 96, s. 216-222. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.028>. [cit. 2024-03-30].

- [63] LORRAIN, Bénédicte; KY, Isabelle; PECHAMAT, Laurent a TEISSEDRE, Pierre-Louis. Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. Online. *Molecules*. 2013, roč. 18, č. 1, s. 1076-1100. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules18011076>. [cit. 2024-03-31].
- [64] FERRER-GALLEGO, Raúl; HERNÁNDEZ-HIERRO, José Miguel; RIVAS-GONZALO, Julián C. a ESCRIBANO-BAILÓN, M. Teresa. Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2011, roč. 44, č. 4, s. 847-853. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.001>. [cit. 2024-03-31].
- [65] FLAMINI, Riccardo. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. Online. *Mass Spectrometry Reviews*. 2003, roč. 22, č. 4, s. 218-250. ISSN 0277-7037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mas.10052>. [cit. 2024-03-31].
- [66] LIAZID, Ali; BARBERO, Gerardo F.; PALMA, Miguel; BRIGUI, Jamal a BARROSO, Carmelo G. Rapid Determination of Simple Polyphenols in Grapes by LC Using a Monolithic Column. Online. *Chromatographia*. 2010, roč. 72, č. 5-6, s. 417-424. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1678-7>. [cit. 2024-03-31].
- [67] JARA-PALACIOS, M.J.; RODRÍGUEZ-PULIDO, F.J.; HERNANZ, D.; ESCUDERO-GILETE, M.L. a HEREDIA, F.J. Determination of phenolic substances of seeds, skins and stems from white grape marc by near-infrared hyperspectral imaging. Online. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2016, roč. 22, č. 1, s. 11-15. ISSN 13227130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ajgw.12165>. [cit. 2024-04-23].
- [68] MASA, A.; VILANOVA, M. a POMAR, F. Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 2007, roč. 1164, č. 1-2, s. 291-297. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.058>. [cit. 2024-04-23].
- [69] POZO-BAYÓN, M.A.; PUEYO, E; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J a POLO, M.C. Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction–gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines. Online. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 922, č. 1-2, s. 267-275. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00966-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00966-9). [cit. 2024-04-28].
- [70] PERESTRELO, Rosa; BARROS, António S.; ROCHA, Silvia M. a CÂMARA, José S. Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties. Online. *Talanta*. 2011, roč. 85, č. 3, s. 1483-1493. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.025>. [cit. 2023-11-20].
- [71] COMARELLA, Carine Glaucia; SAUTTER, Claudia Kaehler; DOSSIN, Mariana Ferneda a PENNA, Neidi Garcia. Ultrasound in the postharvest treatment of grapes:

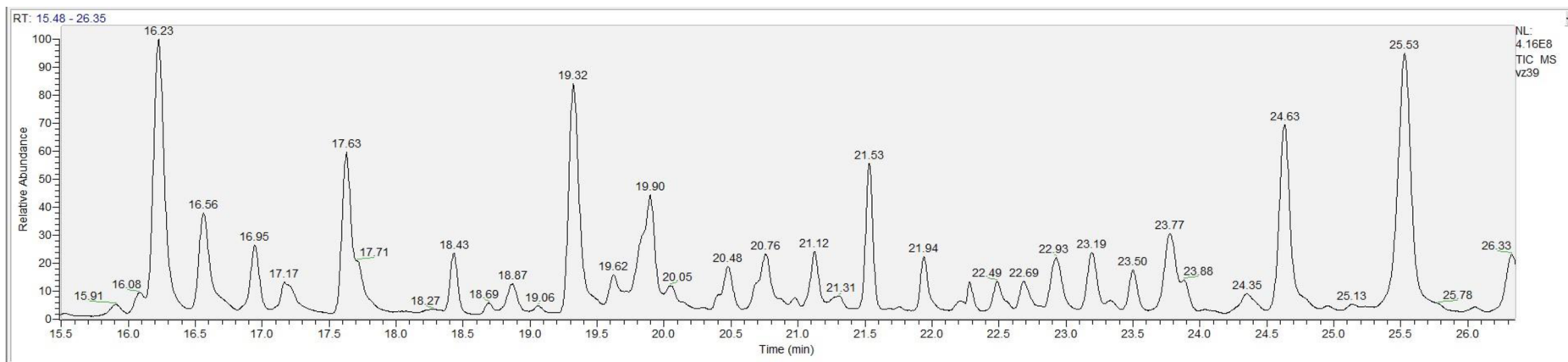
- impact on the extractability and phenolic composition of juice and wine. Online. *Semina: Ciências Agrárias*. 2018, roč. 39, č. 1, s. 143-156. ISSN 1679-0359. Dostupné z: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n1p143>. [cit. 2024-05-01].
- [72] TAO, Yang; ZHANG, Zhihang a SUN, Da-Wen. Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. Online. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014, roč. 21, č. 4, s. 1461-1469. ISSN 13504177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.029>. [cit. 2024-05-01].
- [73] MELWANKI, Mahaveer B. a FUH, Ming-Ren. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with semi-automated in-syringe back extraction as a new approach for the sample preparation of ionizable organic compounds prior to liquid chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 2008, roč. 1198-1199, s. 1-6. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.007>. [cit. 2024-05-03].
- [74] YUE, Xiaofeng; WANG, Shu; DONG, Yang; CHEN, Wei; WANG, Ying et al. Targeted metabolomics analysis based on HS-SPME-GC-MS to discriminate geographical origin of ‘Muscat Hamburg’ grape and wine. Online. *Food Research International*. 2024, roč. 181. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114120>. [cit. 2024-05-03].
- [75] FARHADI, Khalil; ESMAEILZADEH, Forough; HATAMI, Mehdi; FOROUGH, Mehrdad a MOLAIE, Rahim. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. Online. *Food Chemistry*. 2016, roč. 199, s. 847-855. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.083>. [cit. 2024-05-08].
- [76] DI LECCE, Giuseppe; ARRANZ, Sara; JÁUREGUI, Olga; TRESSERRA-RIMBAU, Anna; QUIFER-RADA, Paola et al. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. Online. *Food Chemistry*. 2014, roč. 145, s. 874-882. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.115>. [cit. 2024-05-08].
- [77] SAMOTICHA, Justyna; WOJDYŁO, Aneta a GOLIS, Tomasz. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. Online. *Food Chemistry*. 2017, roč. 215, s. 263-273. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.147>. [cit. 2024-05-11].
- [78] SERRATOSA, Maria P.; MARQUEZ, Ana; MOYANO, Lourdes; ZEA, Luis a MERIDA, Julieta. Chemical and morphological characterization of Chardonnay and Gewürztraminer grapes and changes during chamber-drying under controlled conditions. Online. *Food Chemistry*. 2014, roč. 159, s. 128-136. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.167>. [cit. 2024-05-11].

SEZNAM PŘÍLOH

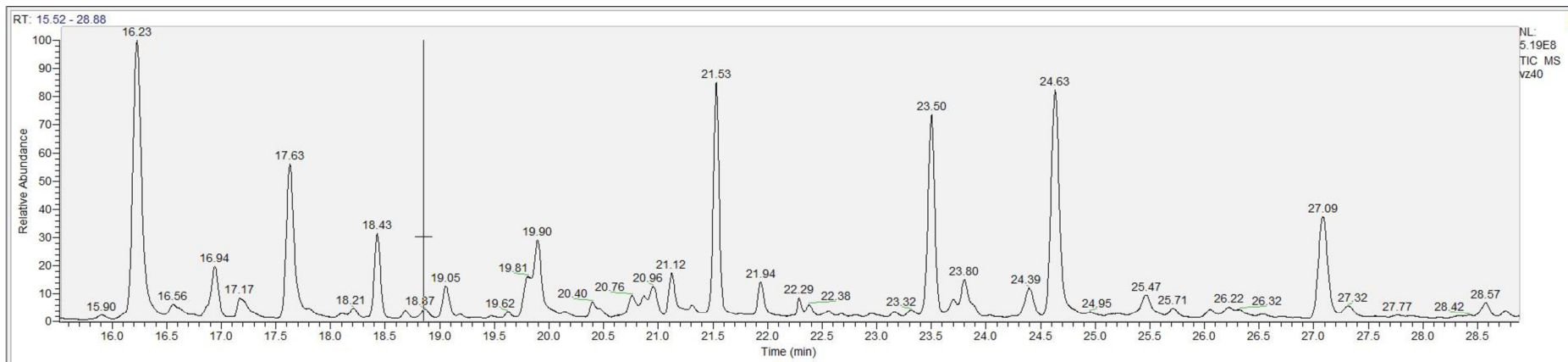
Příloha 1: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy slupek vzorku č. 18 pomocí HS-SPME-GC-MS	61
Příloha 2: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy dužiny se semeny vzorku č. 18 pomocí HS-SPME-GC-MS.....	61
Příloha 3: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy slupek vzorku č. 3 pomocí HPLC-MS	62
Příloha 4: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy dužiny se semeny vzorku č. 14 pomocí HPLC-MS.....	62

PŘÍLOHY

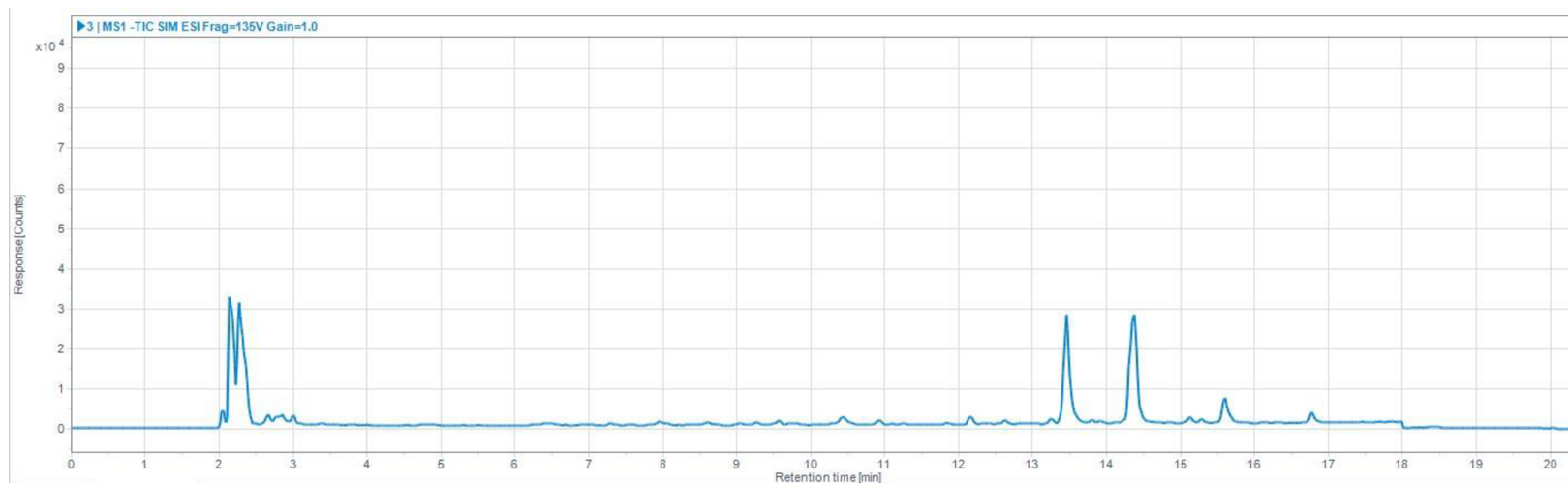
Příloha 1: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy slupek vzorku č. 18 pomocí HS-SPME-GC-MS; (identifikace sloučenin viz Tabulka 14)



Příloha 2: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy dužiny se semeny vzorku č. 18 pomocí HS-SPME-GC-MS; (identifikace sloučenin viz Tabulka 14)



Příloha 3: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy slupek vzorku č. 3 pomocí HPLC-MS (identifikace viz Tabulka 11)



Příloha 4: Ukázka přibližného chromatogramu analýzy dužiny se semeny vzorku č. 14 pomocí HPLC-MS (identifikace viz Tabulka 11)

