

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Stanovení tyrosolu ve vínech z ČR metodou HPLC

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

Zpracoval: Milan Brože

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: **Stanovení tyrosolu ve vínech z České republiky metodou HPLC** vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne

podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří mi byli a jsou oporou při mé práci. Zvláště pak **Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D.**, za jeho odborné vedení, cenné rady a nasazení při zpracování této práce. Dále také děkuji **Ing. Vladimíru Pivcovi, CSc.**, za praktické rady a ochotnou pomoc při laborování. A v neposlední řadě bych chtěl poděkovat celé mé rodině a zejména své přítelkyni za trpělivost a nevýslovnou podporu.

SOUHRN

Víno je po pivu druhým nejrozšířenějším alkoholickým nápojem, který lidé pijí už tisíce let. V dnešní době je stále více pozornosti zaměřeno na boj proti působení volných radikálů, které lidský organismus neustále silněji zatěžují.

Látky, které eliminují tyto volné radikály nazýváme antioxidanty. Antioxidanty působí tak, že dodávají volným radikálům jejich chybějící elektrony a tím je eliminují. Samozřejmě jejich antioxidační kapacita je omezená, proto musí být regenerovány, např. vitaminy A, C nebo E, jenž patří k významným antioxidantům. Jako zdroje antioxidantů v lidské výživě slouží zejména brambory, rajčata, jablka, čaj, káva a v neposlední řadě také víno. Laboratorně bylo prokázáno, že mírná spotřeba vína (1 až 2 sklenky denně) má prospěšné účinky pro zdraví. Fenolické sloučeniny přirozeně přítomné ve vínu pozitivně působí proti kardiovaskulárním nemocím a také byly prokázány protirakovinné účinky. Mezi nejvýznamnější antioxidanty jak již bylo řečeno patří vitaminy a fenolické látky, resp. polyfenolické látky (díky své struktuře mají větší antioxidační účinek než vitaminy), na které se v této práci zaměřuji, konkrétně na tyrosol.

Ve své práci jsem se pokoušel charakterizovat rostlinu vinné révy (*Vitis vinifera* L.). Charakteristika obsahuje biologickou charakteristiku, chemické složení hroznů, faktory ovlivňující růst, zrání a kvalitu hroznů, technologii výroby vína, chemické složení vína a změny během kvašení, působení fenolických látek a jejich stanovení. Změny během kvašení vína pokládám za velmi důležité, protože právě tyto změny se podílí na celkovém charakteru vyráběného vína a vzniká při nich velké množství nových sloučenin, které jsou syntetizovány, buď přirozeně přítomnou mikroflórou (baktérie mléčného kvašení) nebo mikroflórou přidanou (*Saccharomyces cerevisiae*). Mezi takto syntetizovanou sloučeninu patří tyrosol, který degraduje z aminokyseliny tyrosinu.

Fenolické látky se mohou stanovit pomocí spektrofotometrie a kapalinové chromatografie. V dnešní době se, ale stále více využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), je to velice rychlá a přesná metoda, která má široké uplatnění.

Klíčová slova: antioxidanty, fenolické látky, tyrosol, víno, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

SUMMARY

Wine is after beer second most expanded alcoholic drink. People have been drinking wine for thousands years. In these days there is more attention to the fight against the influence of free radicals that are burdering human organism more and more.

The substances which eliminate these free radicals are called antioxidants. The antioxidants work by bringing missing electrons to the free radicals and so they eliminate them. Their antioxidant capacity is obviously limited and therefore they must be regenerated by e.g. vitamins A, C or E that belong to the group of important antioxidants. In human nutrition we find antioxidants resources especially in potatoes, tomatoes, apples, tea and last but not least in wine. Laboratory works proved that little consumption of wine (1 to 2 wine glasses a day) has useful effects for helath. Fenolic compounds naturally presented in wine are positively working against cardiovascular diseases. Anti-cancer effects were also proved. As noted previously – among the most important antioxidants belong vitamins and phenolic substances (thanks to its structure they have bigger antioxidant effect than the vitamins) In my work I am focusing on these substances specifically on tyrosol.

In my work I am trying to describe the grape-wine plant (*Vitis vinifera* L.). The characterization involves biologic description, grapes chemist, elements interacting in grow, maturing and quality of grapes, technology of making wine chemist and changes during rising, work of phenolic substances and also their determination. I consider the changes during rising as very important because exactly these changes take part in the generall character of producing wine and host of new compounds are rising from these changes. The compounds are synthetized either naturally by present microflora (bacteria of milk rising) or added microflora (*Saccharomyces cerevisiae*). Among such synthetized compounds belongs Tyrosol, which degrades form amino-acid of Tyrosin.

Phenolic substances can be determinated by spectrophotometry and liquid chromatography. In these days the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is used more and more. It is very fast and accurate method which has a wide use.

Key words: antioxidants, fenolic compounds, tyrosol, wine, high performance liquid chromatography,

1 ÚVOD.....	7
2 LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	8
2.1 Důležité látky ve víně.....	8
2.1.1 Rozdělení fenolických látek	8
2.1.2. Dusíkaté látky.....	11
2.1.3. Tyrosin a tyrosol.....	12
2.2 Výskyt fenolických látek.....	15
2.2.1. Výskyt fenolických látek v obilovinách a obilninách	15
2.2.2. Výskyt fenolických látek v cibulové zelenině.....	17
2.2.3 Výskyt fenolických látek v plodové zelenině	18
2.2.4 Výskyt fenolických látek v kávě.....	19
2.2.5 Výskyt fenolických látek v olivovém oleji	20
2.2.6 Výskyt fenolických látek v pivě	21
2.2.7 Výskyt fenolických látek ve vinné révě	23
2.3 Antioxidační (protektivní) účinky fenolických látek	24
2.4 Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu	26
3 MATERIÁL A METODIKA	28
4 VÝSLEDKY	33
5 DISKUZE	39
6 ZÁVĚR A DOPORUČENÍ	41
7 SEZNAM LITERATURY.....	42
8 PŘÍLOHY	47

1 ÚVOD

V dnešní době se víno těší stále větší oblibě mezi lidmi a také jeho spotřeba v posledních letech rapidně stoupá. Spotřeba vína v Česku neustále roste a letos dosahuje zhruba 17,5 litru na hlavu a rok, vloni to bylo kolem 17 litrů. Oproti roku 1993, kdy každý člověk vypil za rok v průměru 11,5 litru, tak stoupla spotřeba v Česku už o třetinu. Celoevropského průměru 32 litrů za rok zatím, ale nedosahujeme.

V poslední době se často poukazuje na pozitivní působení vína na lidský organismus, samozřejmě v přiměřeném množství (1 až 2 sklenky denně). Laboratorně bylo prokázáno, že víno obsahuje desítky fenolických látek, jejich složení určuje technologie zpracování, odrůda i zeměpisná poloha. K nejznámějším fenolickým látkám patří resveratrol, kvercetin, katechin, epikatechin, kaemforol, hydroxytyrosol, tyrosol, dále fenolkarbonové kyseliny - gallová, protokachetová, kumarová, kávová, vanilinová a ferulová. Fenolické látky působí jako antioxidanty, které vážou molekulární kyslík a pomáhají redukovat tvorbu oksyločeného lipoproteinu, který je hlavní příčinou kornatění tepen a vzniku trombóz (potlačují vznik sraženiny, dokonce dokáží vzniklou krevní sraženinu rozpouštět). Tento antioxidační účinek se spolu s účinky vitamínu C (z vitamínů patří ještě k antioxidantům vitamín E a Beta karoten) podílí na odbourávání cholesterolu. Negativní LDL cholesterol, který je oxidovaný, se podílí na ucpávání cév tukovými usazeninami. Jeho oxidaci způsobují volné kyslíkové radikály, které v organismu vznikají účinkem stresu, při kouření, působením špatného ovzduší, při tělesné zátěži, ve stáří a pod vlivem dalších procesů probíhajících v lidském těle neustále.

Tento fakt, společně s mým předchozím vzděláním, které jsem absolvoval na Střední průmyslové škole potravinářské technologie (obor kvasná technologie), mě přivedlo k námětu této diplomové práce, ve které jsem se zabýval právě obsahem fenolických látek ve víně a jejich stanovením.

2 LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Důležité látky ve víně

2.1.1 Rozdělení fenolických látek

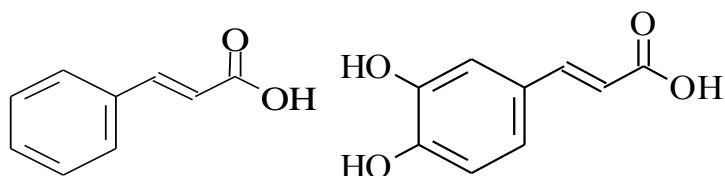
Fenolové látky mají významnou úlohu při vytváření chuti a charakteru vína. Jejich obsah se pohybuje kolem $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Natrpklá příchuť a červené barvivo je důkazem přítomných taninů, které se do vína dostávají v době fermentace ze slupek a pečiček. Víno, které dál zraje v sudech, stejně tak vína školena v dubových sudech technologií barrique [barrique = dubový sud o velikosti 225 l užívaný ke zrání červených vín za současného vyluhování zvláštních aromatických látek z dubu (**Kraus, 2007**)] jsou obohacena o další skupinu tríslovin, jako jsou vanilin a kumarin. Taniny jsou jako polyfenolické látky také významnými antioxidanty. Kromě antibakteriálních účinků, posilují imunitní systém, snižují krevní tlak a riziko vzniku nádorů. Obsah fenolických látek je u červených vín vyšší, od 800 - 4000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, u bílých vín se jejich podíl pohybuje mezi 200 - 500 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Jejich obsah během dozrávání stoupá, naopak při přezrávání obsah klesá. Podle účinků a chemických vlastností ve víně se fenolové látky dělí na:

- a) fenolové kyseliny
- b) flavonoly
- c) anthokyaniny
- d) taniny neboli trísloviny
- e) stilbeny

a) K fenolovým kyselinám patří tyto: p-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilinová, gallová, syringová, salicylová, p-kumarová, kávová a ferulová. Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. Podle současných poznatků tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v potravě. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery, dále pak kyselina ferulová. Kyselina ferulová je obvykle asociována s potravinovou vlákninou a je v ní esterovou vazbou vázána k hemicelulóze. Jeden z hlavních zdrojů kyseliny ferulové jsou tak např. pšeničné otruby ($5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová (5-caffeoylchinová kyselina), která je přítomná v řadě druhů ovoce a zeleniny a v kávě. Šálek kávy obsahuje 50 - 150 mg kyseliny chlorogenové. Kromě kávy jsou bohatým zdrojem též brambory, jablka,

hrušky, meruňky, broskve. Významný obsah chlorogenové kyseliny a jejích derivátů je rovněž v artyčoku, který v některých zemích patří k oblíbené zelenině (**Táborská a Sláma, 2001**). Fenolové kyseliny jsou v hroznech a v moštu volné, zejména však vázané s některými anthokyaniny a tříslovinami. Jejich obsah záleží na odrůdě révy, avšak červená a bílá nakvašovaná vína jich obsahují více než vína bílá.



kyselina kávová

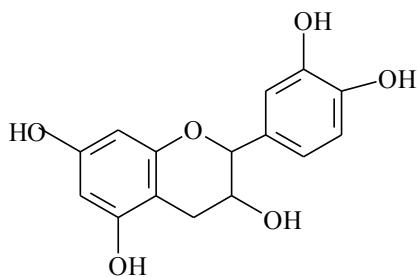
kyselina ferulová

b) Flavonoly patří společně s flavanony, flavony, flavanoly, proantokyanidiny, kyanidiny a izoflavonoidy do skupiny flavonoidů. Flavonoly, ke kterým patří kvercetin, kvercitrin, katechin, epikatechin a myricitin, jsou obsaženy zejména v třepinách červených a bílých odrůd révy.

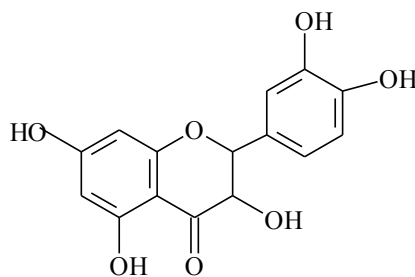
Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol kvercetin. Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ čerstvé váhy), jablka ($21\text{-}72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), kapusta ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), červené víno ($4\text{-}16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a zelený a černý čaj ($10\text{-}25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). V těchto zdrojích se nachází jednak ve formě volné, jednak vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid, kvercetin-3-O-rhamnosid. Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) je součástí léků používaných jako venofarmaka. Snižuje permeabilitu a fragilitu kapilár. Velká část flavonoidů je glykosylována. Navázaný cukr bývá glukóza, rhamnóza, méně často galaktosa, arabinóza, xylóza, glukuronová kyselina a další cukry. Obvykle je navázána jedna cukerná jednotka, ale mohou být i dvě, tři či více (**Táborská a Sláma, 2001**). Hlavními flavanoly jsou katechiny. Patří k nim např. katechin, epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou galovou. Jsou hlavně přítomné v čaji. Nálev ze zeleného čaje obsahuje kolem $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ katechinů. V černém čaji je obsah redukován asi na polovinu v důsledku oxidace na komplexnější polyfenoly během fermentace. Další zdroje jsou červené víno ($270 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a čokoláda.

Kvercetin má silné antioxidační účinky. Množství kvercetinu v hroznech révy vinné je dáno intenzitou slunečního svitu. Má schopnost rozpouštět krevní sraženiny a má protizánětlivé vlastnosti. Katechin spolu s epikatechinem má silné antioxidační účinky. Z

celkového množství fenolických látek se vyskytuje v největším poměru. V moštu a ve víně se flavonoly hydrolyzují a zároveň se odštěpuje příslušný monoglukosid.



kvercetin



katechin

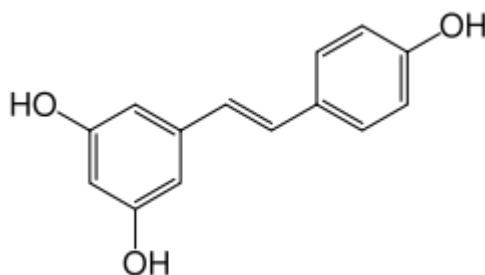
c) Anthokyaniny se vyskytují v přírodě v glykosidické formě. Původní barevná složka aglykon (anthokyanidin), je vázána na glycid, zejména na D-glukosu, D-galaktosu, méně na L-arabinosu a L-rhamnosu. Anthokyanidiny jsou červená barviva např. v třešních, švestkách, rybízu. Obsah kolísá v rozmezí 0,15 až 4,5 mg \cdot g⁻¹ čerstvého ovoce. Průměrný obsah ve víně se udává 26 mg \cdot l⁻¹. K anthokyaninům ve formě monoglykosidů patří delphinidin, perunicin, malvidin a peonidin. Zráním se obsah anthokyaninů zvyšuje, ale při přezrávání klesá, protože se vytvářejí huminové látky. Anthokyaniny, resp. barviva jsou obsaženy zejména ve slupkách bobulí a mají velký význam pro výrobu vína (**Farkaš, 1973**).

d) Třísloviny ve víně řadíme k polyhydroxyfenolům, které dále dělíme na hydrolyzovatelné a kondenzované. K tříslovinám patří katechol, galokatechol, leukokyanidin a leukodelphinidin. Leukoanthokyaniny s katecholy způsobují vlivem enzymu polyfenoloxidasu hnědnutí moštu a vína. Hnědnutí vína zabraňuje kyselina askorbová (vitamin C), která redukuje vzniklé meziproducty.

e) Stilbeny nejsou v rostlinné říši příliš rozšířeny, avšak jeden z nich v nedávné minulosti vyvolal zvýšenou pozornost vědců. Jedná se o resveratrol, který byl po určitou dobu dáván do souvislosti s tzv. Francouzským paradoxem [v jedné oblasti Francie byl zaznamenán nápadně nízký výskyt kardiovaskulárních onemocnění a tato skutečnost byla vysvětlena zvýšenou konzumací červeného vína, za jehož hlavní účinnou složku byl považován právě resveratrol (**Táborská a Sláma, 2001**)].

Resveratrol vzniká ve slupkách bobulí jako ochranná látka (fungicid) v přirozeném boji proti plísním. Množstvím resveratrolu čelí rostlina vystavena stresovým situacím, jako

napadení plísní *Botrytis cinerea*, při účinku ultrafialového záření, vlivu chladnějšího počasí, chrání rostlinu proti škodlivému vlivu aktivních forem kyslíku. Jeho obsah ve víně je ovlivněn zvolenou technologií výroby. Nakvašováním rmutu dochází k většímu vyluhování, nefiltrovaná vína obsahují větší množství resveratrolu. Obsah resveratrolu se pohybuje od 0,1 až 8 mg \cdot l⁻¹. Resveratrol patří k látkám se silným antioxidačním účinkem, potlačuje špatný LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou) cholesterol a zvyšuje podíl dobrého HDL (lipoproteiny s vysokou hustotou) cholesterolu, má protinádorové účinky (www.vinoazdravi.cz).



resveratrol

2.1.2. Dusíkaté látky

Dusíkaté látky jsou velmi důležitou součástí vína a vinařské technologie, podílí se na vytváření charakteru vína. Dusíkaté látky se během kvasného procesu zcela spotřebovávají nebo naopak se vytvářejí nové dusíkaté látky. Metabolismu dusíkatých látek se účastní kvasinkami, ale také vlastní mikroorganismy, např. mléčné bakterie. Dusíkaté látky působí při vytváření buketu, chuti i barvy vína. Při kvašení a zrání vína probíhají složité hydrolytické a oxidačně-redukční reakce, při kterých dochází k hydrolýze dusíkatých látek až na aminokyseliny, ty podléhají dalším degradacím. Obsah celkových dusíkatých látek v moštu a ve víně kolísá v závislosti na charakteru a druhu půdy vinice, způsobu hnojení, množství srážek v průběhu vegetace, odrůdě vinné révy a použitým technologickým postupem při výrobě vína. Celkový obsah dusíku se v moštu pohybuje okolo 200 až 1400 mg \cdot l⁻¹ a v hroznech okolo 600 až 2400 mg \cdot l⁻¹ (**Prostoserdov, 1955**), tyto údaje potvrzují i jiní autoři. Slupky a semena obsahují nejvíce dusíkatých látek, ty během lisování přechází do moštu.

Rozdělení dusíkatých látek ve víně (Ribereau-Gayon a Peynaud, 1966):

- a) proteidy**
- b) albumosy a peptony**
- c) polypeptidy**
- d) anorganické amonné soli**
- e) amidy**
- f) aminokyseliny**

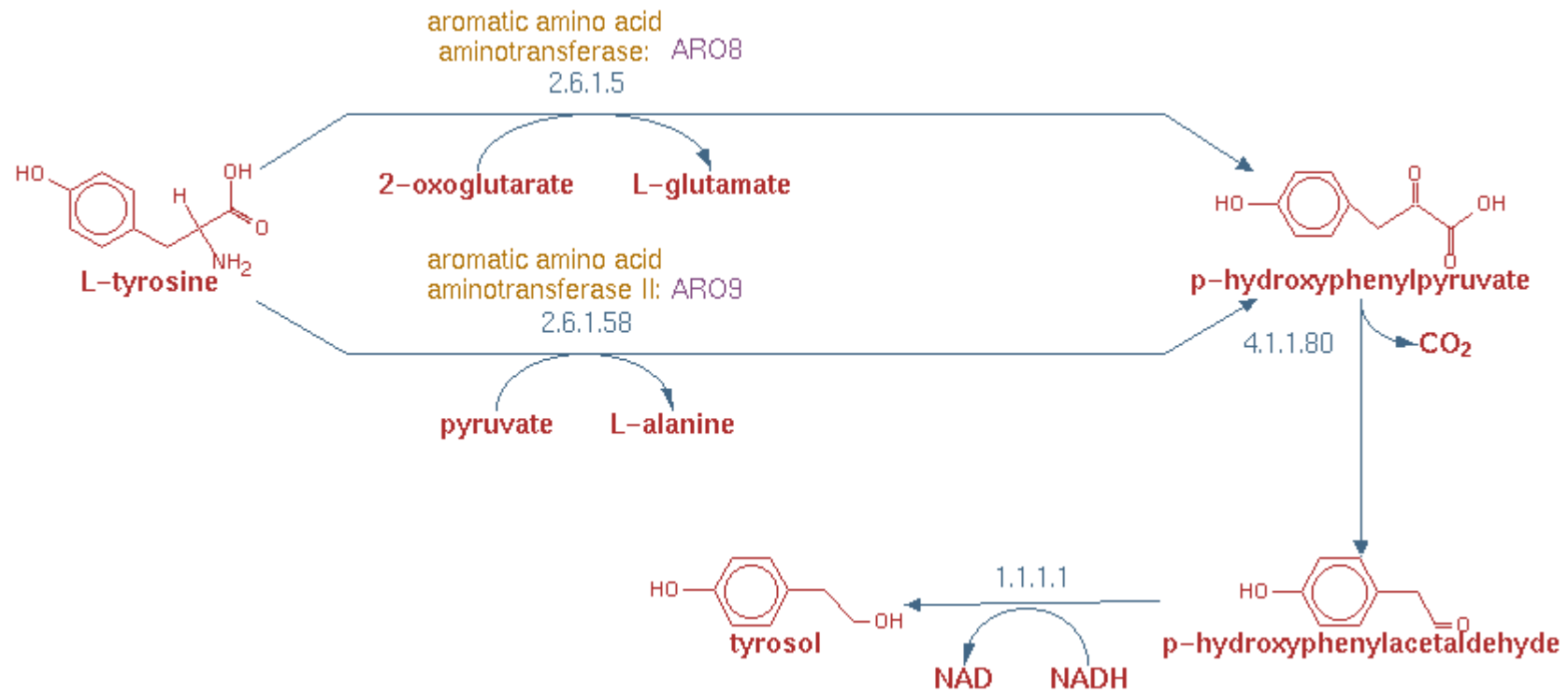
Právě na aminokyseliny bych se rád zaměřil konkrétně na tyrosin a jeho degradaci na tyrosol, jelikož je to náplň mé bakalářské práce. V současné době bylo ve víně prokázáno 22 aminokyselin. Jsou to alanin, arginin, kyselina asparagová, cystein, kyselina glutamová, glycin, histidin, leucin, isoleucin, lysin, methionin, ornithin, fenylalanin, prolin, serin, serotonin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin.

2.1.3. Tyrosin a tyrosol

Tyrosin je aminopropanová kyselina, tvořící bezbarvou krystalickou látku. **Jordán a Hemzalová (2001)** uvádí, že tyrosin je velmi důležitá aminokyselina, protože je zdrojem neurotransmiterů (přenašečů vzruchů z nervové buňky do mozku) a slouží také jako prekurzor některých biogenních aminů (tyramin, adrenalin, noradrenalin) a hormonu štítné žlázy (thyreoglobulinu).

Během kvasného procesu *Saccharomyces cerevisiae* odbourávají aromatické aminokyseliny (zejména tyrosin, fenylalanin a tryptofan) a rozvětvené aminokyseliny (valin, leucin a isoleucin) pomocí Ehrlichovy cesty (viz. schéma). Tato cesta se skládá z následujících kroků: 1. deaminace aminokyselin k odpovídající α -ketokyselině, 2. dekarboxylace získané α -ketokyseliny na aldehyd a za 3. redukce aldehydu k vytvoření odpovídající dlouhého řetězce nebo komplexního alkoholu, známého jako přiboudlina.

Schéma: dégradace tyrosinu *Saccharomyces cerevisiae*



Přiboudliny jsou důležité chuťové a aromatické sloučeniny v kvasných potravinových produktech a nápojích (<http://pathway.yeastgenome.org>).

Tyrosol společně s hydroxytyrosolem a oleuropeinem patří do skupiny fenolických látek. Nejčastěji se vyskytují v olivovém oleji a ve víně. Fenolické sloučeniny jsou silné antioxidanty a ve velké míře eliminují výskyt volných radikálů v lidském těle. Jejich antioxidační aktivita závisí na jejich chemické struktuře. Specificky to závisí na jejich schopnosti darovat vodík nebo elektron a jejich schopnosti delokalizovat nepárový elektron uvnitř aromatické struktury (**Fernández-Pachón, Villaño, Troncoso, García-Parrilla, 2005**).

Antioxidační vlastnosti vína mohou být lépe pochopeny, když vezmeme v úvahu jejich fenolické složení. Zde je potřeba podrobit izolované fenoly antioxidačním testům. Jestli jsou antioxidační vlastnosti vína spojeny s celkovou fenolickou koncentrací nebo spíše než jednotlivé fenoly.

Obecně je prokázáno, že oxidační proces je zapojen do počátečních kroků rakoviny a kardiovaskulárních nemocí. Je akceptováno, že příjem antioxidačních látek posiluje obranu proti reaktivním kyslíkatým částicím. Navíc jsou fenolické sloučeniny brány v úvahu ke zpomalování přirozených procesů trombózy tím, že brání shlukování krevních destiček, oxidaci lipidů a oxidaci lipoproteinů struktury (**Fernández-Pachón, Villaño, Troncoso, García-Parrilla, 2005**).

Epidemiologický důkaz ukazuje, že mírná spotřeba vína má prospěšné účinky pro zdraví. Fenolické sloučeniny přirozeně přítomné ve vínu pozitivně působí proti kardiovaskulárním nemocím a také byly prokázány protirakovinné účinky. Avšak škodlivé účinky spojených s alkoholickým obsahem vína přinutilo doporučit omezení spotřeby na mírnou dávku (jedna nebo dvě skleničky denně) Toto také znamená, že prospěšné fenolické účinky fenolických sloučenin musí také být omezené na tuto dávku (**Martínez-Ortega, García-Parrilla, Troncoso, 2003**).

Fernández-Pachón, Villaño, Troncoso a García-Parrilla (2006) zkoumali obsah fenolických látek v bílých stolních vínech a sherry vínech a uvádějí jejich koncentrace: množství kyseliny galové bylo 3,27 mg .l⁻¹ ve stolních bílých vínech a 6,93 mg .l⁻¹ v sherry vínech. Kaftarová kyselina vykazuje největší obsah mezi skořicovými kyselinami a jejich deriváty, její obsah je 17,8 mg .l⁻¹ ve stolních bílých vínech a 19,2 mg .l⁻¹ v sherry vínech. Tyrosol je přítomný v obou typech vína v množství 2,51 a 17,3 mg .l⁻¹ ve stolních bílých a sherry vínech v tomto pořadí, 5-hydroxymethylfurfural má velkou koncentraci v sherry vínech, hodnota se pohybuje okolo 16,0 mg .l⁻¹. Určité fenolické sloučeniny, jako kyselina

vanilová, kyselina gentisová, ferulová kyselina, procyanidin, epigallokatechin, epikatechin, kvercetin nebo resveratrol nebyly přítomné ve vzorcích, přestože byly popsány v podobných vínech. Obsah tyrosolu v červených vínech je téměř totožný s víny sherry.

2.2 Výskyt fenolických látek

Fenolové kyseliny můžeme rozdělit do dvou tříd, a to na deriváty kyseliny benzoové (např. gallová) a deriváty kyseliny skořicové (Manach et. al., 2004). Vyskytují se nejčastěji ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů (Slanina a Táborská, 2004).

Obsah hydroxybenzoových kyselin je v jedlých částech rostlin obecně velmi nízký, s výjimkou červeného ovoce, černé ředkve a cibule, které mohou obsahovat až několik desítek mg .kg⁻¹. Důležitým zdrojem kyseliny gallové je čaj (listy obsahují 4,5 g.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti). Hydroxybenzoové kyseliny jsou součástími komplexních struktur, jako jsou hydrolyzovatelné tanniny. Mnohem běžnější než hydroxybenzoové kyseliny jsou kyseliny hydroxyskořicové: p-kumarová, kávová, ferulová, sinapová. Druhy ovoce s nejvyšším obsahem (borůvky, kiwi, švestky, třešně, jablka) obsahují 0,5–2 g hydroxyskořicových kyselin na kilogram čerstvé hmotnosti. U většiny ovoce představuje 75-100 % celkového obsahu těchto kyselin kyselina kávová. Ferulová kyselina je nejhojněji obsažena v cereáliích, hlavně ve vnějších částech zrna (98 % ferulové kyseliny), významným zdrojem jsou pšeničné otruby (5 mg.g⁻¹). Právě ve vnějších částech obilného zrna se kyselina ferulová nachází také v trans formě, která je esterovými vazbami vázána na hemicelulose (Manach et. al., 2004).

2.2.1. Výskyt fenolických látek v obilovinách a obilninách

Obiloviny patří mezi nejstarší kulturní plodiny, které člověk pěstuje už tisíce let. Celosvětový podíl obilovin na lidské výživě je odhadován na 60 - 70 %. První záznamy pocházejí už z doby kamenné před 6000 lety př. n. l. a to z Mezopotámské říše v okolí řek Eufrat a Tigris na nynějším území Íránu. Botanickým zařazením patří obiloviny do čeledi lipnicovitě (*Poaceae*). Většinou se jedná o jednoleté byliny se svazčným kořenovým systémem. Stonek neboli stéblo je složen z dlouhých dutých článků (internodia) a kolének (nody), kde dochází k prodlužování (růstu) celé rostliny. Pochva listů vyrůstající z kolének přechází v listovou čepel s rovnoběžnou žilnatinou. Na rozhraní pochvy a čepele vyrůstá jazýček a čepel je zakončena ouškou. Tvar jazýčku a oušek může být rozlišovacím znakem některých obilnin (pšenice, ječmen, žito, oves). Zrna neboli obiloviny a výrobky z nich

připravené mají vysoký obsah bioaktivních látek. Látkové složení obilovin závisí na půdě, odrůdě, hnojení, klimatických podmínkách, době setí a dalších faktorech. Jednotlivé části zrna mají rozdílné chemické složení, nejvíce bioaktivních látek se nachází v aleuronové vrstvě a v klíčku.

Látkové složení různých částí zrna pšenice v sušině %

Část zrna	Bílkoviny	Tuky	Min. látky	Vláknina	Pentozany
Oplodí	10,7	0,9	3,0	26,6	47,9
Osemení	17,8	13,1	0,0	1,3	34,5
Aleuronová vrstva	31,7	9,1	10,9	6,6	28,3
Klíček	34,0	27,6	5,8	2,4	0,0
Endosperm	12,6	1,6	0,6	0,3	3,3
Celé zrna	14,7	2,7	1,9	2,9	8,2

Při mletí zrna přecházejí bioaktivní látky obsažené v obalech do otrub, které se dále termizují, zbavují nečistot a distribuují do prodejů se zdravou výživou. Otruby obsahují značné množství vlákniny, thiaminu, riboflavinu, niacinu, kyseliny pantotenové a mnoho dalších, ze stopových prvků zejména selen a zinek.

Pšenice je jedna z nejvýznamnějších plodin a jednou ze základních surovin pro výrobu chleba a pečiva. Značnou hodnotu zauímají bílkoviny, neboť mají schopnost tvořit pružný gel – lepek, který se skládá z gliadinu, způsobujícího tažnost těsta a glutelinu, bobtnavost lepku, plasticitu a pružnost těsta. U osob s celiakií způsobuje lepek alergii. Další protektivní látky pšenice: nenasycené mastné kyseliny: linolová, α -linolenová, olejová, fosfolipidy, lecitin, sitosterol, kampesterol. Z oligosacharidů rafinóza. Minerální látky zastupuje draslík, vápník a významný je obsah zinku a selenu. Podstatnou část vitaminů tvoří vitaminy skupiny B – B1, B2, vysoké množství niacinu, kyseliny pantotenové, menší množství pyridoxinu a vitamin E. Další bioaktivní látky tvoří fenolové kyseliny, flavonoidy i malé množství β -glukanů.

Žito má vysoký podíl rozpustné vlákniny, mnoho minerálních látek, zvláště draslíku a hořčíku. Vysoké množství vitaminů skupiny B (podobné pšenici), vitaminu E, z dalších

bioaktivních látek flavonoidy, fenolové kyseliny, fosfolipidy, lecitin, ze sterolů: sitosterol, kampesterol a malé množství β -glukanů.

Ječmen kromě minerálních látek a vitaminů jsou významnou protektivní látkou β -glukany, které jsou v ječmeni přítomny ve vysoké dávce 7 – 16 %, jsou to neškrobnaté sacharidy, které působí antiskleroticky a některé zdroje uvádějí i jejich pozitivní ovlivnění prevence nádorového onemocnění. Z dalších bioaktivních látek: lignany, tyrozin, tyramin, flavonoidy, fenolové kyseliny.

Oves obsahuje hodnotné bílkoviny, lipidy s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin, zvláště olejovou a α -linolenovou a dále rozpustnou vlákninu. Rovněž je zde vysoké množství minerálních látek, zejména hořčíku, dále draslíku, železa, zinku a dalších. Má větší množství vitaminů skupiny B, folacin, vitamin E a vitamin K. Dále jsou zde přítomny účinné antioxidantní látky – amidy fenolových kyselin, z nichž hlavní sloučeninou je avenanthramid a ferulové kyseliny – anthranilová kyselina a fenolové kyseliny, flavonoidy, sitosteroly, fytoestrogeny-lignany, glykosidy a fosfolipidy.

2.2.2. Výskyt fenolických látek v cibulové zelenině

Cibule (*Allium cepa*) V sušině cibule je 35 až 40 % oligofruktosanů (oligosacharidy složené z fruktózy), dále glukóza, arabinóza, sacharóza aj. Minerální látky jsou zastoupeny v hojné míře. V cibuli se nachází mnoho železa, zvláště v listech, má i vysoký obsah zinku, což je spolu s česnekem nejvíce ze všech zelenin. Vitaminu C je v cibuli poměrně málo, ale v listech je ve značném množství (až 1 000 mg.kg⁻¹). Cibule je značným zdrojem bioaktivních látek, analýza pomocí HPLC ukázala přítomnost kyseliny gallové, ferulové, protokatechinové, kvercetin, flavonoidů, kemferolu a mnoha dalších (**Rakash, Singh a Upadhyay, 2007**). Pokud je obsažena ve stravě cibule, tělo dokáže lépe využít vitamin B1 z živočišných potravin. Aliin a allicin, přítomný v cibuli se váže s thiaminem na alylthiamin, který je lépe využitelný. Fytoncid allicin se řadí mezi antibioticky účinné látky. Antibakteriální látky, fytoncidy jsou ve všech částech rostliny a nejvíce ve zralé cibuli. Fialová a červená cibule má vyšší protibakteriální účinky než bílá. Cibule obsahuje éterické oleje, které tvoří její chuť, vůni a baktericidní efekt.

Česnek (*Allium sativum*) obsahuje mnoho polyfenolů a sloučeniny síry, které jsou odpovědné za jeho antioxidantní aktivitu. Nejúčinnější složkou česneku je česneková silice, jejíž podstatu tvoří sulfidy, disulfidy a trisulfidy (**Queiroz, 2009**). Typickou vůni způsobuje česneková silice tvořená organickými sloučeninami síry, která může být nahrazena v

jednotlivých molekulách selenem. Selen je ve stopovém množství přijímán rostlinami, dostává se do bílkovin ve formě selenových aminokyselin (selenomethionin, selenocystein a methylselenocystein). V nepoškozených tkáních česneku se nachází inaktivní alliin, který se při mechanickém rozmělnění mění na aktivní formu - allicin. Charakteristické česnekové aroma je důsledkem štěpení allicinu za přítomnosti vzdušného kyslíku a světla na polysulfidy, především diallyldisulfid. Fytoncid allicin má velmi silné baktericidní, fungicidní, bakteriostatické a mykostatické vlastnosti (**Bulková, 2008**).

2.2.3 Výskyt fenolických látek v plodové zelenině

Rajče (*Lycopersicon esculentum*) je jednoletá bylina patřící do čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Plodem je kulovitá bobule, ve zralosti nabývá červené nebo žluté barvy. Zralé plody se konzumují jednak syrové nebo i tepelně opracované. Rajčata jsou velmi vhodná jako základ zdravé výživy. Vhodná jsou i na různé redukční a očistné diety, neboť mají antioxidační účinky. Epidemiologické důkazy naznačují, že strava bohatá na ovoce a zeleninu chrání před rozvojem rakoviny tlustého střeva, a to především kvůli jejich vysoké hladině polyfenolů, zejména skupina známá jako flavonoidy. Rajčata obsahují významné množství glykosidů flavonoidů - kvercetin a naringenin. Oba kvercetin a naringenin jak bylo prokázáno, mají anti-proliferativní účinky na buňky rakoviny tlustého střeva. Studie ukázala, že byl zjištěn vliv tří odrůd rajčat, s různým obsahem flavonoidů na potlačení růstu rakovinotvorných buněk v lidském organismu. Ukázalo se, že všechny tři odrůdy byly schopny významně zpomalit růst rakovinotvorných buněk tlustého střeva a také, že mechanismus inhibice růstu byl spojen s účinky fenolických látek obsažených v rajčatech. U buněk, které byly vystaveny přímému působení rajčatového extraktu došlo ke snížení podílu buněk v tzv. S-fázi (tj. aktivní syntéza DNA). Tyto údaje naznačují, že rajčata mohou pomoci předejít rakovině tlustého střeva, ale že obsahem flavonoidů se nedá určit jejich přesný biologický účinek (**Saunders, 2009**).

Paprika (*Capsicum*) je rostlina z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Pochází z Ameriky, kde byla tisíce let pěstována, dnes se pěstuje po celém světě. V čerstvých plodech je vysoký obsah vitamínu C (nejvíce v červených). Dozríváním plodů vitamínová hodnota velmi stoupá. Z organických kyselin je nejvíce zastoupena kyselina jablečná, dále citrónová a v nepatrném množství kyselina šťavelová. Zbarvení způsobuje hlavně chlorofyl a karotenoidy. Z karotenoidů především kapsantin a kapsorubin, méně β -karoten, xantofyl, zeaxantin, kryptoxantin aj. V paprice se nacházejí flavonoidy jako apiin, hesperidin, kvercetin, luteolin-

7-glykosid, orientin, izovitexin, vitexin a další. Plody většiny zástupců rodu paprika obsahují kapsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamid), lipofilní látku, která působí silné pálení v ústech (pokud je špatně strávena, pak i v konečniku) jenž podporuje vylučování trávicích šťáv, činnost štítné žlázy a v neposlední řadě dává paprice její charakteristickou chuť. Aróma plodů podmiňuje 0,12 až 0,15 % silic. Paprika (zejména červená) patří mezi naše biologicky nejhodnotnější druhy zeleniny, ale nelze ji podávat u diet šetřících trávicí ústrojí.

Brambor (*Solanum tuberosum*) jsou víceleté hlíznaté plodiny z čeledi lilkovité. Brambory jsou jednou z nejvýznamnějších zemědělských plodin; větší význam pro lidskou výživu mají pouze pšenice, rýže a kukuřice setá. Voda tvoří největší podíl z celkové hmotnosti asi 75%. Ze sacharidů tvoří škrob 70 - 80 % hlízy, dále je v bramborách rezistentní škrob, pentozany a malé množství cukrů, které ovlivňují chuť a vůni brambor. Tuky jsou zde ve velmi malém množství $2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Protektivní látky zastupuje vláknina, jak rozpustná tak i nerozpustná forma, jejíž součástí jsou pektinové látky (největší koncentraci po sklizni). Minerální látky jsou uloženy nejvíce ve slupce a těsně pod ní. Brambory jsou velkým zdrojem draslíku, hořčíku, zinku a manganu, vitamínu C (největší množství je v raných bramborách až $250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), vitamínu skupiny B a vitamínu E. Další bioaktivní látky obsažené v bramborách jsou antokyany, fytoestrogeny, kyselina kávová, kyselina p - kumarová a její deriváty, ale též kyselina chlorogenové (5-caffeoylchinová kyselina), která je zastoupena významným množstvím a podílí se na antioxidační aktivitě brambor. Kyselina chlorogenová patří mezi nejběžnější ester kyseliny kávové. Z celkových polyfenolických látek v bramborách představuje kyselina chlorogenová 90 %. Negativní projev kyseliny chlorogenové na kvalitě hlíz je v tom, že se významně podílí na tmavnutí dužniny hlíz. Na druhé straně kyselina chlorogenová v hlíze bramboru patří k nejbohatším zdrojům antioxidantů v lidské výživě. Bylo prokázáno, že se zvyšujícím se obsahem polyfenolických látek v peridermu hlíz se snižuje rozsah napadení hlíz obecnou strupovitostí. Z výsledků vyplývá, že na obsah kyseliny chlorogenové má vliv především odrůda a ročník. V ekologickém pěstování je zaznamenán trend vyššího obsahu kyseliny chlorogenové u některých odrůd (Diviš, 2008).

2.2.4 Výskyt fenolických látek v kávě

Kávová semena jsou plody rostliny z čeledi mořenovitých (*Rubiaceae*) zvané kávovník. Jedná se o plod podobný třešni, nejen tvarem ale i barvou, která bývá v době sklizně červená nebo červeno fialová. Uvnitř plodu jsou ukryta dvě proti sobě položená semena, kávová zrna. Káva je obvykle horký nápoj připravovaný ze semen kávovníku. Označuje také prášek, který

se k výrobě nápoje používá. Ten se získává mletím pražených semen kávovníku. Káva je charakteristická svou silnou vůní a černou barvou. Obsahuje mimo jiné alkaloid kofein, který povzbuzuje srdeční činnost a pro jeho povzbuzující účinky se káva pije především. Káva se odborně připravuje jako směs plodů různých druhů kávovníku, nejčastěji se setkáváme s plody *Koffea Robusta* a *Koffea Arabica*. Poslední výzkumy potvrdily, že velmi důležitým zdrojem antioxidantů je právě káva. Nejvýznamnějšími antioxidanty v kávě jsou flavonoidy a polyfenoly. Kyselina chlorogenová (kombinace kyseliny kávové a chinové) je nejbohatším polyfenolem v kávě a reprezentuje tu nejpodstatnější část antioxidantů kávy. Je odhadováno, že káva může dodávat až 70 % příjmu antioxidantů z této skupiny. Pražením kávy celková antioxidační aktivita kávy roste, k čemuž přispívají tzv. melanoidiny, což jsou hnědé polymerní látky, které vznikají tzv. Maillardovými reakcemi právě během pražení zelené kávy. Samozřejmě účinek velikého antioxidačního potenciálu kávy na kardiovaskulární onemocnění, rakovinu a další onemocnění musí být ještě potvrzen dalšími studiemi (Svilaas, 2004).

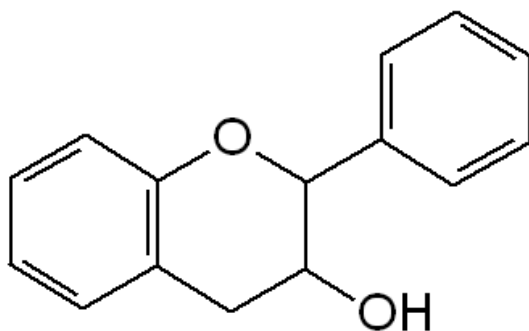
2.2.5 Výskyt fenolických látek v olivovém oleji

Oliva je plodem olivovníku evropského (*Olea europaea*), tato rostlina pochází z čeledi olivovnickovité (*Oleaceae*). Olivovník je stále zelený strom s tuhými špičatými listy. Bohatou úrodu přináší až kolem dvacátého roku svého stáří a plodí dalších 150 ale i více let. Plodem olivovníku jsou olivy, které se buď zpracovávají samostatně nebo se z nich za studena nebo za tepla lisuje olej. Olej je používán především v potravinářském, v kosmetickém, ale též ve farmaceutickém průmyslu. Jeho konzumace je považována za zdraví prospěšnou, protože obsahuje mono-nenasycené mastné kyseliny, vitamin E a mnoho dalších prospěšných látek. Olivový olej, a to především panenský olivový olej (získaný z prvního lisování), by mohl být nejvýznamnější. Ve své fenolové frakci obsahuje unikátní směs látek, které jsou velmi účinnými antioxidanty. Zdraví prospěšný je také vysoký obsah skvalenu a mononenasycené mastné kyseliny olejové. Fenolové sloučeniny v panenském olivovém oleji jsou účinnějšími antioxidanty, než např. vitamin E nebo dimethylsulfoxid. Vůbec nejúčinnější se zdají být lignany (+)-1-acetoxypinoresinol a (+)-pinoresinol. Chemické analýzy ukázaly, že zatímco antioxidační působení látek z olivového oleje je intenzivní, antioxidační aktivita olejů získaných ze slunečnicových a jiných semen je minimální. Oleje ze semen sice obsahují malé množství skvalenu, ale chybí v nich to nejpodstatnější, fenolové antioxidanty. Proto mají

populace v jižních zemích, daleko vyšší přísun antioxidantů potravou, než lidé jinde v Evropě (www.zdrava-rodina.cz, 2000).

2.2.6 Výskyt fenolických látek v pivě

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity, které se přirozeně vyskytují v rostlinách. Mají velký význam pro potraviny a nápoje, protože tyto látky jsou zodpovědné za jejich organoleptické vlastnosti. V důsledku toho jsou úzce spojeny s kvalitou těchto produktů. Pivo obsahuje složité směsi fenolických sloučeniny, které se při výrobě extrahují ze sladu a chmele a byly u nich prokázány pozitivní antioxidační vlastnosti. Kromě toho, skupiny polyfenolických látek jsou odpovědné za chuť a také za fyzikální stabilitu piva, jak už popsala celá řada autorů. Jednoduché polyfenoly z hydroxybenzoové kyseliny (kyselina galová, protoka- techinová kyselina, atd.) a hydroxyskořicové kyseliny (ferulové kyseliny, p-kumarové kyselina, kávové kyseliny, atd.) jsou čerpány nejvíce ze sladu, ale jsou také přítomny v malém množství v chmelových šišticích. Struktury fenolických kyselin jsou uvedeny na obrázku str.22.

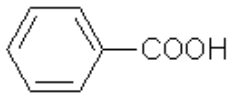


flavan-3-ol

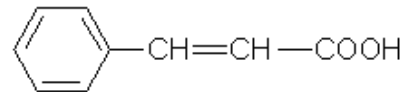
Flavonoly (kvercetin, kemferol atd.) pocházejí většinou z chmele. Flavan-3-ol, včetně monomerů jako jako (+)-katechin a (-)-epicatechin, dimerů (prodelfinidin a procyanidin), trimerů (procyanidin) a flavonoidy vznikají ze sladu i chmele. Konečný obsah fenolických složky piva závisí na použitých surovinách pro výrobu piva.

Analytické metody pro stanovení fenolických sloučeniny u mladiny a piva jsou omezené. Dnes nejběžnější metodou stanovení polyfenolů ve víně, olivového oleje a dalších potravin a nápojů je HPLC s hmotnostní spektrometrickou detekcí. Oddělení fenolických sloučenin v pivu bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, poté následuje ultrafialová detekce - DAD detekce (Dvořáková a kol., 2007).

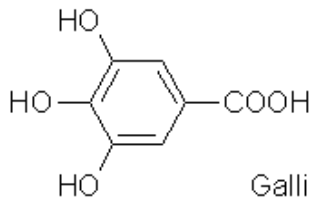
Fenolické kyseliny:



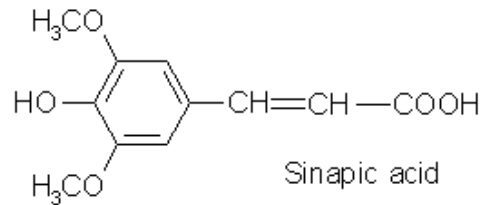
Benzoic acid



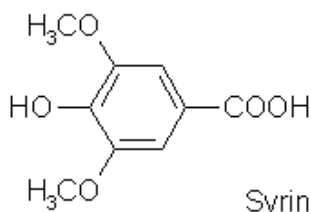
Cinnamic acid



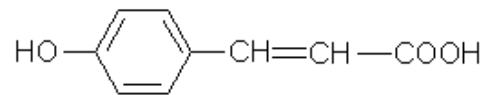
Gallic acid



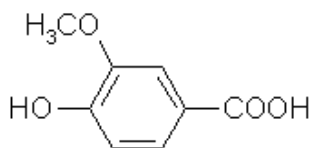
Sinapic acid



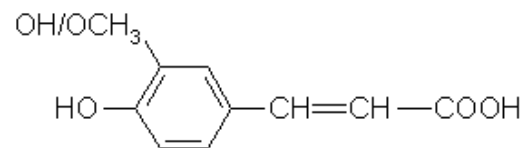
Syringic acid



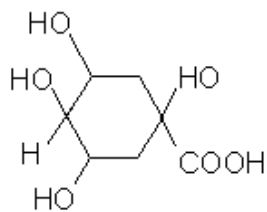
p-coumaric acid



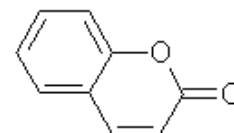
Vanillic acid



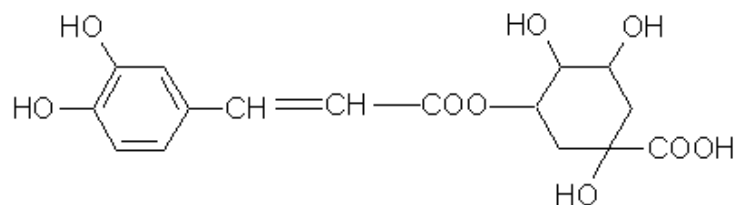
Caffeic acid/Ferulic acid



Quinic acid



Coumarin



Chlorogenic acid

Popisky (zleva doprava): kys. benzoová, kys. skořicová, kys. gallová, kys. sinapová, kys. syringová, kys. p-kumarová, kys. vanilová, kys. kávová/ferulová, kys. chinonová, kumarin, kys. chlorogenová

2.2.7 Výskyt fenolických látek ve vinné révě

Velmi hojně jsou též fenolické látky zastoupeny v hroznech vinné révy (*Vitis vinifera*.) Hrozny stolní a moštové mají značný obsah lehce stravitelné glukózy, z nerozpustné vlákniny obsahují např. lignocelulózy a z rozpustné vlákniny zejména pektinové látky. Z minerálních látek je přítomen draslík, vápník, hořčík, železo, bór, selen, zinek a další. Vitaminy skupiny B jsou v menším množství, mimo enormně vysokého obsahu kyseliny listové 39,00 mg.kg⁻¹, vitamin C 93,50 mg.kg⁻¹. Obsahují organické kyseliny, zejména kyselinu vinnou, jablečnou a citrónovou. Dále třísloviny, barviva a aromatické látky. Významný je obsah lecitinu, bioflavonoidů a polyfenolických látek. Z flavonolů isorhamnetin, kempferol, kvercetin, rutin, dále katechiny, gallokatechiny, epigallokatechiny, monoterpeny aj. Nejdůležitější protektivní složky vína jsou estery kyseliny vinné, kyselina skořicová, aminokyseliny, vitaminy, stilbenoly, stilbeny – zvláště resveratrol, který se nejvíce nachází ve slupkách a semenech modrých hroznů, β -sitosteroly. Typické aróma vytváří monoterpenové alkoholy, které jsou součástí silic: linalool, nerol, α -terpineol, geraniol, jenž se vyskytuje ve formě β -rutinosidu. Listy obsahují vitaminy, minerální látky, třísloviny a mnoho dalších bioaktivních látek **(Bulková, 2008)**.

Obsah polyfenolických sloučenin u vinné révy závisí na odrůdě, zeměpisné poloze (klíma, míra slunečního záření, atd.), technologii zpracování nebo stresovými faktory vyskytující se v průběhu pěstování a dozrávání hroznů. Obsah polyfenolických sloučenin ve víně závisí především na způsobu vinifikace (celý proces výroby vína od zpracování hroznů po lahvování vína). Katechin a související epikatechin mají silné antioxidační účinky a oba jsou přítomni v hroznech vinné révy a také všechny flavonoidy.

Fenolické látky, které jsou obsaženy ve víně jsou z 85% tvořeny právě flavonoidními sloučeninami, zejména jsou to pak kvercetin, katechin a resveratrol, které velmi pozitivně působí na naše zdraví. Obsah fenolických látek je u červených vín vyšší, jejich množství se pohybuje od 800 - 4000 mg .l⁻¹, u bílých vín je to pouze mezi 200 - 500 mg .l⁻¹. Kvercetin má silné antioxidační účinky, rozpouští krevní sraženiny a působí protizánětlivě. Jeho množství v hroznech roste s intenzitou slunečního svitu. Katechin má rovněž silné antioxidační účinky a z celkového množství fenolických látek se vyskytuje v největším poměru. Resveratrol vzniká ve slupkách bobulí jako ochranná látka (fungicid) v přirozeném boji proti plísním a rostlina se jím brání i proti silnému ultrafialovému záření, chladnějšímu počasí a škodlivému vlivu aktivních forem kyslíku. Naše republika patří svou polohou mezi nejseverněji položené vinařské oblasti, proto je vinná réva vystavena tvrdým přírodním podmínkám. Díky tomu má i hodně resveratrolu. Množství této fenolické látky je ovlivněno i technologií při výrobě vína.

Nakvašováním rmutu dochází k většímu vyluhování a nefiltrovaná vína obsahují větší množství resveratrolu. Odrůda, která má čtyřnásobně větší množství této fenolické látky je Pinot Noir (Rulandské modré). Obsah resveratrolu se obecně pohybuje od 0,1 do 8 mg.l⁻¹. Resveratrol má silné antioxidační účinky, snižuje hladinu LDL cholesterolu (www.vinoforum.eu).

Ing. Kyseláková (2005) uvádí, že flavonoidní látky, které byly identifikovány v červeném víně např. resveratrol, kvercetin, katechin, rutin, kyanidin, myricetin a gallotaniny, mohou v lidském organismu působit jednak jako antioxidanty, jednak působí proti srážení a to inhibicí LDL cholesterolu a prudkým zvýšením podílu HDL cholesterolu, což jsou důležité momenty v boji s některými chorobami srdce, aterosklerózou a zákeřnou rakovinou. I když již byla snaha o zjišťování těchto látek u některých českých a moravských vín, nepřihlíželo se zatím k technologii, k mutagenním a antimutagenním účinkům flavonoidních látek. Hlavní snahou při výrobě červených vín je podpora macerace tak, aby se vyluhovaly množství fenolických sloučenin (barviv a tříslovin) obsažených v pevných částech hroznů. Naše červená vína potřebují měkké třísloviny, jejichž množství může ovlivnit vyzrállost hroznů. Extrakce tříslovin na rozdíl od anthokyanů probíhá během celé doby kvašení a vzrůstá se stoupajícím alkoholem. Obsah fenolických sloučenin je ovlivněn také jinými faktory, např.: třapiny dodávají třísloviny, ale váží barvivo, vysoký obsah moštu ve rmutu snižuje obsah fenolických látek. Oxid siřičitý je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím vyluhování fenolických látek. Zabraňuje jejich oxidaci a rozkladu. Polyfenoly u červených vín tvoří velkou skupinu látek s rozmanitou chemickou skladbou. Červené, modré a fialové zbarvení způsobují anthokyany. Chemicky jsou to deriváty 2 - fenylnbenzopyrillia s různým počtem hydroxylových a metoxylových skupin. Plísně zejména *Botrytis cinerea* P. (plíseň šedá) může nepříznivě svým enzymem laccazou způsobit nevratnou degradaci polyfenolů (anthokyanidů a taninů). Enzym se váže na prekurzory aromatu (oxidace terpenů) a tím následně dochází ke ztrátě odrůdové vůně.

2.3 Antioxidační (protektivní) účinky fenolických látek

Antioxidant je látka, jejíž molekuly omezují aktivitu volných radikálů, snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních forem. Tím omezují proces oxidace v organismu. Z tohoto důvodu se přidávají do potravin, které by byly jinak oxidací nadměrně poškozovány a jejich konzumace působí pozitivně na zdraví lidského

organismu. V převážné míře jde o látky, které jsou nejvíce obsaženy v potravinách rostlinného původu. Antioxidanty jsou často spojovány s nižším rizikem kardiovaskulárních chorob a rakovinotvorného bujení. Jedna z mnohých studií tvrdí, že nejúčinnější antioxidanty jsou lignany, toto tvrzení dovoluje konkrétněji uvažovat o mechanismech preventivních účinků. Protože jde o látky rozpustné v tucích, větší část se pravděpodobně vstřebává a může se uplatnit inhibicí peroxidace lipidů, případně mít chemoprotektivní účinky při nádorech. V pokusech na zvířatech lignany inhibují růst buněk karcinomů kůže, prsu, plic a kolon. U zvířat krmených semeny lnu, které jsou bohatým zdrojem skvalenu, došlo k vymizení markerů signalizujících vývoj nádoru prsu, i k potlačení růstu samotného nádoru. Vedle antioxidačních účinků se může uplatnit i podobnost struktury lignanů, estradiolu a tamoxifenu [protinádorové působení by mohlo částečně souviset s antiestrogenními účinky: lignany inhibují syntézu estrogenů adipocyty a buňkami placenty, estradiolem indukovaný růst buněk lidského karcimu plic MCF-7 a stimulují syntézu SHB /sex-hormonebinding/ proteinu (www.zdrava-rodina.cz, 2000)].

K nejvýznamnějším antioxidantům patří vitamin E, vitamin A, α a β karoten, vitamin C, kyselina lipová, selen, zinek, vápník, kataláza, superoxid dismutáza, koenzym Q10, glutation, melatonin a asi jedna z nejdůležitějších skupin jsou polyfenolické látky (kys. ferulová, hydroxyskořicová, gallová, chlorogenová, flavanony, flavony, flavanoly, proantokyanidiny, sanidiny, kvercetin, epikatechin, delphinidin, hydroxytyrosol, tyrosol a mnoho dalších). V současné době je známo, že existuje více než 6000 antioxidantů, intenzivně se pracuje na získávání informací o jejich optimálním množství a jejich působení ve výživě. Antioxidanty jsou nejvýznamnějším mechanismem působícím v organismu proti volným radikálům. Tyto volné radikály jsou endogenní a exogenní. Endogenní jsou produkty, které vznikají při metabolismu. Reaktivní formy kyslíku se v organismu zúčastňují uvolňování a přeměny energie potřebné pro životní pochody a jsou součástí enzymových mechanismů.

Reaktivní formy kyslíku jsou látky velmi pohotově reagující s různými biologickými strukturami. Jedná se o atomy nebo skupiny atomů s lichým počtem elektronů: např. superoxid O_2^- , hydroxylový radikál $\cdot HO$, peroxid vodíku H_2O_2 . Exogenní radikály vznikají při nevhodných technologických úpravách potravin nebo ve znečištěném prostředí – exhalace výfukových plynů, cigaretový kouř a další. Volné radikály se podílejí na mnoha neinfekčních nemocech a na jejich zneškodnění se ve značné míře podílí antioxidanty.

Springsteel (2004) uvádí, že flavonoidy patří mezi významné antioxidanty, které působí jako enzymové regulátory, pozitivně ovlivňují imunitní systém, značně se podílejí na

prevenci kardiovaskulárních a nádorových onemocněních. Černý čaj obsahuje flavonoidy až do 30 % sušiny. Bylo popsáno antikarcinogenní působení u myši a potkanů: střev, kůže, žaludku, jater, dvanácterníku, pankreatu a plic. Polyfenoly čaje mají antioxidační účinky, blokují volné kyslíkové radikály. Rovněž zelený čaj brání karcinogenezi. Některé epidemiologické studie prokazují ochranný efekt proti určitým druhům nádorů.

2.4 Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu

Dosud není normovaná žádná kapalinová chromatografická metoda pro analýzu fenolických sloučenin. Nejčastěji se fenolické látky stanovují metodou HPLC (High Performance Liquid Chromatography), v překladu to znamená vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Používá se pro separaci látek rozpuštěných v roztoku, tj. používá se kapalný vzorek nepříliš těkavých látek. Stanovují se tak organické kyseliny, polyaromatické uhlovodíky, bílkoviny, sacharidy, vitaminy, různé metabolity atd.

Jde o kapalinový chromatograf s vysokým tlakem na vstupu do kolony. Principem této metody je, že během průchodu látky kolonou dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma, popřípadě i více fázemi. Mobilní fáze (vzorek + rozpouštědlo) prochází za pomoci čerpadla pod tlakem (až desítky MPa) náplňovou kolonou, která je naplněna stacionární fází (ocelová trubice dlouhá 5-35 cm, o vnitřním průměru 3 - 5 mm, vyplněná malými pevnými částicemi, které mají podle druhu kolony určitou sorpční kapacitu). Při průchodu vzorku a rozpouštědla kolonou dochází k reakci složek mobilní fáze se složkami fáze stacionární, tento děj se nazývá eluce (eluce = promývání). Stanovované složky se separují a podle toho v jakém pořadí vycházejí ven z kolony, kde jsou detekovány a v počítačové jednotce jsou data zpracována a vyhodnocena.

Pro separaci polyfenolů a jejich aglykonů je možné použít široké spektrum chromatografických systémů. Nejčastěji se však separace provádí na koloně plněné silikagelem BDS C 18, který vykazuje vysokou selektivitu a účinnost oproti běžně používaným sorbetům ODS C18. Separace se provádí pomocí izokratické (kolona se eluuje tak dlouho, až kolonu opustí všechny složky) nebo gradientové eluce [gradientová eluce je nejpoužívanější a neúčinnější technikou změny selektivity na analytické koloně, při gradientové eluci se pracuje s mobilní fází, jejíž složení se mění s časem, takže v průběhu separace dochází ke zvyšování její eluční síly, většinou se pracuje s binární elucí, kdy jedna fáze má výrazně nižší eluční sílu než druhá, časová změna koncentrace v průběhu separace se označuje jako profil gradientu (www.hplc.cz)] mobilní fází, kterou tvoří směs ethanolu nebo

acetonitrilu, s vhodnými tlumiči (kyseliny - mravenčí, octová, fosforečná). Detekce jednotlivých látek se provádí spektrofotometricky v UV oblasti (220 až 300nm).

Romani et. al. (2001) uvádí, jak stanovit polyfenolické látky v olivovém oleji. Každý vzorek oleje o objemu 100 ml byl extrahován do 300 ml etanolové vodní směsi (ethanol/voda, v poměru 70 : 30, v/v), voda byla okyselená s kyselinou mravenčí (pH = 2,5) a přidal se 1 ml roztoku kyseliny gallové (vnitřní standard; ethanol/voda, 70:30, v/v roztok 1 mg .ml⁻¹). Lipidová frakce se odstranila přidáním n-hexanu. Surový alkoholový extrakt z každého vzorku se zahustil za sníženého tlaku až do sucha, opláchnul se 2 ml extrakčního rozpouštědla a analyzoval pomocí HPLC s detektorem na diodové pole (DAD) nebo HPLC / MS. Činidlo - kyselina gallová byla dodána od Extrasynthése (Lyon, Francie). Extrakce fenolových kyselin byla provedena na tuhou fázi (SPE) pomocí C18 Octadecyl kolony ze Stepbio (Bologna, Itálie). Množství 3 g olivového oleje bylo přidáno do 1 ml roztoku ofresorcín (vnitřní standard, roztok diethyletheru 0,5 mg .ml⁻¹) bylo rozpuštěno v n-hexanu (15ml) a přivedeno na kolonu k promývání 2x 10ml methanolu a 2 x 5 ml n-hexanu. Kroky eluce: n-hexan (4 x 10 ml) při atmosférickém tlaku, odstraní se lipofilní sloučeniny, methanol (4•10ml) pod vakuem se obnoví polární frakce. Po koncentraci za sníženého tlaku, frakce obsahující fenolové kyseliny, propláchneme 1 ml acetonu a poté proběhne derivatizace se 150 µl bis (trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) a nakonec analyzujeme GC analýzou. Činidla resorcín a BSTFA byly zakoupeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Identifikace jednotlivých polyfenolů bylo provedeno s použitím údajů z obou metod HPLC/DAD a HPLC/MS analýzy, pomocí jejich retenční časů, UV-VIS a hmotnostních spekter. Kvantitativní vyhodnocení jednotlivých polyfenolů (s výjimkou fenolických kyselin) byla provedena pomocí HPLC/DAD se závaznými normami, jako je tyrosol, oleuropein, luteolin a apigenin, které byly použity k přípravě čtyřbodové regresní křivky ($r^2 > 0,99$). Všechny tyto normy byly zakoupeny od Extrasynthése (Lyon, Francie). Pro detekci tyrosolu a hydroxytyrosolu byla stanovena vlnová délka na $\lambda = 280$ nm.

HPLC/DAD analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu HP 1090L kontrolovaný pracovní stanicí HP 9000 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Analytická kolona 4,6 x 250 mm Li-Chrosorb RP18, 5 µm (Merck) byla udržována při teplotě 26°C. HPLC/DAD analýza byla provedena s rozpouštědly zakoupenými od Carlo Erba (Milano, Itálie). Tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein a aglykony byly analyzovány podle **Romani et. al. (2001)**.

3 MATERIÁL A METODIKA

Cílem této práce bylo zjistit obsah fenolické látky – tyrosolu, ve vínech, která byla vyrobena v České republice.

Metodika této práce spočívala v analýze 30 lahví (vzorků) vína metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie, analyzovaly se jak červené tak i bílé odrůdy *Vitis vinifera*. Vzorek vína byl před analýzou zakoncentrován do diethyletheru a přefiltrován přes síran sodný (Na_2SO_4), aby se zbavil zbytkové vody před měřením.

Seznam vín k analýze HPLC (30 lahví)

Seznam červených vín:

- 1) Frankovka 2005, pozdní sběr, vinařství: LACINA, vinařská obec Velké Pavlovice, viniční trať: Lizniperky, ČŠ: 2607/05, označení vzorku: 2**
- 2) Frankovka 2005, pozdní sběr, vinařství: Ludvík Maděřič, vinařská obec: Moravský Žižkov, viniční trať: Slovenská, ČŠ: 05412, označení vzorku: 3**
- 3) Frankovka 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Vinium Velké Pavlovice, vinařská podoblast: Juznoslovenská, IC: 10132, L059W303/2, označení vzorku: 6***
- 4) Modrý Portugal 2005, pozdní sběr, vinařství: HORT, vinařská obec: Djokovičky, viniční trať: Šár, ČŠ: 8/05, ČVZ: 35, ev.č.: 79C1 – 06, označení vzorku: 1**
- 5) Modrý Portugal 2007, jakostní odrůdové, vinařská obec: Čejkovice, ČŠ: 808, označení vzorku: 5**
- 6) Modrý Portugal 2005, jakostní odrůdové, vinařská oblast: Znojemská, vinařská obec: Velké Bílovice, ČŠ: 407, označení vzorku: 6**
- 7) Rulandské modré 2005, pozdní sběr, vinařství LUDWIG, Poztory s.r.o., ČŠ: 098508, označení vzorku: 7**

- 8) **Rulandské modré 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Vinné sklepy Valtice, oblast: Morava, ČŠ: 346/9826, označení vzorku: 8**
- 9) **Rulandské modré 2005, jakostní odrůdové, vinařství: BALOUN, ČŠ: 74/08, označení vzorku: 9**
- 10) **Symposion 2005, jakostní odrůdové, vinařství: AMPELOS, vinařská obec: Vrbovec, ČŠ: 40, označení vzorku: 10**
- 11) **Svatovavřínecké 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Víno Mikulov, vinařská oblast: Morava, ČŠ: L1913519, označení vzorku: 1***
- 12) **Svatovavřínecké 2005, jakostní odrůdové, vinařství: Vinium Velké Pavlovice, IC: 21133, L029W44/06, označení vzorku: 2***
- 13) **Svatovavřínecké 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Velké Bílovice, vinařská oblast: Znojemská, ČŠ: 307, označení vzorku: 3***
- 14) **Cabernet Sauvignon 2005, jakostní odrůdové, vinařství: BALOUN, vinařská oblast: Mikulovská, ČŠ: 30/07, označení vzorku: 4***
- 15) **Cabernet Sauvignon 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Víno Mutěnice, ČŠ: 9 – 85, označení vzorku: 5***
- 16) **Cabernet Sauvignon 2005, pozdní sběr, vinařství: BÍZA, vinařská oblast: Velkopavlovická, viniční trať: Stará Hora, označení vzorku: 4**
Seznam bílých vín:
- 1) **Rulandské bílé 2006, jakostní odrůdové, vinařství: Vinné sklepy Valtice, vinařská obec: Valtice, viniční trať: Hintrály, ČŠ: 5/06, označení vzorku: 11**

- 2) **Rulandské bílé 2007, kabinetní víno, vinařství: MICHLOVSKÝ, vinařská obec: Hlohovec – Šulaperk, ČŠ: 2008 – 1319 – 2007, označení vzorku: 12**
- 3) **Rulandské bílé 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Čejkovice, Morava, ČŠ: 704, označení vzorku: 13**
- 4) **Rulandské bílé 2005, pozdní sběr, vinařství: Vinařství Černý, vinařská obec: Valtice, viniční trať: Calisty Dlúhé, označení vzorku: 17**
- 5) **Sylvánské zelené 2005, pozdní sběr, vinařská podoblast: Znojemská, vinařská obec: Vrbovec, viniční trať: Vinná Hora, ČŠ: 429, označení vzorku: 16**
- 6) **Veltínské zelené 2008, jakostní odrůdové, vinařství: Víno Mikulov, ČŠ: L1909615, označení vzorku: 7***
- 7) **Veltínské zelené 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Vinium Velké Pavlovice, vinařská podoblast: Slovácká, ČŠ: L34/07, označení vzorku: 8***
- 8) **Veltínské zelené 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Vinselekt Michlovský, vinařská podoblast: Slovácká, ČŠ: 2008 – 1413 – 2007, označení vzorku: 15**
- 9) **Ryzlink vlašský 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Víno Mikulov, ČŠ: L35/07, označení vzorku: 9***
- 10) **Ryzlink vlašský 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Vinium Velké Pavlovice, ČŠ: L378IW246/2, označení vzorku: 10***
- 11) **Ryzlink vlašský 2005, pozdní sběr, vinařství: REISTEN, vinařská obec: Pavlov, viniční trať: Pod Pálavou, ev.č.: 612-06/5, ČŠ: 1105, označení vzorku: 14**
- 12) **Müller Thurgau 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Vinné sklepy Roztoky - Alföldi Tájbor, ČŠ: 204, označení vzorku: 11***

13) Müller Thurgau 2007, jakostní odrůdové, vinařství: Velké Bílovice, vinařská podoblast: Slovácká, ČŠ: C4/07, označení vzorku: 12*

14) Müller Thurgau 2007, pozdní sběr, vinařství: Velké Bílovice, vinařská podoblast: Dambořice, viniční trať: Lichy, ev.č.: 54C1 – 08, ČŠ: 6/07, označení vzorku: 13*

Metodika vlastního experimentu – stanovení tyrosolu metodou HPLC

Vzorek vína byl před samotnou analýzou upraven – fenolické látky byly převedeny do roztoku diethyletheru. Z každé láhve se odpipetovalo 50 ml vína (vzorku), přidalo se předem definované množství diethyletheru, které činilo 25 ml. Vzorek vína byl 5 minut třepán společně s diethyletherem, po uplynutí této doby se oddělil podíl diethyletheru. Získaný podíl diethyletheru se přefiltroval přes bezvodný síran sodný (Na_2SO_4), aby se zbavil zbytkové vody. Pokaždé se ještě filtr se síranem promyl 5 ml diethyletheru a celý krok se znovu opakoval, opět se přidalo 25 ml diethyletheru ke vzorku a opět byl třepán po dobu 5 minut. Získaný podíl diethyletheru s fenolickými sloučeninami (vzorek cca o objemu 100 ml) byl odpařen do sucha na vakuové odparce a rozpuštěn ve 2 ml vodného roztoku methanolu v poměru 1 : 9. Tato metodika jak uvádí **Cabrita et. al. (2007)** byla použita při extrakci fenolických látek při stanovení vlivu jablečno-mléčného kvašení ve víně na nízkomolekulární hmotnost fenolických sloučenin, zde jsme ovšem tuto metodu modifikovali změnou poměru mobilní fáze a úpravou její pH hodnoty.

Před převedením do měřících fialek byl vzorek přefiltrován přes 0,45 μm membránový filtr Nylaflo od firmy Gelman, aby byl zajištěn plynulý průtok vzorku společně s mobilní fází skrz měřící kolonu kapalinového chromatografu. Všechny vzorky byly extrahovány ve dvou vyhotoveních.

Pro separaci fenolických látek se používají C18 kolony s reverzní fází (plněné silikagelem) a s binárním systémem rozpouštědel (tlumič – mobilní fáze), nejčastěji v kombinaci kyseliny octové nebo kyselinou mravenčí (tlumič) , se zředěným polárním rozpouštědlem jako je acetonitril nebo methanol (mobilní fáze). K identifikaci se obvykle používají UV-VIS nebo DAD detektory a občas se mohou používat i hmotnostní detekční

metody, které vedou ke spolehlivější identifikaci látek. Velmi vzácně se k detekci používá fluorescence.

V našem případě jsme použili pro separaci látek kolonu Superpher® 100, C18 (5 µm balení, 250 mm x 4,6 mm i.d.) od společnosti Merck (Německo). Mobilní fází byla směs kyseliny mravenčí a methanolu v poměru 90 : 10, pH hodnota vodní fáze (mobilní) byla 3. Průtok mobilní fáze systémem činil 1 ml .min⁻¹. Samotná identifikace probíhala na přístroji HPLC Dionex s kvarterní pumpou a degasérem, autosamplerem, termostatem kolon, Diode-Array detektorem, UV-VIS detektorem, softwarem Chromeleon 6.8 + Chromeleon PDA Control gradientovou elucí. V průběhu eluce narůstal poměr methanolu v mobilní fázi, až na konečných 100 %, z důvodu promytí kolony (cca 5 minut). Detekce probíhala na UV-VIS detektoru (skenování oblasti od 190 do 400 nm) byly zaznamenány všechny vrcholy. Fenolické sloučeniny byly identifikovány pomocí elučního pořadí, retenčních časů a také podle spekter UV. Samotný tyrosol byl detekován při vlnové délce 280 nm.

4 VÝSLEDKY

Cílem mého měření bylo zjistit množství fenolické látky tyrosolu ve vínech, která byla vyrobena ve vinařských oblastech České republiky.

Z naměřených hodnot retenčních časů můžeme konstatovat, že použitá metodika pro stanovení obsahu fenolických látek ve víně, konkrétně pro tyrosol byla velice přesná a její výsledky můžeme považovat za reprodukovatelné.

Na začátku měření se nejprve připravily dvě sady kalibračních standardů, každá z nich čítala 5 standardů o různé koncentraci tyrosolu (25, 50, 100, 200 a 350 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Graf č.1: Kalibrační křivka I.



Graf č.2: Kalibrační křivka II.



Tabulka č.1: Naměřené hodnoty tyrosolu v červených vínech

Označení vzorku	Název vína	Množství tyrosolu [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
2	Frankovka 2005, vinařství: LACINA	174,80
3	Frankovka 2005, vinařství: Ludvík Maděrič	166,47
6*	Frankovka 2007, vinařství: Vinium Velké Pavlovice	294,75
1	Modrý Portugal 2005, vinařství: HORT	158,03
5	Modrý Portugal 2007, vinařská obec: Čejkovice	275,23
6	Modrý Portugal 2005, vinařská obec: Velké Bílovice	281,13
7	Rulandské modré 2005, vinařství LUDWIG	226,12
8	Rulandské modré 2007, vinařství: Vinné sklepy Valtice	203,60
9	Rulandské modré 2005, vinařství: BALOUN	152,72
10	Symposion 2005, vinařství: AMPELOS	313,26
1*	Svatovavřínecké 2007, vinařství: Vino Mikulov	153,01
2*	Svatovavřínecké 2005, vinařství: Vinium Velké Pavlovice	221,69
3*	Svatovavřínecké 2007, vinařství: Velké Bílovice	318,57
4*	Cabernet Sauvignon 2005, vinařství: BALOUN	166,20
5*	Cabernet Sauvignon 2007, vinařství: Vino Mutěnice	318,58
4	Cabernet Sauvignon 2005, vinařství: BÍZA	206,86

Tabulka č.2: Naměřené hodnoty tyrosolu v bílých vínech

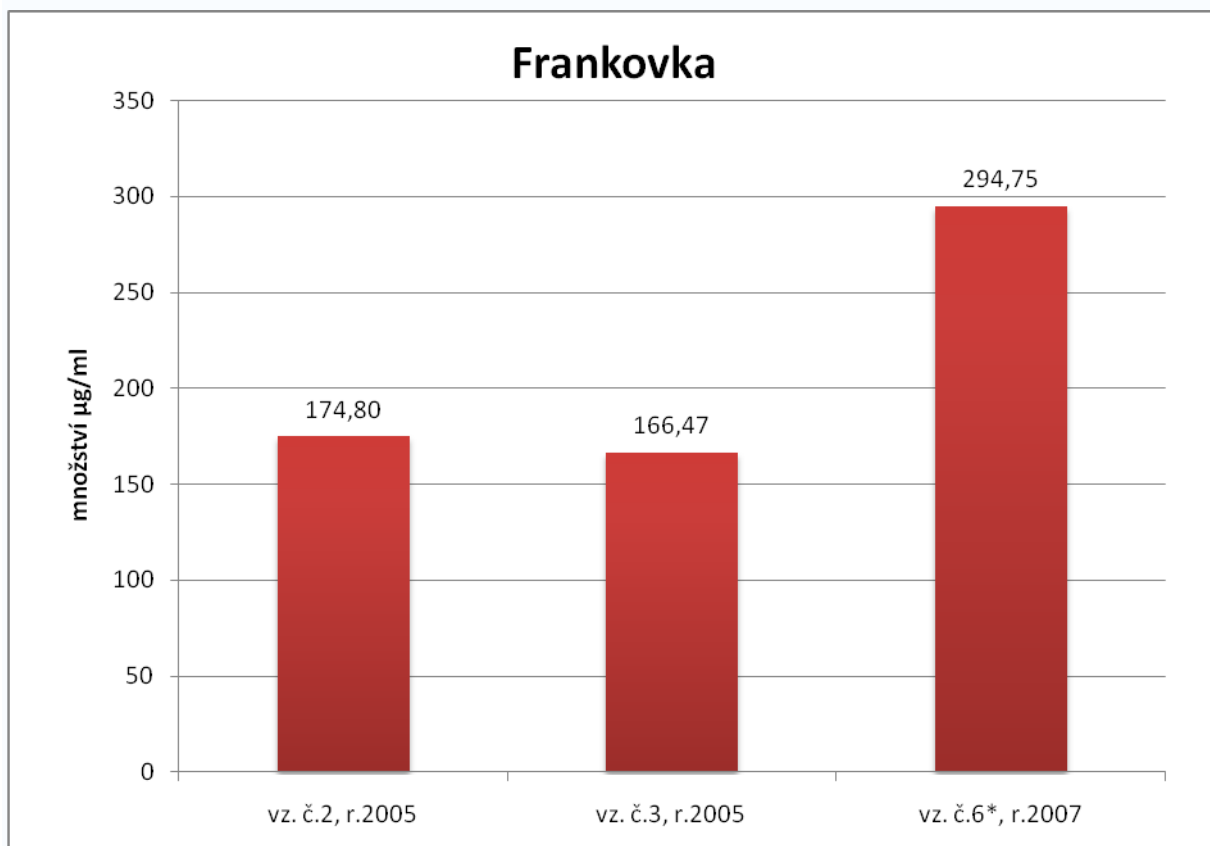
Označení vzorku	Název vína	Množství tyrosolu [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
11	Rulandské bílé 2006, vinařství: Vinné sklepy Valtice	89,46
12	Rulandské bílé 2007, vinařství: MICHLOVSKÝ	94,65
13	Rulandské bílé 2007, vinařství: Čejkovice	90,04
17	Rulandské bílé 2005, vinařství: Vinařství Černý	166,00
16	Sylvánské zelené 2005, vinařství: Vinná Hora	204,95
7*	Veltínské zelené 2008, vinařství: Víno Mikulov	41,21
8*	Veltínské zelené 2007, vinařství: Vinium Velké Pavlovice	163,74
15	Veltínské zelené 2007, vinařství: Vinselekt Michlovský	141,58
9*	Ryzlink vlašský 2007, vinařství: Víno Mikulov	166,93
10*	Ryzlink vlašský 2007, vinařství: Vinium Velké Pavlovice	52,16
14	Ryzlink vlašský 2005, vinařství: REISTEN	131,78
11*	Müller Thurgau 2007, vinařství: Vinné sklepy Roztoky - Alföldi Tájbor	170,53
12*	Müller Thurgau 2007, vinařství: Velké Bílovice	111,93
13*	Müller Thurgau 2007, vinařství: Velké Bílovice	144,43

Z naměřených výsledků je zřejmé, že obsah tyrosolu je u červených vín vyšší než u bílých vín. Hlavním důvodem je způsob výroby, při výrobě červených vín se po odzrnění nechává rmut nakvašovat, aby se z hroznů uvolnily barviva a aromatické látky (fenolické látky), které jsou ve slupce hroznů, těsně pod jejím povrchem. Proto je třeba bobule mechanicky rozrušit, vyluhování je tím intenzivnější. Podle toho jaký typ vína má být docílen se doba nakvašování pohybuje od 3 dnů do 3 týdnů. Ohřevem rmutu se z hroznů získá nejvíce barviv, aromatických látek a inaktivují se některé enzymy, zejména polyfenoloxidas, které vyvolávají hnědnutí moštu a vína.

Dalšími faktory, které působí na koncentraci polyfenolických látek ve víně jsou: teplota při maceraci (studená cesta x teplá cesta), obsah alkoholu a působení pektolytických enzymů. Především je to, ale zvolená technologie vinaře, geografická poloha vinohradu, zásoba živin v půdě a také nesmíme zapomenout na klimatické podmínky, které mají vliv během vegetace na úrodu hroznů.

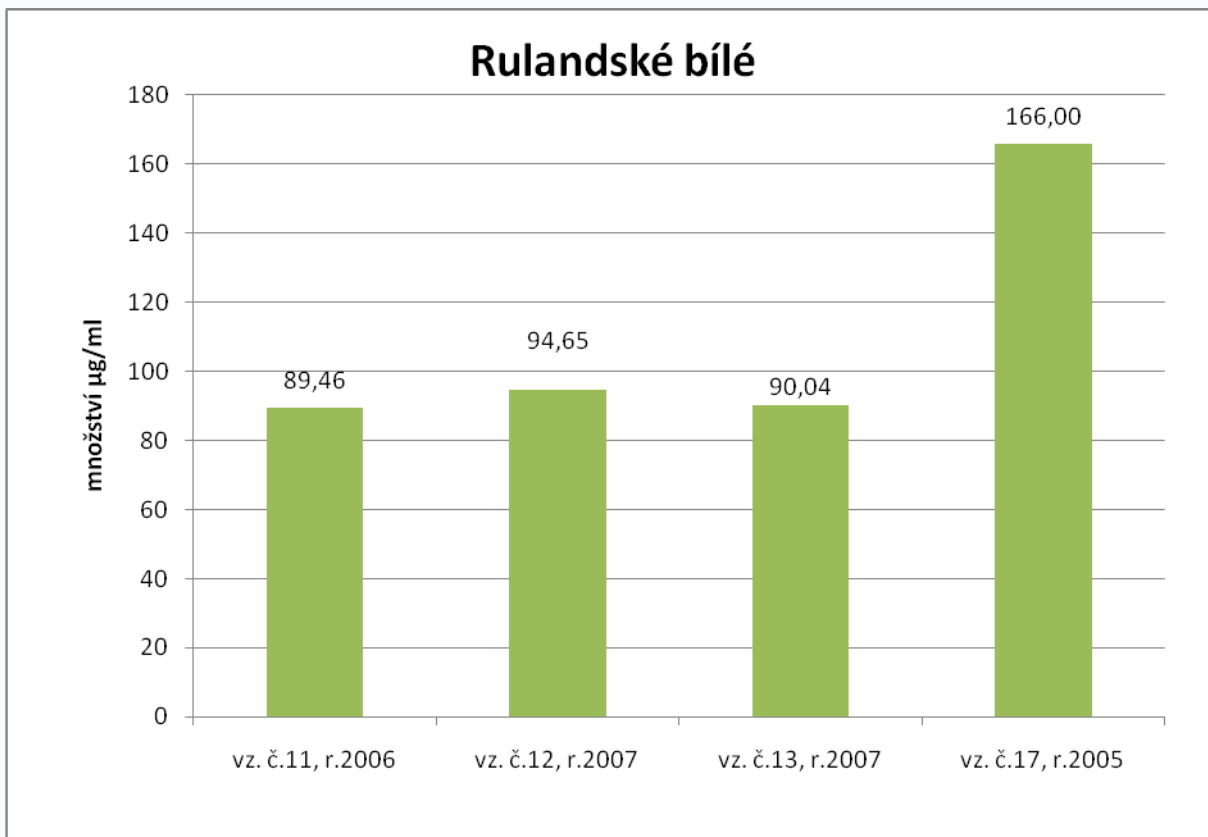
Porovnání vzorků jednotlivých odrůd červených vín:

Graf č.3: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Frankovka

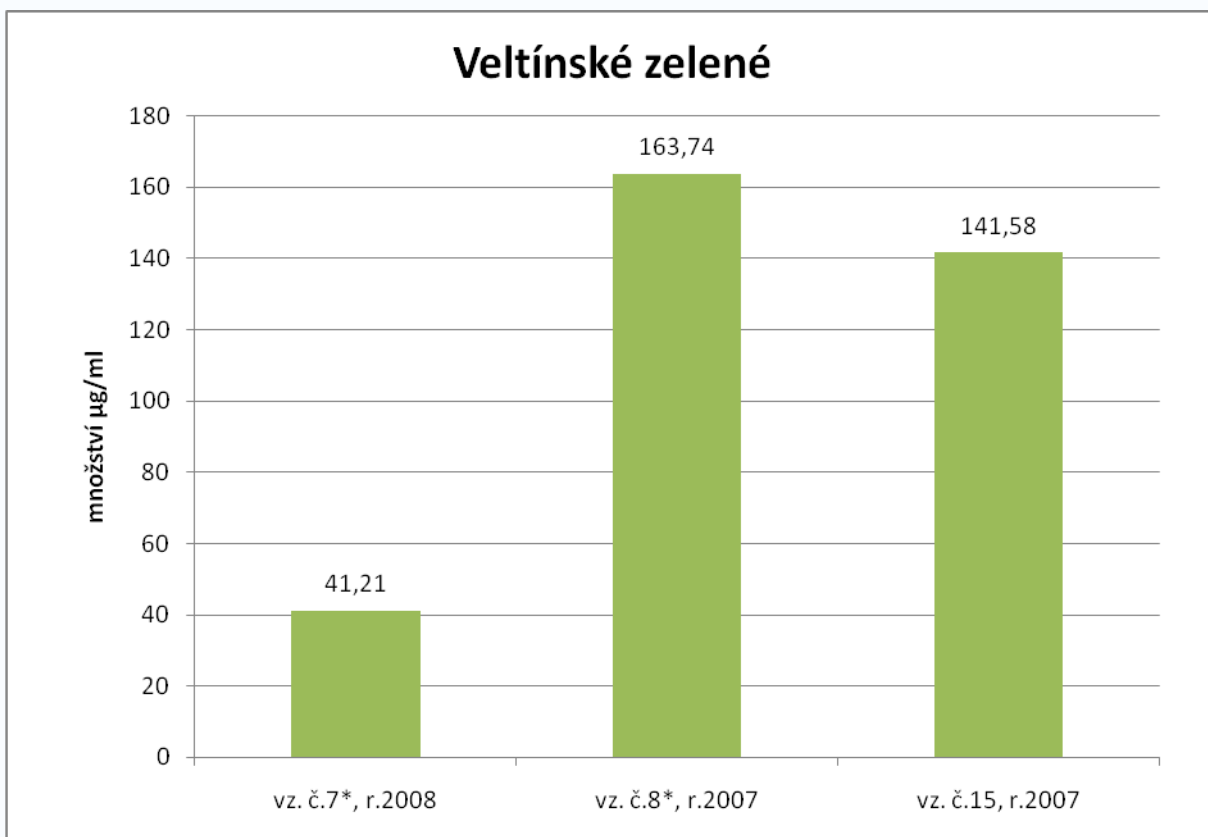


Porovnání vzorků jednotlivých odrůd bílých vín:

Graf č.4: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Rulandské bílé



Graf č.5: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Veltínské zelené



5 DISKUZE

Tyrosol vzniká jako sekundární produkt při alkoholovém kvašení vína. Během kvasného procesu *Saccharomyces cerevisiae* odbourávají aromatické aminokyseliny (zejména tyrosin, fenylalanin a tryptofan) a rozvětvené aminokyseliny (valin, leucin a isoleucin) pomocí Ehrlichovy cesty. Degradace tyrosinu na tyrosol probíhá v následujících krocích: 1. deaminace aminokyseliny k odpovídající α -ketokyselině, 2. dekarboxylace získané α -ketokyseliny na aldehyd a za 3. redukce aldehydu k vytvoření odpovídající dlouhého řetězce nebo komplexního alkoholu, známého jako přiboudlina, která jako jednu z dílčích složek obsahuje tyrosol.

Cílem diplomové práce bylo zjistit množství tyrosolu v jakostních odrůdových vínech vyrobených v České republice a poukázat na všeobecně známý fakt, a to na značně větší podíl polyfenolických látek, konkrétně tyrosolu, v červených odrůdách oproti bílým. Vyšší podíl aromatických látek v červených vínech je zapříčiněn odlišným způsobem výroby, kdy se po lisování nechá rmut společně se slupkami a pečičkami macerovat. Tím dochází k uvolnění anthokyaninů (sloučeniny odpovědné za barvu vína) a polyfenolických látek.

Jak uvádí Fernández-Pachón a kol. (2006) hodnoty tyrosolu, které naměřili u bílých vín, se pohybovaly pouze okolo hodnoty $2,51 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Naměřené hodnoty u červených a sherry vín byly shodné, obsah tyrosolu byl $17,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Zjištěné výsledky potvrdily vyšší hodnoty fenolických látek u červených vín. Tyto hodnoty se značně lišily od výsledků této práce, co se týká množství naměřeného tyrosolu. Průměrná hodnota obsahu tyrosolu u analyzovaných vzorků červeného vína byla $221,18 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a u vzorků bílých vín to bylo $120,34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ tyrosolu, což jsou daleko větší hodnoty než, které uvádějí autoři článku.

Z naměřených hodnot vlastního pokusu vyplývá skutečnost, že vyšší množství fenolických látek (tyrosolu) by nemělo být spojováno jen s víny vyrobenými z hroznů červených odrůd (např. vzorek č.16 Sylvánské zelené ročník 2005 obsahovalo neuvěřitelných $204,95 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ tyrosolu). Další skutečností je, že i víno ze stejné odrůdy, od dvou různých výrobců, ale ve vyrobené ve stejném kalendářním roce, např. Ryzlink vlašský 2007 vykazuje velké rozdíly, co se týká množství obsaženého tyrosolu a to v řádově desítkách mikrogramů na 1 mililitr vína – vzorek č.9* obsahoval $166,93 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, naproti tomu vzorek č.10* obsahoval pouhých $52,16 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ tyrosolu, což je třikrát méně. Četné rozdíly jsou i u červených odrůd vína, kupříkladu Svatovavřínecké. Ve vzorku č.1* ročník 2007 byl zjištěn obsah $153,01 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ tyrosolu, avšak u vzorku č.3* taktéž ročník 2007 byl obsah tyrosolu dvakrát tak větší a to $318,57 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Diference se týkají také různých ročníků, pro příklad u

odrůdy Veltínské zelené ročník 2007 a 2008, u červené odrůdy Cabernet Sauvignon ročník 2005 a 2007, můžeme pozorovat značné rozdíly v naměřených datech.

Z výsledků lze vyvodit, že vyšší obsah tyrosolu nemusí být vždy spojován s víny vyrobenými z červených hroznů. Je zde mnoho různých faktorů, které mohou ovlivnit obsah fenolických látek ve víně. Například to může být způsobeno biotickými a abiotickými stresy během vegetace a dozrávání hroznů. Mezi abiotické stresy patří vliv klimatických podmínek (ročníku), rezidua pesticidů a také výskyt těžkých kovů v půdě (olovo, kadmium, rtuť). Mezi biotické stresy patří vliv škodlivých organismů (Peronospora, padlí révy vinné, plíseň šedá) a jejich rozvoj je též závislý na faktorech počasí, ale převládajícím faktorem je vliv choroby nebo vliv poškození od škůdců. V mírném pásmu převládají biotické stresy způsobené výskytem chorob. Jedním z hlavních faktorů je zvolená odrůda pro danou lokalitu, ale též, pravděpodobně nejdůležitější faktor, správně vybraná technologie pro zpracování hroznů, z hlediska konečného obsahu alkoholu ve víně, který podporuje uvolnění aromatických látek do vína, použitá kultura kvasinek, která právě během kvašení čerpá potřebný dusík z tyrosinu a přeměňuje ho na sekundární metabolit tyrosol. V průběhu zrání vína může rozhodovat o možném obsahu tyrosolu fakt, jestli se budoucí víno nechá „ležet na kvasnicích“ nebo se z nich stočí. Všechny výše uvedené faktory mohou zasáhnout do obsahu tyrosolu ve víně.

6 ZÁVĚR A DOPORUČENÍ

V této diplomové práci jsem se zaměřil na stanovení tyrosolu ve vínech z České republiky. Snažil jsem se objasnit, jestli existuje určitá závislost mezi množstvím tyrosolu a množstvím polyfenolických látek obsažených ve víně, z hlediska porovnání červených odrůd, které jsou mnohem bohatší na tyto aromatické látky, oproti odrůdám bílým.

Naměřené hodnoty tuto závislost zcela neprokázaly, proto bych doporučoval experiment zopakovat a rozšířit. V první řadě bych navrhl větší sortiment stanovovaných odrůd a rozšíření množství analyzovaných vzorků, co se týče četnosti ročníků a výrobců vín popř. porovnat obsah tyrosolu ve vínech pěstovaných v mírném pásu oproti subtropickému. Dále bych se zaměřil, jestli existuje závislost mezi obsahem alkoholu a obsahem tyrosolu ve víně a zjistit, zda je tato závislost lineární. K použité metodě HPLC bych navrhl možnost kvalitativního stanovení široké škály fenolických látek, které mají antioxidační účinky, jejich množství vzhledem k obsahu alkoholu ve víně, a také k jejich rozdílnému množství z hlediska odlišné geografické polohy vinohradu.

7 SEZNAM LITERATURY

ALONSO Angeles M. , Remedios CASTRO, M. Carmen RODRIGUEZ, Dominico A. GUILLEN, Carmelo G. BARROSO Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International*. 2004, 37, s. 715–721.

BOSELLI Emanuele, Massimo MINARDI, Andrea GIOMO, Natale G. FREGA, Phenolic composition and quality of white d.o.c. wines from Marche . *Analytica Chimica Acta*. 2006, 563, s. 93-100.

BULKOVÁ Věra. *Protektivní látky rostlinného ptvodu v prevenci neinfekčních chorob* [online]. Brno : Informační systém Masarykovy univerzity, 2008. 144 s. Dizertační práce. Masarykova univerzita. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/34031/lf_d/Bulkova-Protektivni_latky_rostlinneho_ptvodu_v_prevenci.pdf>.

CABRITA Miguel J., M. TORRES, V. PALMA, E. ALVES, R. PATAO, A.M. COSTA FREITAS, Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta* [online]. August 2007, 74, [cit. 2010-04-02]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.techlib.cz/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6THP-4PMJJY7-4-9&_cdi=5288&_user=640817&_pii=S0039914007006078&_orig=search&_coverDate=02%2F15%2F2008&_sk=999259994&view=c&wchp=dGLbVzz-zSkzk&_valck=1&md5=b911f88eb01cc5a94ccf4bfb5391ba4d&ie=/sdarticle.pdf>.

CAO Xueli, CongWANG, Hairun PEI, Baoguo SUN, Separation and identification of polyphenols in apple pomace by high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216, s. 4268–4274.

CHIOU Antonia, Vaios T. KARATHANOS, Anastasia MYLONA, Fotini N. SALTA, Fani PREVENTI, Nikolaos K. ANDRIKOPOULOS, Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2006, 463, s. 65-73.

CUI Hua; HE, Caixia; ZHAO, Guiwen. Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1999, 855, s. 171–179.

DE MARCO Elena, Maria SAVARESE, Antonello PADUANO, Raffaele SACCHI, Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*. 2007, 104, s. 858–867.

DIVIŠ Jiří. *Agroweb.cz* [online]. 10.10.2008 [cit. 2010-04-06]. Ekologické pěstování a kvalita hlíz. Dostupné z WWW: <http://www.agroweb.cz/Ekologicke-pestovani-a-kvalita-hliz__s257x31894.html>.

D'INCECCO Nadia, Eveline BARTOWSKY, Stella KASSARA, Anna LANTE, Paolo SPETTOLIA, Paul HENSCHKE, Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology*. 2004, 21, s. 257-265.

DVOŘÁKOVÁ Markéta, Petr HULÍN, Marcel KARABÍN, Pavel DOSTÁLEK, Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech journal of food science*. 2007, 25, s. 182-188.

FARKAŠ Ján. *Technológia a biochémia vína*. Bratislava : Alfa, 1973. Třísloviny a jiné fenolické látky, s. 872.

FERNÁNDEZ-PACHÓN Manuel S., D. VILLANO, A.M. TRONCOSO, M.C. GARCÍA-PARRILLA, Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 563, s. 101-108.

GIL Angel M., I.F. DUARTE, M. GODEJOHANN, U. BRAUMANN, M. MARASCHIN, M. SPRAUL, Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 2003, 488, s. 35–51.

GÓMEZ-MÍGUEZ José , Lourdes GONZÁLEZ-MIRET, Dolores HERNANZ, M. Angeles FERNÁNDEZ, Isabel MA VICARIO, Francisco J. HEREDIA, Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*. 2007, 78, s. 238–245.

JORDÁN Václav; HEMZALOVÁ, Marie. *Antioxidanty zázračné zbraně a jejich využití pro zdravý život*. Brno : JOTA, 2001. Tyrosin, s. 148.

KRAUS Vilém, et al. *Velký vinařský slovník*. Praha : Radix, 2007. Technologie barrique , s. 396.

KYSELÁKOVÁ Marie, Hodnocení jakosti zemědělských produktů, potravin a potravinářských surovin. In *Vliv suroviny a technologie zpracování na obsah zdravotně prospěšných polyfenolických látek v révových vínech*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 5.1.2005 [cit. 2010-04-09]. Dostupné z WWW: <www.mze-vyzkum-infobanka.cz/DownloadFile/5405.aspx>.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, CH., REMESY, CH., JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Journal of Clinical Nutrition*, 2004, Vol.79, No. 5, s. 727-747.

MAO Yu; LI, Yan ; YAO, Ning. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in extracts of *Rhodiola L.* by microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2007, 45, s. 510–515.

MARTÍNEZ-ORTEGA Valle M.; GARCÍA-PARRILLA, Carmen M.; TRONCOSO, Ana M. Comparison of different sample preparation treatments for the analysis of wine phenolic compounds in human plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 502, s. 49-55.

MATOS Luis Carlos, José A. PEREIRA, Paula B. ANDRADE, Rosa M. SEABRA, M. Beatriz P.P. OLIVEIRA, Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry*. 2007, 102, s. 976–983.

MIKEŠ Ondřej, Naděžda VRCHOTOVÁ, Jan TRŽÍSKA, Marie KYSELÁKOVÁ, Jan ŠMIDRKAL, Distribution of Major Polyphenolic Compounds in Vine Grapes of Different Cultivars Growing in South Moravian Vineyards. *Czech Journal of Food Science*. 2008, 26, s. 182–189.

MONAGAS Maria; GÓMEZ-CORDOVÉS, Carmen; BARTOLOMÉ, Begoña. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chemistry*. 2007, 104, s. 814–823.

OWEN Robert W., Attilio GIACOSA, William E. HULL, Roswitha HAUBNER, Gerd WÜRTELE, Bertold SPIEGELHALDER, Helmut BARTSCH, Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol*. 2000, 1, s. 107-112.

Pathway.yeastgenome.org [online]. 2007 [cit. 2010-03-17]. Ehrlichova cesta. Dostupné z WWW: <<http://pathway.yeastgenome.org:8555/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY3O-4108&detail-level=3>>.

PROSTOSERDOV, Nikolaj N. *Osnovy vinodelie*. Moskva : Piščepromizdat, 1955. Dusíkaté látky ve víně, s. 212.

QUEIROZ Yara, Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. *Food chemistry* [online]. July 2009, 115, [cit. 2010-04-06]. Dostupný z WWW: <<http://web.ebscohost.com.ezproxy.techlib.cz/ehost/detail?vid=11&hid=108&sid=a4ac46d0-e92b-4bcd-afc5-cbb1cd4dbdc9%40sessionmgr112&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#db=a9h&AN=36781575>>.

RAKASH, Dhan; SINGH, Brahma N.; UPADHYAY, Garima. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food chemistry* [online]. June 2007, 102, [cit. 2010-04-06]. Dostupný z WWW: <<http://web.ebscohost.com.ezproxy.techlib.cz/ehost/detail?vid=6&hid=108&sid=a4ac46d0-e92b-4bcd-afc5-cbb1cd4dbdc9%40sessionmgr112&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#db=a9h&AN=23881165>>.

RIBEREAU-GAYON , Pascal; PEYNAUD, Emile. *Traité d'oenologie. II. Composition, transformation et traitements des vins*. Paris : Dunod, 1966. Dusíkaté látky ve víně, s. 651.

ROMANI, Annalisa, P. PINELLI, N. MULINACCI, C. GALARDI, F. F. VINCIERI, L. LIBERATORE, A. CICHELLI, HPLC and HRGC analyses of polyphenols and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia* [online]. 2001, 53, [cit. 2010-04-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com.ezproxy.techlib.cz/content/a17t401135w611x0/?p=5440005023b946d58d9d9700cfc76e03π=3>>.

SAUNDERS, Caroline. The anti-proliferative effect of different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells. *Bioscience Horizons: The National Undergraduate Research Journal* [online]. June 2009, 2, [cit. 2010-04-06]. Dostupný z WWW: <<http://web.ebscohost.com.ezproxy.techlib.cz/ehost/detail?vid=4&hid=108&sid=3e9fda0a-d545-44a4-bba5-366074d1b025%40sessionmgr112&bdata=JnNpdGU9ZWZWhvc3QtG12ZQ%3d%3d#db=a9h&AN=45305018>>.

SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*, 2004, 98, str. 239–245.

SPRINGSTEEL, Mark S., Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Natural and Synthetic Flavonoid Compounds in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Oxford Journals* [online]. August 2004, 82, [cit. 2010-04-09]. Dostupný z WWW: <<http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/82/1/70>>.

SVILAAS Arne, *Nescafé.cz* [online]. 2004 [cit. 2010-04-06]. Káva a zdraví. Dostupné z WWW: <<http://www.nescafe.cz/slozeni-kavy.aspx>>.

TÁBORSKÁ, Eva; SLÁMA, Jaromír. *Lékařská chemie*. 1. Brno : Masarykova univerzita, 2001. Obecná a anorganická chemie, s. 134.

TORRE-CARBOT, Karina de la, Jorge L. CHÁVEZ-SERVÍN, Olga JÁUREGUI, Ana I. CASTELLOTE, Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS, Montserrat FITÓC, María-Isabel COVAS, Daniel MUNOZ-AGUAYO, M. Carmen LÓPEZ-SABATER, Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 583, s. 402–410.

TUCK, Kellie L.; HAYBALL, Peter J. . Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, 13, s. 636-644.

VINAS Pilar, Natalia CAMPILLO, Nelson MARTÍNEZ-CASTILLO, Manuel HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216, s. 1279–1284.

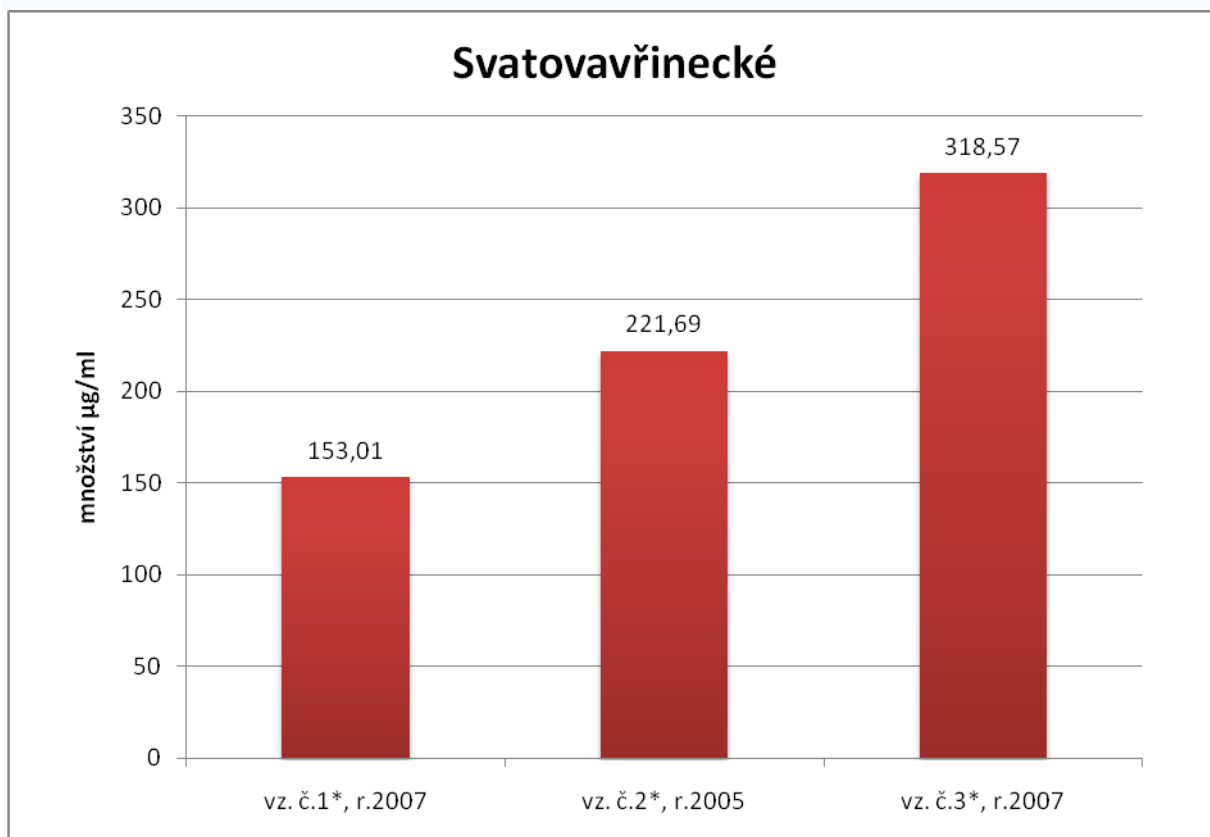
Vino a zdraví [online]. 2003-2004 [cit. 2010-03-10]. Víno jako lék - vliv vína na lidské orgány. Dostupné z WWW: <http://www.vinoazdravi.cz/index.php?soubor=vliv_vina_na_lidske_organy>.

Vinoforum.eu [online]. 2007 [cit. 2010-04-09]. Víno a zdraví. Dostupné z WWW: <<http://www.vinoforum.eu/vino-a-zdravi.php>>.

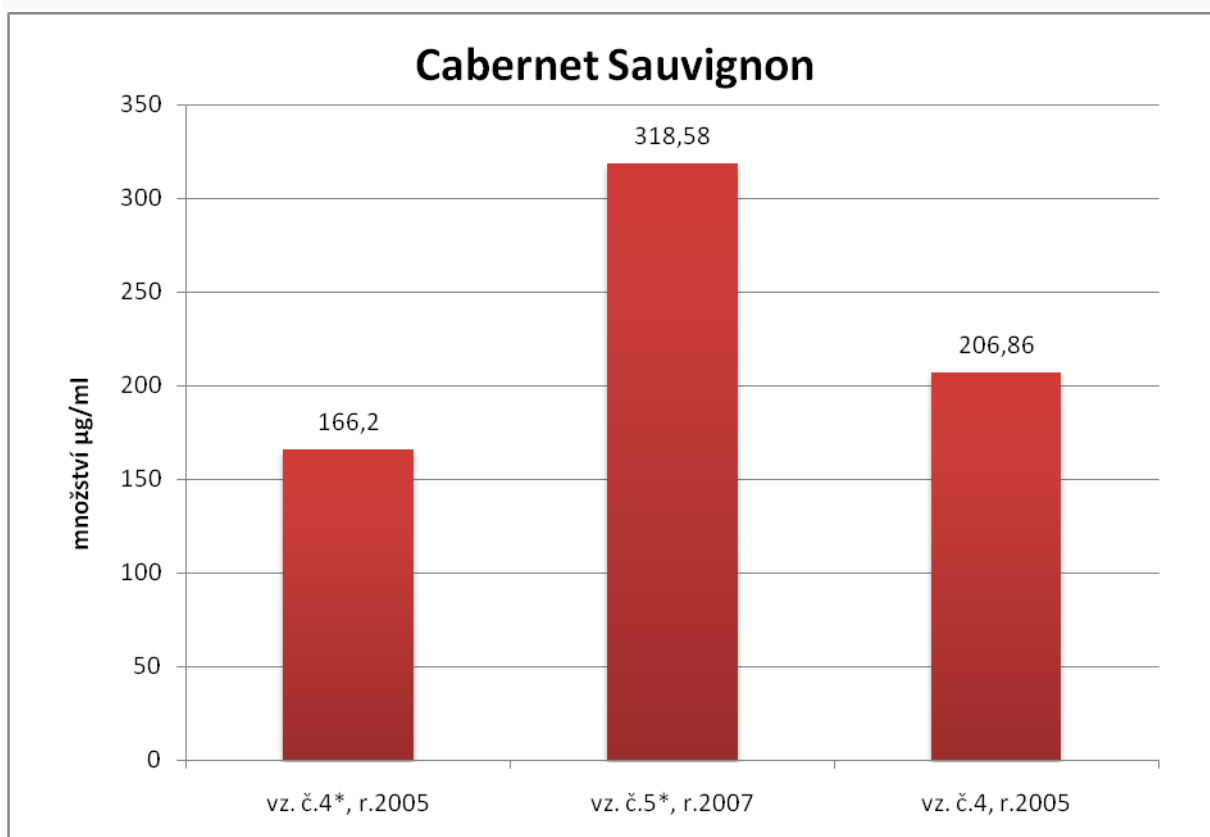
Zdrava-rodina.cz [online]. 27. 11. 2000 [cit. 2010-04-08]. DIETOLOGIE / STRANA 10 / MEDICÍNA 10 / VII. Dostupné z WWW: <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1000/med1000_18.html>.

8 PŘÍLOHY

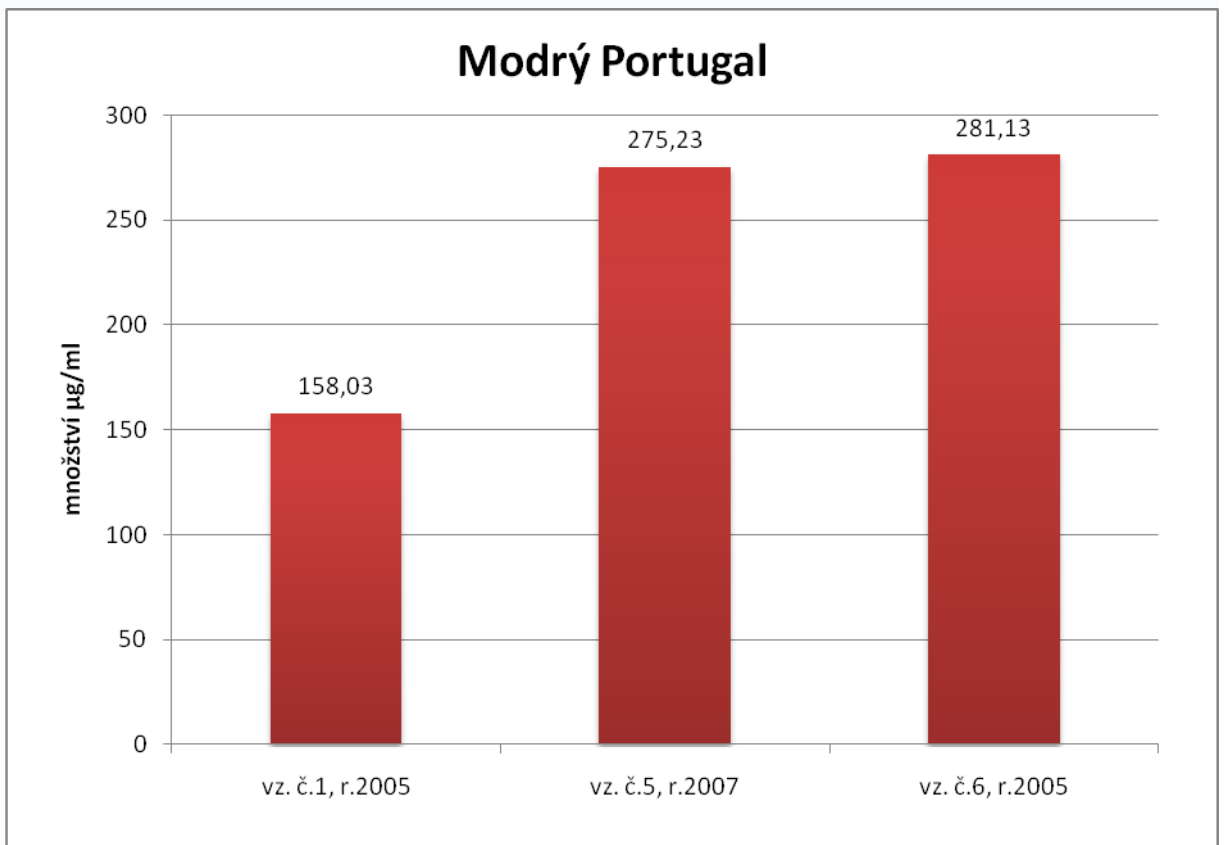
Graf č.6: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Svatovavřínecké



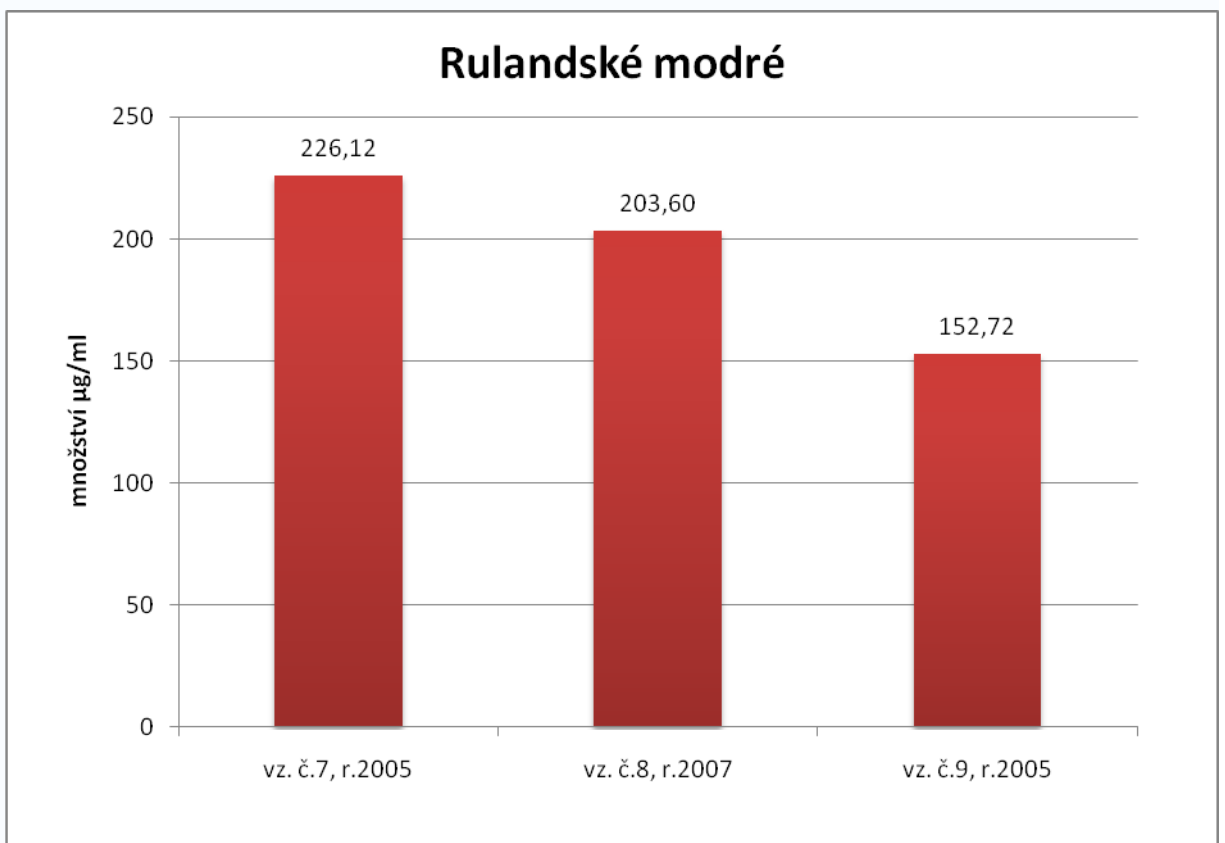
Graf č.7: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Cabernet Sauvignon



Graf č.8: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Modrý Portugal



Graf č.9: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Rulandské modré



Graf č.10: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Ryzlink vlašský



Graf č.11: Srovnání obsahu tyrosolu ve vzorcích vína odrůdy Müller Thurgau

