

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

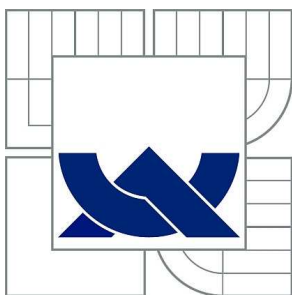
SROVNÁNÍ OBSAHU ANTHOKYANOVÝCH BARVIV VE VYBRANÝCH  
ODRŮDÁCH BEZU ČERNÉHO A VINNÝCH HROZNŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. ELIŠKA BECKOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## SROVNÁNÍ OBSAHU ANTHOKYANOVÝCH BARVIV VE VYBRANÝCH ODRŮDÁCH BEZU ČERNÉHO A VINNÝCH HROZNŮ

COMPARISON OF CONTENT ANTHOCYANIN PIGMENTS IN SELECTED CULTIVARS OF BLACK  
ELDERBERRY AND GRAPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ELIŠKA BECKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2012



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0669/2011** Akademický rok: **2011/2012**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Eliška Becková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí práce **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název diplomové práce:

Srovnání obsahu anthokyanových barviv ve vybraných odrůdách bezu černého a vinných hroznů

### Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná charakteristika vybraného ovoce a jeho využití v potravinářství
- 2) Anthokyany, jejich vlastnosti a využití v potravinářském průmyslu
- 3) Metody stanovení anthokyanů

Experimentální část:

- 1) Ověření použitých metod stanovení na standardech
- 2) Analýzy anthokyanových barviv v reálných vzorcích ovocných šťáv
- 3) Zpracování získaných dat a interpretace výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Eliška Becková  
Student(ka)

-----  
RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Náplní této diplomové práce bylo srovnání obsahu anthokyanových barviv v různých odrůdách šlechtěného bezu černého (*Sambucus nigra* L.). Dále byl studován vztah mezi obsahem anthokyanových barviv ve vybraných vzorcích modrých odrůd hroznů (*Vitis vinifera* L.) a polohu trati, kde byly hrozny vypěstovány.

Teoretická část práce charakterizuje vlastnosti černého bezu a vinných hroznů po stránce botanické, chemické a jejich využití v potravinářském průmyslu. Dominantní část tvoří popis anthokyanových barviv, možnosti jejich stanovení ve vzorcích černého bezu a vinných hroznů s důrazem na metodu pH-diferenciální a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Cílem první experimentální části bylo porovnat obsah celkových anthokyanů v patnácti odrůdách černého bezu. Pro pěstování černého bezu na území České republiky byly pomocí použitých metod HPLC a pH-diferenciální vyhodnoceny jako nejvhodnější odrůdy Mammut, Samyl a Riese aus Vossloch, které svým obsahem anthokyanů předčily ostatních dvanáct odrůd.

Následná druhá část experimentální nabízí přehled celkových anthokyanů v devíti odrůdách modrých kultivarů vinné révy, pěstovaných v mikulovské oblasti. Použitými metodami stanovení byly opět HPLC a pH-diferenciální. Nejvyšší produkci barviv představovaly odrůdy Alibernet a Neronet. Současná studie, zaměřující se na vhodnost polohy viniční tratě, poukázala na jižní až jihovýchodní orientaci výsadby.

Závěrem experimentální části bylo provedeno srovnání obou metod stanovení. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie poskytovala velmi přesné výsledky oproti méně náročné pH-diferenciální metodě stanovení, která se ukázala vhodná pro orientační měření obsahu anthokyanů v reálných vzorcích.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Anthokyanová barviva, černý bez, vinná réva, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, pH-diferenciální metoda stanovení celkových anthokyanů.

## **ABSTRACT**

The purpose of this thesis is to compare the contents anthocyanins in different varieties of European elderberry (*Sambucus nigra* L.). It was also studied the relationship between the content anthocyanins in selected samples of blue grape varieties (*Vitis vinifera* L.) and position of the track, where the grapes were grown.

The theoretical part describes elderberries and grapes in terms of botanical, chemical, and in terms of their using in the food industry. The dominant part of this chapter is to describe anthocyanins and possibilities for their determination in the elderberry and grapes. Emphasis has been placed on the pH-differential method and determination by high performance liquid chromatography.

The experiments are divided into two parts. The aim of the first experimental part is comparison of the total anthocyanins content in fifteen varieties of elderberry. The performed analysis shows that in terms of anthocyanins content for cultivation of elderberry in the Czech Republic the most suitable varieties are Mammut, Samyl, Reis aus Vossloch and Haschberg.

In the second part of the experiments were determined total anthocyanins content in nine varieties of blue grape grown in the Mikulov region. For determination were used HPLC and pH-differential methods, as well as in the first part. The highest content of pigments was found in varieties Alibernet and Neronet. The present study focused on the suitability of the location pointed to vineyard south to southeast orientation plantings.

At the end of the experimental part is a comparison of both methods of determination. Method using high performance liquid chromatography to provide very accurate results compared to less demanding pH-differential method of determination. This is recommended only for tentative determination of anthocyanins content in real samples.

## **KEYWORDS**

Anthocyanin pigments, elderberry, grapevine, high-performance liquid chromatography, the pH-differential method for the determination of total anthocyanins.

BECKOVÁ, E. *Srovnání obsahu anthokyanových barviv ve vybraných odrůdách bezu černého a vinných hroznů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 86 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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**

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní RNDr. Mileně Vespalcové Ph.D. za vstřícný přístup a poskytnutí cenných rad a připomínek v průběhu řešení diplomové práce.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	Černý bez ( <i>Sambucus nigra</i> L.).....	8
2.2	Vinná réva ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	12
<b>3</b>	<b>ANTHOKYANOVÁ BARVIVA</b> .....	<b>21</b>
3.1	Struktura .....	21
3.2	Vlastnosti a reakce .....	23
3.3	Výskyt .....	25
3.4	Biosyntéza anthokyanů.....	25
3.5	Použití v potravinářském průmyslu .....	26
3.6	Pozitivní účinky anthokyanů na lidský organismus.....	27
<b>4</b>	<b>METODY STANOVENÍ ANTHOKYANŮ</b> .....	<b>28</b>
4.1	Papírová a tenkovrstvá chromatografie .....	28
4.2	pH diferenciální metoda .....	28
4.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	30
4.4	Stanovení anthokyanů černém bezu.....	39
4.5	Stanovení anthokyanů v modých odrůdách vinné révy.....	41
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>43</b>
5.1	Pomůcky .....	43
5.2	Přístroje .....	43
5.3	Chemikálie.....	43
5.4	Rostlinný materiál a příprava vzorku.....	44
5.5	Stanovení anthokyanů pH-diferenciální metodou.....	47
5.6	Stanovení anthokyanových barviv kapalinovou chromatografií.....	47
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>50</b>
6.1	Černý bez.....	50
6.2	Vinná réva .....	59
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLU</b> .....	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>77</b>
<b>11</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>78</b>

# 1 ÚVOD

Květy i plody černého bezu (*Sambucus nigra*) se již v minulosti staly součástí lidského léčitelství a lidové kuchyně. Díky dnešním moderním lékařským metodám bylo prokázáno, že černý bez má pozitivní účinky na cévní systém člověka, snižuje horečku, podporuje správné trávení a může přispívat k prevenci proti rakovině. Bezinky obsahují nezanedbatelné množství vitamínu C a jsou výborným zdrojem anthokyanových barviv. Především plody byly a jsou používány na výrobu marmelád, sirupů, zavařenin i vína. Díky vysokému obsahu barviv nacházejí nyní široké uplatnění v potravinářském průmyslu, zejména jako barvivo vhodné k obarvení džusů, jogurtů a mnoha dalších výrobků.

Černý bez patří do čeledi *Caprifoliaceae* – zimolezovité. Roste hojně v mírném pásmu jako bez planý a není prakticky vůbec náročný na pěstování. Rod *Sambus* představuje kolem 40 druhů. V dnešní době se pěstitelské výzkumy zajímají o šlechtěné druhy, které produkují ve velké míře sloučeniny ceněné v potravinářském průmyslu. V malých výměřích se pěstují odrůdy Bohatka, Dana a Sambo na Slovensku. Odrůdy Haschberg a Donau zase v Rakousku. Mezi významné pěstitelé patří také státy Dánsko nebo Maďarsko. Na území České republiky se šlechtěný černý bez pěstuje velmi krátce.

Vinná réva (*Vitis vinifera* L.) je další rostlinou, kterou lidé po staletí využívají. Plody vinné révy jsou velmi žádané na výrobu vína, případně vinného moštu. Hrozny pro svůj obsah vitamínů a další blahodárných sloučenin jako jsou antioxidanty, přispívají k čištění krve a metabolismu. Pravidelné požívání výrobků z plodů vinné révy příznivě ovlivňuje kardiovaskulární systém.

Vinná réva se vyskytuje v mnoha odrůdách. Pěstuje se zejména v mírném a subtropickém pásmu. Jedná se o teplomilnou rostlinu a na kvalitu a výnosnost plodů má největší vliv dostatek slunečního záření. Dnešní doba klade důraz na vysokou kvalitu výroby jakostního vína. Výsadba vinohradů je Evropskou unií omezena, tudíž kvalita plodů hraje nejdůležitější roli.

Modré odrůdy vinné révy a černý bez obsahují důležité polyfenolické sloučeniny, anthokyanová barviva, které se řadí mezi flavonoidní látky. Anthokyany se chovají jako antioxidanty a proto přispívají k prevenci nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. Dále se vyznačují antimikrobiálními a protizánětlivými účinky. Jsou jimi obohacovány jídelníčky i potravinové doplňky. V potravinářství se anthokyany používají jako přírodní barvivo pro potraviny a je známé pod kódem E163.

Diplomová práce je dílčí součástí výzkumného úkolu QH92223 – Výzkum odrůd černého bezu pro využití ovocnářské praxe, který řeší Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Ke stanovení anthokyanů byly použity pH-diferenciální metoda stanovení celkového obsahu anthokyanů a vysokoúčinná kapalinná chromatografie s detekcí diodovým polem. Anthokyanové pigmenty byly stanovovány v reálných vzorcích různých odrůd černého bezu a modrých kultivarů vinné révy.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Černý bez (*Sambucus nigra* L.)

Černý bez (*Sambucus nigra* L.) je velmi známý a nenáročný keř rostoucí v pásu mírném i subtropickém. V Evropě je známo přes 20 druhů černého bezu. Jedná se o 2 - 4 metry vysoký opadavý keř z čeledi zimolezovitých (*Caprifoliaceae*). Listy jsou řapíkaté, lichozpeřené, s 5 až 9 lístky, dlouhé až 15 cm, zejména na rubu chlupaté. Po rozemnutí mírně páchnoucí. Květy jsou uspořádány v hustých, vrcholových, plochých chocholících o průměru 10 až 25 cm. Jsou oboupohlavé, mohou být bílé až nažloutlé a mají příjemnou vůni. Plody narůstají do velikosti 5 až 8 mm v podobě černé bobule, tzv. bezinka. Jsou řazeny mezi kulaté peckovice obsahující 2 až 3 semínka. Černý bez kvete v červnu až červenci. Plody dozrávají od července do září. Při pěstování v našich polohách se černému bezu nejvíce daří na vlhkých humózních půdách s vyšším obsahem dusíku, tedy na okrajích lesů, pasek, lidských obydlí a zahradách. Roste na slunci i ve stínu. Černý bez se také vysazuje na smetištích, protože významně ovlivňuje rozklad organické hmoty a zlepšuje kvalitu půdy. [1, 2]

Dalšími druhy černého bezu jsou například bez hroznatý (*Sambucus racemosa* L.), který byl původně rozšířen ve střední Evropě. Odolává velmi nízkým teplotám a jeho rumělkově červené plody dozrávají již během června a července. Tento druh mívá nejchutnější plody a bývá často šlechtěn. Bez kanadský, latinsky *Sambucus canadensis*, je často pěstován v severní Americe a je velmi mrazuvzdorný. Plody tohoto bezu mají purpurově červenou barvu a dozrávají v září. V minulosti se z něj vyrábělo i víno. Bez modrý (*Sambucus caerulea* L.) opět pochází ze severní Ameriky. Plody mají modré zbarvení a v Americe se z nich vyrábí marmeláda. Vlastnosti a nároky na pěstování má obdobné jako druh *Sambucus canadensis* až na modročernou barvu plodu. *Sambucus mexicana* pocházející z jižní Ameriky se vyrovnává chutí ostružinám. Bez pýřitý (*Sambucus pubens* L.) pochází z vlhkých lesů severní Ameriky. Jeho plody mají šarlatově červenou barvu, a pokud jde o nároky na pěstování, není o moc náročnější než předchozí uvedené druhy bezu. [1, 2, 3]



Obr. 1, 2: Černý bez – květy, plody. [4, 5]

### 2.1.1 Chemické složení černého bezu

Květy bezu obsahují v malém množství silice, z flavonoidů rutin, astragalin a kvercetin, třísloviny, aminy, sacharidy, organické kyseliny, fenolové látky, rozpadové produkty glykosidu sambunigrinu, sliz a minerální látky. [2, 6]

Plody černého bezu a produkty z něj vyrobené jsou velmi důležité pro kvalitní lidskou výživu. Jsou zdrojem nepostradatelných látek pro lidské tělo. Jejich biologická hodnota je dána vysokým obsahem vitaminů (A, B, C), minerálů, pektinů, barviv, celulózových vláken, cukrů, organických kyselin, karotenoidů a tříslovin. Obsah vitaminu C je srovnatelný se šípky a černým rybízem. Celkově mají plody nízkou energetickou hodnotu. [7, 8]

Obsah celulózy je velmi důležitý při snižování rizika vzniku diabetes typu II a srdečních onemocnění. Pomáhá při snižování vysoké hladiny cholesterolu a obezité. Celulóza je zastoupena ve vláknině a tudíž pozitivně ovlivňuje trávicí trakt. Snižuje kontakt mezi potenciálně škodlivými látkami a gastrointestinálním ústrojím. [7, 8]

Díky vysokému obsahu vitaminu C a anthokyanů má černý bez antioxidační a protinádorové účinky. [7, 8]

Tab. 1: Vybrané látky nacházející se v plodech černého bezu [7]

Obsahové látky v bezových plodech	obsah
Veškeré cukry (%)	8,88
Redukující cukry (%)	8,55
Sacharóza (%)	0,33
Pektiny (%)	0,16
Celulóza (%)	1,65
Kyselina citrónová (celková kyselost - %)	1,30
Popel (%)	0,92
Anthokyaniny ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	863,89
Polymerizovaná barviva (%)	0,03
Vitamin C ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	34,10

Minerální látky jsou v bezinkách obsaženy ve formě organické soli, anorganické kyseliny, nebo jako komplex organických solí. Jsou rozpuštěné v buněčných šťávách. [8]

Tab. 2: Obsah nejvýznamnějších minerálních látek v černém bezu [7]

Minerální zastoupení	Obsah ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )
K	391,33
P	54,00
Ca	28,06
Na	2,17
Mg	25,99
Fe	1,86
Zn	0,36
Mn	0,27
Cu	0,14

Bezinky obsahují celkem vysoké množství proteinů a aminokyselin. Obsah proteinů se pohybuje kolem 2,84 g ve 100 ml šťávy. Z aminokyselin jsou obsaženy jak esenciální, tak i neesenciální kyseliny: lysin, alanin, threonin, glycin, valin, serin, prolin, izoleucin, leucin, metionin, histidin, fenylalanin, glutamin, asparagin, cystin, tyrozin. Plody černého bezu neobsahují acetylované anthokyanidiny, což je pro ně charakteristické. Nalezené anthokyanidiny jsou pouze deriváty kyanidinu. Žádné jiné nebyly identifikovány. Jsou jimi: kyanidin-3-sambubiosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid. [8]

Listy obsahují sambunigrin, rutin, kvercetin, vitamin C, alkaloid samicin, třísloviny, pryskyřice, cukry, dusičnan draselný.

Kůra obsahuje také třísloviny a pryskyřici, dále žlutý éterický olej, cholin, fytosterin, kyselinu valerovou a alkaloid sambucin.

Pro lidské použití se sbírají květy nebo plody. I přes detekovatelnou toxicitu se využívají také listy. V přiměřených koncentracích nacházejí uplatnění při léčení revmatismu a kožních chorob. Pokud by byla lidskému organismu podána vyšší dávka listů, či kůry, projevíly by se neblahé důsledky v podobě silného zvracení, průjmů a celkové slabosti.

Velmi cenný přínos pro zdraví nabízí květy černého bezu. Jsou močopudné, snižují horečku a působí blahodárně na cévní stěny. Květy se nejčastěji zpracovávají na sirup společně s cukrem a kyselinou citrónovou.

Plody bezu mají analgetické účinky, podávají se zejména při migrénách, bolestech trojklanného nervu, páteře či kloubů. Dále pomáhají při křečích trávicího ústrojí a při nadýmání. [6, 7, 8]

### 2.1.2 Využití černého bezu v potravinářském průmyslu

Černý bez má širokou paletu využití. Uplatnění nachází při výrobě bezinkové šťávy, vína nebo likérů. Plody černého bezu je nutné krátce povařit, neboť jsou v syrovém stavu mírně jedovaté kvůli obsahu sambunigrinu. Tato látka se však zahřátím rozkládá [9]



Obr. 3: Bezový sirup. [10]

Z plodů bezinek je také možné připravovat zavařeniny, marmelády nebo povidla. Sušené květy černého bezu se tradičně používají na přípravu léčivých čajů. [9]



*Obr. 4: Květy černého bezu určené k přípravě čaje. [11]*

V současné době se plody bezu zpracovávají převážně na bezový koncentrát, z něhož se získává cenné přírodní potravinářské barvivo. V minulosti se využívalo též na obarvení látek. Bezinky se také přidávají jako ovocná složka do jogurtů, s označením lesní směs.



*Obr. 5: Využití plodů černého bezu jako ovocné složky do jogurtů. [12]*

V moderní medicíně jsou prováděny výzkumy, které dokazují, že černý bez má protirakovinné účinky. Ve studiích byly prokázány inhibiční účinky na enzymy, které podporují karcinogenezi. [6, 13]

### **2.1.3 Odrůdy černého bezu [14]**

Černý bez má čím dál větší využití v potravinářském průmyslu jako barvivo a ve farmacii jako léčivo. Proto byl kladen důraz na jeho kvalitu. Po staletí byly užívány pouze divoké druhy černého bezu. Na počátku 20. století se využití bezu natolik rozmohlo, že bylo potřeba zvýšit nejen výnos plodiny, ale i eliminovat obsah toxického heteroglykosidu sambunigrinu. Byly proto vyšlechtěny kulturní odrůdy s příznivějšími vlastnostmi. Rozdílly ve vlastnostech spočívaly v růstu dřevin, vysoké plodnosti, velikosti a množství plodenství, stejnosměrnosti v dozrávání plodů, mechanicko-fyzikálně a chuťově sensorických vlastnostech plodů, chemických vlastnostech bezu a třeba v intervalu dozrávání jednotlivých plodenství. Oproti

planému bezu obsahují kulturní odrůdy desetinou sambunigrinu. Z ekonomického hlediska poskytují kulturní odrůdy mnohem vyšší výnosy než bez planý.

První šlechtění černého bezu se odehrávalo v Americe kolem roku 1890, ve státě Minnesota. Další pokusy o šlechtění probíhaly od roku 1926 v New Yorku, Kanadě. Nakonec se šlechtění černého bezu ujalo i v Evropě a to zejména na území Německa a Dánska. Z Německa je známa odrůda Mamuth, z Rakouska Haschberg. Nejvíce šlechtěných odrůd v Evropě pochází z Dánska. Jsou jimi Kørsor, Allesö. Pro výrobu šťáv jsou to Samyl, Samidan, Sampo a Samdal. Jelikož na území České republiky nebyl žádný černý bez šlechtěn, je důležitý, pro pěstování na našem území, správný výběr odrůdy. Kritéria pro výběr jsou hlavně hospodářské znaky udávající výnosnost a pěstitelské nároky. V současnosti jsou v ČR pokusně vysazovány bezové sady odrůd vyšlechtěných v zahraničí.

## 2.2 Vinná réva (*Vitis vinifera* L.)

V období přirozeného vývoje podléhaly révovité rostliny přírodnímu výběru jedinců na četných stanovištích. Postupně se vytvořilo několik druhů rodu *Vitis*, adaptovaných k určitým klimatickým podmínkám. Některé základní vlastnosti mají však společné. Rod *Vitis* se dělí na dva podrody, a to na *Muscandinia* a *Euvitis*. *Muscandinia* má jen dva druhy a od podrodu *Euvitis* se liší tím, že v jednoletých vyzrálých výhonech je dřevový válec nepřerušovaný přepážkami a dále tím, že má vyšší počet chromozomů. Jeho druh *Vitis rotundifolia* pochází z jihovýchodní části USA a je velmi odolný vůči révokazu a houbovým chorobám. Při křížení s evropskými odrůdami zatím nemá přílišné využití, neboť vzniklé potomstvo je neplodné a má vysoké nároky na teplo. Druhý podrod *Euvitis* představuje základ asi 70 druhů. Původ druhů podrodu *Euvitis* pochází ze tří kontinentů. Největší počet pochází ze Severní Ameriky, dále z Asie a pouze jediný druh z Evropy. V Americe nalezneme podrody *V. rupestris*, *V. riparia* nebo *V. berlandieri*, které jsou velmi odolné vůči chorobám a převážně se pěstují na ovoce, šťávy a stolní vína. Evropská réva je též ušlechtilá (*Vitis vinifera* L.) a dělí se na dva poddruhy, *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* a *Vitis vinifera* ssp. *sativa*. První poddruh je předchůdce dnešních odrůd volně rostoucích v lesích. Poddruh *sativa* představuje velké množství kultivarů evropské révy.

Nejstarší skupinou odrůd evropské révy je černomořská réva (*Proles pontica* Negr.). Její dvě podskupiny jsou balkánská, vyznačující se vysokou plodností a gruzínská, pocházející z Kavkazu, která se vyznačuje vysokou odolností k mrazům. Kolonizací Řeků a Římanů se tyto dvě nejstarší podskupiny dostávaly podél břehů Středozemního moře dále na západ. Nakonec byly římskými legiemi zavlčeny do severnější části Evropy. Odrůdy byly vysazeny v povodí řek Rýna, Dunaje a Liory, kde se zkřížily s volně rostoucí lesní révou. Tito kříženci byly odolnější v podmínkách severnější Evropy a daly základ rozvoji vinařství u nás. Největší rozmach vinařství probíhal ve Francii, kde vznikaly oblasti do dnes velmi známé a pro svou kvalitu neocenitelné. Lidé v těchto oblastech dali spíše na kvalitu hroznů pro výrobu vína než na konzum. Proto zde vznikaly nové a nové odrůdy moštového typu, které se zařazují do skupiny západoevropských odrůd. Mezi ně patří Ryzlink rýnský, Burgundské, Sauvignon, Tramín, Cabernet, Merlot a další. Malá a střední Asie má také evropské odrůdy, které mají jiné vlastnosti. Jedná se o skupinu orientálních odrůd (*Proles orientalis* Negr.), obsahujících podskupinu kaspickou a maloasijskou. I v současnosti se provádí další křížení a genetické úpravy nových odrůd. Moderní doba umožňuje získat odrůdy požadovaných vlastností i kvality. [15, 16]

Vinná réva je jednodomá dřevitá liána s úponkami a může být 2 až 30 metrů dlouhá. Její listy jsou řapíkaté a 3 – 5 laločné, na rubu pýřité, můžou být vločkovatě chlupaté. Koncové laloky bývají krátce zašpičatělé až tupé. Květy narůstají v latě a to pětičetné, v horní části srostlé. Réva kvete v rozmezí května až června. Květy mají žlutozelenou barvu a brzo opadávají. Plody, hrozny, jsou kulovitého nebo oválného tvaru s různou velikostí v závislosti na odrůdě. Mohou mít v průměru 12 – 20 cm. Hrozny se skládají z bobulí, mohou být oválného či kulatého tvaru. Bobule obsahuje slupku a uvnitř dužinu. Zbarvení plodů je také různorodé, od zelené barvy až po tmavě fialovou podle odrůdy.

Růst révy je závislý na několika faktorech. Hlavními z nich jsou přísun vody a intenzita světla. V poměrně slabých a dlouhých kořenech, kmenech a větvích se nachází vysoký vztlak. Buněčná šťáva má vysoký osmotický tlak a energetická transpirace listové plochy vytváří mohutný transpirační proud. Při růstu mladých rostlin révy vinné podporuje nižší intenzita osvětlení prodlužovací růst a rostlina hledá vhodnou oporu. Při vysoké intenzitě světla rostou veliké a silné listy s vyšší fotosyntetickou aktivitou.

Vinná réva má několik životních dějů. Její vegetační cyklus se dělí na tři období. Růst, vyzrávání a klid. Každé období se dále rozděluje na fenofáze. Při růstu jsou to slzení, rašení, prodlužovací růst, kvetení a růst bobulí. Fenofáze vyzrávání jsou zrání hroznů a dřeva letorostů a přirozený odpad listů. Poslední fenofáze je klid, dělí se na počátek dormance zimních oček, výstup z dormance a vynucený klid. Každá fáze životního děje vinné révy je závislá na podmínkách klimatu, zvláště pak v období kvetení a vyzrávání hroznů. Při ideálních podmínkách jsou vynikající sklizně a vznikají kvalitní ročníky. [15]

Pěstování vinné révy je v celku nenáročné. Vyhovuje jí mírné až subtropické pásmo s určitou vlhkostí, která by neměla být až příliš vysoká kvůli plísňovým onemocněním. Je to přizpůsobivá rostlina, která je schopná růst v různých typech půd, jako je hlína, šterk, vápenec, břidlice. Tyto půdy se většinou nehodí k pěstování jiných zemědělských plodin. Vinná réva vyžaduje dobré provzdušnění a obsah minerálních látek. Nejdůležitějšími minerály jsou železo, hořčík, vápník, draslík a dusík. Železo je základní prvek pro proces fotosyntézy. Hořčík je nedílnou součástí chlorofylu. Vápník napomáhá k neutralizaci pH půdy. V následujícím roce zajišťuje draslík správný metabolismus v révě i plodinách. Nakonec dusík nacházející se v půdě ve formě dusičnanů podporuje a zlepšuje, společně s fosforečnany, vývoj kořenů. Právě v závislosti na půdě, ve které roste, může stejná odrůda vykazovat různé vlastnosti. Různorodá skladba půdy je charakteristická pro určitou lokalitu. Například ve Španělsku se nachází půda Albariza, složená z rozsivky. Aluviální půda je velmi úrodná, pochází z řek a skládá se z bahna, šterku a písku. Půda obohacená o hořčík, vápník a železo se nazývá čedič (sopečná hornina), v němž se nachází bohužel až nulové množství draslíku. Boubènes, půda nacházející se v Bordeaux ve Francii, je snadno stlačitelná a jemně kyselá. V České republice je významnou oblastí jižní Morava, kde se nachází vápenaté půdy. Obsahují vysoké množství vápníku a uhličitanu hořečnatého. Jiný typ půdy lze nalézt v Jižní Africe, Německu a Novém Zélandu, skládající se ze sedimentu ložisek živce z řek. Hrozny mají jinou plodnost, obsah kyselin a aromatických látek. Velmi důležitým faktorem je již zmiňovaný kořenový systém. Pro révu je ideální přítomnost spodní vody, do níž směřuje své kořeny. Oblasti vysázené vinnou révou jsou obecně sušší a mají vynikající přístup pro sluneční záření. [17, 18, 19]



Obr. 6, 7: Vinná réva – plody, květ [20, 21]

### 2.2.1 Odrůdy vinné révy

Jako každá vinařská oblast, tak i jižní Morava produkuje charakteristické odrůdy vína. Většinou zde mají úspěch vína bílá, jako je Ryzlink vlašský, či Pálava. Ovšem jednu čtvrtinu výsadby tvoří modré odrůdy. Nejčastějšími, které lze na tomto území objevit, je Svatovavřínecké, populární Modrý Portugal, Rulandské modré, Frankovku, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe. V posledních letech se vrací trend výroby červených vín z takzvaných „barvířek“ a to odrůd Neronet, Dornfelder, Merlot, Alibernet a další. V minulosti se sadily do řádku k ostatním modrým odrůdám a při následném sběru a výrobě vína, dodávaly výraznější červený odstín.

Rakouská odrůda Zweigeltrebe byla vyšlechtěna Dr. Zweigelttem v roce 1922 a zapsána do Státní odrůdové knihy v ČR v roce 1980. Největší rozmach její výsadby nastal po 2. světové válce a v současnosti je to nejvíce kultivovaná modrá odrůda na území Rakouska. Zweigeltrebe byl vyšlechtěn z odrůd Svatovavříneckého a Frankovky. Díky tomuto křížení má vyšší odolnost vůči šedé plísni a mrazům. Odrůdě se daří spíše v jílovitých půdách a vyžaduje důkladné a pravidelné ořezání. Listy jsou velké a třílaločné, tmavě zelené. Hrozny bývají středně velké s kulatými bobulemi s pevnou slupkou. Vína vyrobená z této odrůdy mají tmavě granátovou barvu s fialovými odlesky. V chuti lze nalézt zejména ovoce a to višně s přiměřenou koncovkou tříslovin a kyselin. Vína jsou zpočátku velmi tvrdá, ovšem po delším zrání poskytují kvalitní ročníky. [15, 17]

Svatovavřínecké, jinak řečeno Saint Laurent, je odrůda odvozena od rodu Pinot a prvotní výskyt je přisuzován Alsasku. Významnou historii tato odrůda zažila v rakouském klášteře Klosterneuburg, kde byla vysazena v pokusných vinicích. Následně nastal rozmach její výsadby a propagace. Pěstována byla i v západní Evropě, ale kvůli tvrdšímu charakteru vzniklého vína, se dnes pěstuje u nás, v Německu a Rakousku. V ČR je to nejpěstovanější modrá odrůda. Svatovavřínecké má středně velké tmavě zelené listy s pětiúhelníky. Hrozen není jinak velký, ale zato velmi hustý. Přílišná hustota bobulí na hroznu může způsobovat vytlačování a infekci šedou plísní, nebo nedozrání utlačovaných bobulí a tím i zvýšený obsah kyselin. Svědčí jí lehčí šterkovité půdy. Navzdory tvrdosti vzniklého vína způsobenou tříslovinami, kyselinami a barvivou, je víno v našich oblastech oblíbené. Vína jsou krásných tmavě červených odstínů zralých třešní. V chuti vyniká jak třešeň, tak černý rybíz. Mladé víno je velice tvrdé s vysokým obsahem kyselin, proto je vhodné k delšímu zrání. [15, 17, 22]

Modrý Portugal pochází ze slunného Portugalska a v 18. století byl pomalu vysazován i ve střední Evropě, kde získal velkou oblíbenost. Nyní se pěstuje v Rakousku, Česku, Maďarsku, Francii. Listy má středně velké a světle zelené, které na podzim červenají na listové čepeli. Hrozny bývají velké a husté, bobule jsou střední velikosti s tenkou slupkou. Jelikož pochází z teplejších krajín, nesvědčí mu mrazy a také houbové choroby. Zato není náročný na půdu. Roste jak v hlinitých, tak v písčítých zeminách. Vzniklé víno má nižší barevnou intenzitu a svěží květinovou chuť i vůni. Tato vína se pijí povětšinou mladá, například Svatomartinská, nebo se používají na výrobu klaretů. [15, 22]

Frankovka je odrůda vznikající na dolním úseku řeky Dunaje kolem 18. století v Rakousku. Říká se jí též modrá Frankovka, díky plně modrým bobulím na hroznu. Této odrůdě se daří v teplejším prostředí bez silného větru. Vyžaduje spíše úrodnější hlinité půdy, v nichž poskytuje vysoké výnosy. Je odolná vůči chorobám, zejména proti houbovým onemocněním. Listy jsou velké a téměř nedělené. Šťápe rostou rozvětvené, středně husté. Vína vyráběná z této odrůdy se pyšní velmi tmavou barvou. Jako mladá vína jsou řízná, neboť obsahují zdůrazněné kyseliny a třísloviny. Chuť a vůně připomíná ostružiny, švestky, třešně, rybíz, ale zasahují i do rostlinných vůní. [15, 23]

Pinot Noir, u nás nazývaný Rulandské modré, je odrůda pocházející z Francie z oblasti Burgundsko. Je velice náročná na podmínky pěstování. Daří se jí na teplejších hlinitých půdách. Hrozny jsou bohužel velmi náchylné k hnití a tudíž náročné na ošetřování. List této révy je tmavě zelený, třílaločný. Produkuje malé hrozny s malými bobulemi s tenkou slupkou. Tato odrůda obsahuje také méně barviv. Ovšem vína této odrůdy jsou velice oblíbená a vyhledávaná. Vína jsou jemná, sametová a kořeněná. Chutnají po sladkých třešních či švestkách. Obsahují také méně kyselin a tříslovin. Často je tato Rulanda použita na výrobu šumivých vín. [15, 24]

Také Cabernet Sauvignon pochází z Francie a to křížením Cabernet Franc a Sauvignon Blanc ze 17. století. Nyní je hlavní odrůdou slavné francouzské vinařské oblasti Bordeaux. Zde se vína vyrábějí nejen z této odrůdy, ale většinou se podílí také Merlot a Cabernet Franc. Listy má středně velké, pětilaločné. Hrozny dorůstají také střední velikosti s různou hustotou, dle opylení květů. Na půdu není jinak náročný, až na přílišnou vlhkost a zimu. Hrozny nejsou ani příliš náchylné k houbovým nemocím. Cabernet Sauvignon poskytuje výborná vína. Jsou plná, extraktivní s vyšším obsahem tříslovin a kyselin, proto se nechává víno déle vyzrát. Jako zajímavost je možné získat toto víno jako barrique, což znamená, že víno zraje v nových dubových sudech. [15, 25]

Alibernet je vcelku mladá odrůda vypěstovaná na maďarském území. Vznikla křížením Alicante Bouschet a Cabernet Sauvignon. Alibernet byl značně vysazen na území Slovenska v teplejších oblastech. Listy jsou středně velké, pětilaločné, sytě zelené, ale na podzim se barví do červena. Hrozen narůstá velký a řídký. Bobule mají střední velikost a černočervenou barvu, velmi zbarvená je i dužina uvnitř. Proti houbovým onemocněním mají jistou odolnost. Vína z Alibernetu vynikají tmavě rubínovou barvou a výrazným kabernetovým aroma. V chuti a vůni lze najít černý rybíz a lesní plody. Obsahuje vyšší kyseliny i třísloviny, ovšem jeho zrání se dosáhne sametové chuti. Kvůli jeho silné barvě je často využíván do směsí s nižší intenzitou barvy. [17, 26]

Neronet je odrůda vypěstovaná profesorem Vilémem Krausem na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Lednici. Daří se jí spíše v úrodnějších hlinitopísčítých půdách. Listy jsou středně velké a tmavě zelené. V období podzimu se listy barví tmavě červeně. Hrozny narůstají velké a větvené, i když chuději porostlé bobulemi tmavé barvy. Je středně odolná



vůči mrazům a houbovým chorobám. Díky silné sluce je odolná vůči hnití. Barviva obsahuje jak slupka, tak i vnitřek bobule ve vysokých koncentracích. Jedná se tedy o barvířku. Používá se jak ve směsích červených vín, kde vylepšují zbarvení, tak k výrobě odrůdových vín. Koncentrace barviv je zde nestálá a často se vysráží. Přesto je víno plné a intenzivní. [31, 38]

Zajímavou, i když u nás nepříliš známou odrůdou, je Baco Noir, neboli lidově „Bago“. Tato odrůda vznikla ve Francii křížením *Folle blanche* a *Vitis riparia*. Její šlechtitel byl Francios Baco, po němž dostala své jméno. Baco Noir se hojně pěstovalo na území Evropy, ale po roce 1951 byla omezena výsadba hybridních odrůd. Odrůda byla přenesena přes oceán do Severní Ameriky, kde se ve velkém pěstuje dodnes. Baco Noir není náročný na typ půdy, daří se mu i v sušších a vápenitých půdách. Netrpí na houbové choroby, pouze při nepříznivém počasí může dojít k popraskání slupky hroznu a jeho hnití. Listy bývají větší a sytě zelené. Hrozen je menší a hustý. Bobule jsou malé, kulaté tmavomodré barvy. Obsahuje velké množství barviv jak ve slupce, tak v dužině. Víno z této odrůdy se vyznačuje horší kvalitou, tmavě rubínové barvy a kořenité chuti s výraznou kyselinou. Nejčastěji se používá ke scelování červených vín s nižší barevnou intenzitou. [27, 28]

### 2.2.2 Chemické složení bobule vinné révy

Bobule jsou spojeny třapinami (stopkami) do hroznu. Základními částmi bobulí jsou slupka, dužina a semena. Slupka se skládá z několika vrstev tlustých buněk tvořící zdivo bobule. Nejdůležitější vrstvou je epidermis, která dodává bobuli voděodolnost. Hlavními komponenty slupky jsou barviva, třísloviny, aromatické látky, draslík a další minerály. Pod slupkou se nachází největší část bobule, tedy dužina. Obsahuje až 80 % vody, cukry, organické kyseliny, fenolické sloučeniny, dusíkaté sloučeniny, aromatické látky a pektiny. Jako u ostatních druhů bobulovitého ovoce tak i u vinných hroznů se složení látek mění s růstem a zráním. Při dozrávání se v dužině bobule akumulují sacharidy a ubývají organické kyseliny. Rozvíjí se struktura barviv a mění se rozpustnost pektinu. V bobuli je možné z cukrů nalézt zejména glukózu a fruktózu. V nezralých bobulích převládá glukóza, postupem procesu zrání se přetváří ve fruktózu. Fruktóza se liší sladivostí, je sladší než sacharóza a ta je sladší nežli glukóza. Proto je obsah fruktózy závislý na délce zrání hroznů. Důležitou složkou dužiny jsou také organické kyseliny, dodávají vínu plnost, ovlivňují jeho stabilitu, barvu a pH. Nejvyšší podíl, asi 90 % kyselin, tvoří kyselina vinná, jablečná a v menším množství kyselina citrónová. Zbytek tvoří mnoho dalších kyselin i aminokyselin. Kyselina vinná je v ovoci málo přítomná a ve víně je přítomna buď volná nebo ve formě hydrogenvinanu draselného. [17]

Fenolické sloučeniny obsažené v bobulích hroznů mají různorodou podobu i obsah. Mají důležitou roli při určování chuti a vůně vína. Jsou zapojeny do procesu hnědnutí hroznů a vína a také při stárnutí vína. Fenolické látky obsahují zejména semena bobulí, slupky bobulí a přecházejí do vín v průběhu macerace hroznů. V závislosti na délce kontaktu šťávy hroznů se semeny a slupkami, se fenolické látky přenášejí do moštu a dále do vína. Mezi hlavní představitele fenolické skupiny jsou anthokyany a třísloviny. Anthokyany jsou pigmenty udávající barvu hroznů a vína. Evropské odrůdy révy vinné obsahují 3-monoglukosidy a jejich množství v hroznech je v různých odrůdách individuální.

V bobulích hroznu modrých odrůd se vyskytuje několik základních anthokyanů. Mezi nejdůležitější patří malvidin-3-glukosid, delphinin-3-glukosid, kyanidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid.

U mladých vín jsou pigmenty stejné jako v hroznech extrahované při fermentaci. V průběhu zrání vína dochází k významným změnám. Ubývají původní pigmenty a vznikají tmavší a stabilnější červené pigmenty. Tyto pigmenty jsou méně náchylné na změnu pH prostředí i na odbarvení  $\text{SO}_2$ . Z tohoto důvodu jsou vyzrálší vína tmavší než mladá. Vznik tmavších pigmentů se připisuje reakcím enzymatického hnědnutí. Jedná se buď o interakci anthokyanů s prokyanidiny nazývanou kopigmentací, nebo o transformaci anthokyanu s reaktivními karbonylovými sloučeninami (acetaldehyd). Jde o cykloadiční reakce probíhající mezi anthokyanu a flavanoly. Vzniklé pigmenty obsahují ve své molekule další pyranový kruh. Nakonec mohou vznikat vysokomolekulární hnědočervené nerozpustné kondenzační produkty, flobafeny. Pro jejich vznik jsou typické reakce anthokyanů s 4-vinylfenolem, kyselinou pyrohroznovou nebo s vinylflavanoly. Na vzniku těchto produktů se zřejmě podílí i další složky ve víně, jako jsou proteiny, redukující cukry, či ionty kovů.

Třísloviny jsou složitější sloučeniny s velkou molekulovou hmotností. Mohou nabývat žluté, hnědé nebo červené barvy. Mají trpkou a hořkou příchuť. Při jejich zpracování a stárnutí polymerují na taniny (flavan-3-ol). Tato polymerizace vede ke zvětšení molekuly a ke zmírnění jejich trpkosti. Tyto molekuly jsou nerozpustné a hromadí se ve sraženinách. [29, 30]

Bobule hroznů obsahují také různé dusíkaté sloučeniny, jako jsou amonné kationty, aminokyseliny, peptidy a proteiny. Obsah dusíkatých látek se liší dle odrůdy, podnebím, typu půdy nebo hnojením. Dusíkaté látky jsou důležité jako zdroj živin pro kvasinky a bakterie mléčného kvašení. Mají tedy vliv na průběh fermentace, při níž vznikají sensoricky aktivní látky. Proteiny jsou zodpovědné za stabilitu vína. Proto nedostatek dusíku může ovlivnit vznik nežádoucích látek při fermentaci, jako je sirovodík způsobující nežádoucí přípach vína.

Nedílnou součástí bobulí hroznů jsou aromatické látky. Ve víně se nacházejí ve formě mnoha těkavých vonných sloučenin. Aromatické látky pochází ze tří zdrojů: hrozny, kvašení a vyzrávání (stárnutí) vína. Do této významné skupiny patří i chuťové látky. Jsou obsaženy v různých odrůdách, proto odrůdě udělují jistý charakter. Představitelem může být 2-methoxy-3-isobutyl pyrazin, převažující v paprikách a také v odrůdách Cabernet Sauvignon a Sauvignon Blanc. 4-vinylfenol udává chuť a vůni po koření hřebíčku. V odrůdách Muškát a Ryzlink byly nalezeny terpeny. Aromatické látky jsou nezbytné pro dosažení požadované chuti vína. Z tohoto důvodu je opět vhodné pečlivě volit termín sklizně.

Minerály obsažené v bobulích jsou převzaty z půdy. Jsou jimi: draslík, sodík, železo, fosfáty, sulfáty a chloridy. Především draslík má vliv na pH vína tak, že snižuje jeho kyselost a vylučuje se ve formě hydrogenvinanu draselného (vinného kamene). Tento proces je známkou zvyšující se stability vína.

Poslední důležitou látku obsaženou v bobulích hroznů jsou pektiny. Vyskytují se v buněčných stěnách slupek bobulí. Patří mezi komplexní polysacharidy, skládající se z galakturonové kyseliny. Během zrání je pektin hydrolyzován pektolytickými enzymy, jež se přirozeně v bobulích nacházejí. V moštu způsobuje pektin zákal, protože při sobě drží částičky ovocné dřeně v suspenzi. Cílem tohoto procesu je sedimentace nerozpustných látek a následně čírost vznikajícího vína. [31, 32]

Tab. 3: Vybrané látky obsažené v hroznech vinné révy. [33]

Obsahové látky v hroznech	Obsah
Voda (%)	80,50
Tuky (%)	0,58
Proteiny (%)	0,66
Sacharidy (%)	17,70
Celulóza (%)	1,00
Vitamin C (mg)	10,80
Vitamin B1 (mg)	0,09
Vitamin B2 (mg)	0,06
Vitamin B6 (mg)	0,11
Vitamin E (mg)	0,70
Vitamin B3 (mg)	0,30

Tab. 4: Obsah nejvýznamnějších minerálních látek v hroznech révy vinné. [33]

Minerální zastoupení	Obsah (mg·l <sup>-1</sup> )
K	185,00
P	13,00
Ca	11,00
Na	2,00
Mg	3,00
Fe	0,26
Zn	0,05

Pro lidskou výživu se používají plody révy vinné a minimálně listy. Čerstvé plody, tedy hrozny, mohou sloužit jako kvalitní zdroj vitaminů a minerálů. Jsou známy jako dobré detoxikační potraviny. Mohou být součástí doporučené diety a jako očista organismu. Slupky vinných hroznů a jejich jádérka obsahují také důležitý stilben, resveratrol, patřící do fenolické skupiny. Společně s anthokyany snižují riziko vzniku ischemických chorob, rakoviny, cukrovky typu 2 a neurologických onemocnění. Resveratrol je přirozeně se vyskytující komponenta rostlin. Má za úkol rostlinu chránit před škodlivými účinky UV záření, zraněním, nebo plísňovému útoku. Jeho zbrání je vysoká antioxidační aktivita a protizánětlivé účinky. Inhibuje agregaci krevních destiček a je znám pro svou chemoprevenci. Jsou známy spekulace, že může zastavit rakovinové bujení ve všech fázích rozvoje. Další epidemiologické studie prokazují, že při pravidelném užívání vinných preparátů snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. Názorným příkladem je Francie, kde je o 40 % nižší výskyt tohoto onemocnění a to i se známým jídelníčkem, bohatým na nasycené mastné kyseliny. Dále resveratrol a anthokyany pomáhají proti arteroskleróze, proti zánětlivým a ledvinovým onemocněním. Významně napomáhají zlepšit metabolismus glukózy při diabetes typu 2 a ukládání vápníků do kostí. Co se týče onemocnění neurologického, eliminují vznik neurodegradativních onemocnění jako jsou: Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, nebo roztroušená skleróza. [34]

### 2.2.3 Využití hroznů vinné révy v potravinářském průmyslu

Prvořadým využitím plodů vinné révy bylo a je výroba alkoholického nápoje, tedy vína. Tento produkt vzniká anaerobní fermentací vinné šťávy za spoluúčasti kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky využívají glukózu obsaženou ve šťávě na ethanol a CO<sub>2</sub>.



*Obr. 8: Majoritní produkt z plodů vinné révy – víno. [35]*

V dnešní době nachází uplatnění také vinný mošt. Pro svůj vysoký obsah vitaminů, minerálů a fenolických látek, je oblíbeným nealkoholickým nápojem. Na trhu je možné jej nalézt ve formě koncentrátů, 100% šťáv, nebo jako součást ovocných džusů.



*Obr. 9: Vinný mošt. [36]*

Dalším méně známým produktem je olej z hroznových jader. Jádérka jsou odpadním produktem při zpracování vinných hroznů. Technologie výroby zahrnuje čištění jader, jejich vysušení a rozmělnění. Olej vzniká hlavně lisováním, ve výjimečných případech extrakcí jader. Olej lisovaný za studena má v závislosti na odrůdě žlutou a žlutozelenou barvu. Jeho chuť je nasládle trpká a vůně má charakter hroznově oříškový. [37]



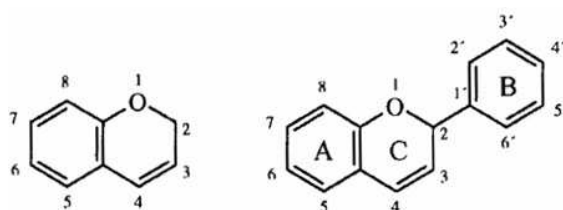
*Obr. 10: Olej z hroznových jadérek. [38]*

### 3 ANTHOKYANOVÁ BARVIVA [29, 39, 40]

Anthokyany, též nazývané anthokyaniny, podléhají rozsáhlé skupině rostlinných fenolů, flavonoidům. Jedná se o velmi rozšířená rostlinná barviva rozpustná ve vodě. Poskytují oranžové, červené, fialové a modré spektrum barev, vhodné pro barvení nejrozličnějších druhů potravin a nápojů. Nyní je identifikováno přes 300 druhů anthokyanů.

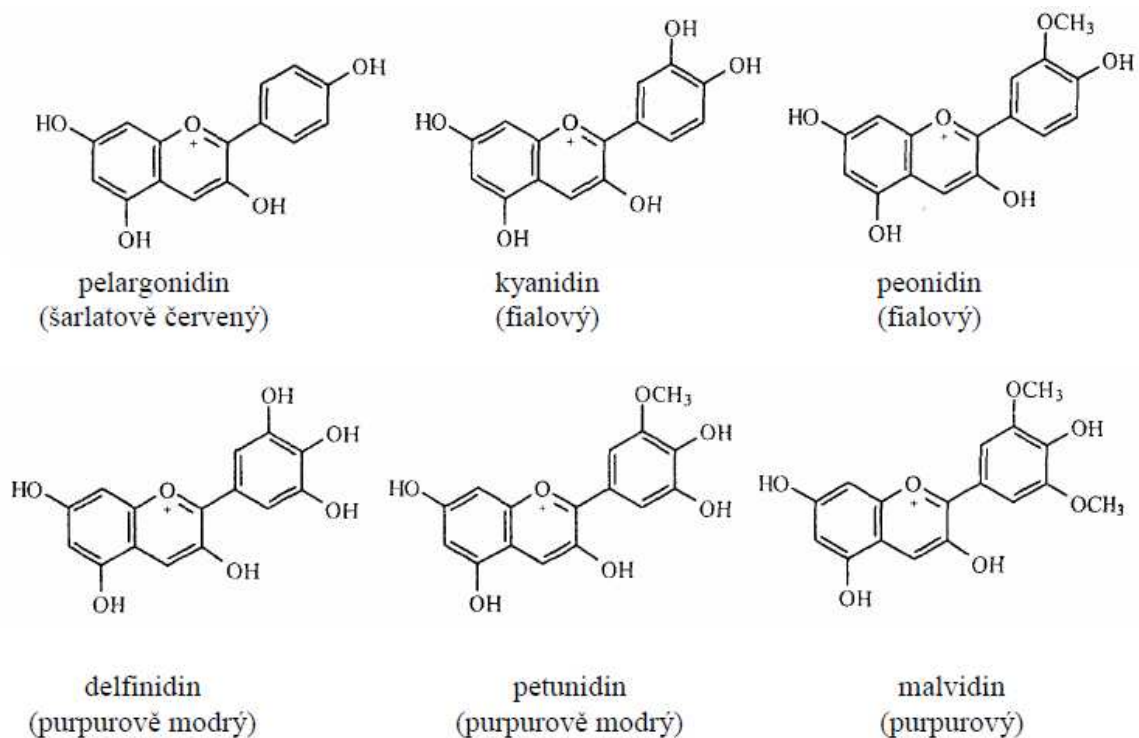
#### 3.1 Struktura

Úplným základem molekuly anthokyanů je kyslíkatý heterocyklický 2H-chromen substituovaný v poloze C-2 fenylovou skupinou, flavanem. Jejich uspořádání je C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Všechny tři kruhy jsou substituovány hydroxyskupinami, nebo methoxyskupinami a druhy se liší stupněm substituce a oxidace.



Obr. 11: 2H-chromen (vlevo), flavan (vpravo). [39]

Anthokyany jsou glukosidy různých aglykonů nazývaných anthokyaniny. Anthokyaniny jsou odvozené od flavyliového kationu (2-fenylbenzylpyryliový, 2-fenolchromeliový kationt). Ze 17 existujících anthokyaninů má v potravinářství význam šest s hydroxylovou skupinou v poloze C-3. Jsou jimi: kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, petunitin a malvidin (dříve oenidin). Volné aglykony anthokyanidiny se v rostlinných pletivech vyskytují jen zřídka (stopové produkty hydrolýzy anthokyanů). Hlavními pigmenty vyskytující se ve všech rostlinách jsou glykosidy a acylované glykosidy anthokyanidinů. V některém ovoci a zelenině jsou pigmenty odvozeny jen od jednoho anthokyanidinu (bezinky, červené zelí – glykosidy kyanidinu). U jiných druhů ovoce a zeleniny jsou složeny z více anthokyanidinů (černý rybíz – kyanidin a delphinidin).

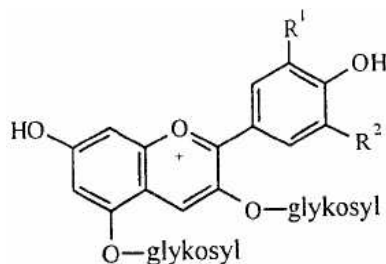


Obr. 12: Přehled základních anthokyanidinů. [39]

Další součástí anthokyanů jsou sacharidy. Nejvýznamnějšími jsou: D-glukóza, L-rhamnóza, D-galaktóza, D-xylóza, L-arabinóza. Sacharidová část je vázána v poloze C-3, je-li na tuto polohu ještě glykosilována další hydroxyskupina, je následně destabilizován anthokyanidinový chromofor. Při hydrolýze cukru vázaného jako O-glukosid na C-3 dochází rychlému rozkladu anthokyanidinu a tedy ke ztrátě zbarvení. Dále a výjimečně se cukry vážou v poloze C-5 a C-7. Podle počtu navázaných molekul cukru se anthokyaniny dělí:

- monosidy (glukóza, galaktóza, rhamnóza v poloze C-3)
- biosidy s disacharidy (rutinóza, sambubióza, soforóza v poloze C-3)
- triosidy s lineárními nebo rozvětvenými trisacharidy v poloze C-3
- 3,5-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-5 a další

Druh sacharidu nemá vliv na chemické vlastnosti molekuly, ale poloha navázaní sacharidu ano. Cukry jsou často acylovány fenolovými kyselinami (kávová, ferulová, sinapová, malonová a octová) a to na hydroxylovou skupinu glukózy v poloze C-6. [9, 10, 11, 13]



Obr. 13: Struktura glykosidické formy. [39]

## 3.2 Vlastnosti a reakce

Hlavním problémem anthokyanů je stabilita jejich barvy, která je velmi nízká. Faktory ovlivňující stabilitu jsou: struktura molekuly, přítomnost enzymů, pH prostředí, teplota, vliv záření, přítomnost kyslíku a kyslíkatých sloučenin. Po reakci s některými těmito faktory dochází ke změně zbarvení anthokyanů, nebo k úplnému odbarvení.

### 3.2.1 pH prostředí a molekulární transformace

Molekulární transformace je závislá na pH vodného prostředí. V této závislosti existuje rovnováha mezi několika strukturami aglykonů: červený flavyliový kationt, bezbarvá karbinolová pseudobáze, purpurově červená neutrální chinoidní báze, modrá chinoidní báze a žlutě zbarvený chalkon. Anthokyanová barviva složená z pelargonidinu, sanidinu, nebo delfininu jsou méně stabilní než anthokyaniny složená z petunidinu nebo malvidinu, neboť mají znepřístupněnou volnou hydroxylovou skupinu na uhlíku C-5, C-7 nebo C-4'.

V rozmezí pH od 0 do 1,0 jsou anthokyaniny jako červený flavyliový kationt. Při zvyšování pH do 4,0 se intenzita červené barvy ztrácí až do bezbarva. Při dalším zvyšování pH se anthokyaniny opět zbarvují a to do purpurově červené díky vznikající chinoidní bázi (pro vznik báze je nutná přítomnost volné hydroxylové skupiny). Při pH 7,5 až 8 se vytváří modrý chinoidní anion. Při dalším zvyšování pH se modré barvení mění na žluté. Po úpravě pH opět na hodnotu 1,0 přechází žlutý chalkon zpět na červený flavyliový kationt.

### 3.2.2 Vliv struktury

Zvláště v kyselém prostředí jsou anthokyaniny závislé na druhu a počtu substituovaných skupin aglykonu. Anthokyanidiny s více substituovanými hydroxyskupinami jsou spíše modrého zbarvení, kdežto anthokyanidiny s více methoxy skupinami jsou červeného odstínu. Glykosidy a od nich odvozené acylderiváty jsou obecně modré barvy. Deriváty s větším počtem hydroxylových skupin jsou stabilnější než deriváty s více methoxyskupinami. Glykosidy jsou stabilnější než jejich aglykony, dále monoglykosidy jsou méně stabilní než diglykosidy při skladování, tepelném působení nebo světelném záření. Další vliv na stabilitu má také druh navázaného cukru. Anthokyaniny dále stabilizuje intarmolekulární kopigmentace, což je přítomnost jedné nebo více acylových skupin v molekule. Pigmenty jsou následně méně citlivé na změnu pH prostředí.



### 3.2.3 Vliv teploty

Stabilita anthokyanů i rychlost jejich tepelná degradace je závislá na pH prostředí, množství kyslíku v reakci, jejich strukturu. 3-glykosidy anthokyanidinů jsou v přítomnosti kyslíku a pH 1,8-2,0 maximálně tepelně stabilní. 3,5-diglykosidy při pH 4,0-5,0. Zajímavé je, že anthokyaniny jsou stabilnější při vyšších teplotách používaných při zpracování ovoce a zeleniny. Jedná se o ochranný efekt některých složek v systému a kondenzační monomerů. Vznikají stabilnější oligomerní pigmenty. Jsou důležité pro barvu ovocných šťáv a červených vín.

### 3.2.4 Kyslík a kyselina askorbová

Anthokyaniny jsou přímo oxidovány vzdušným kyslíkem na hnědé nebo bezbarvé sloučeniny. Dále mohou být oxidovány prostřednictvím jiných labilních sloučenin, kyselinou askorbovou. Oxidace kyselinou askorbovou probíhá nepřímou a to působením peroxidu vodíku, který vzniká její oxidací. Peroxid vodíku atakuje pyrylový kruh v poloze C-2.

### 3.2.5 Světlo (záření)

Působení viditelného, ultrafialového a ionizujícího záření má degradační účinky na anthokyaniny. Hlavním efektem rozkladu je fotooxidace. Anthokyaniny substituované v poloze C-5 hydroxylovou skupinou jsou více nestabilní vůči záření. Nesubstituované nebo monosubstituované anthokyaniny jsou citlivé na nukleofilní rozklad v poloze C-2 a C-4.

### 3.2.6 Cukry a jejich degradační produkty

Cukry ve vysoké koncentraci chrání stabilitu anthokyanů. Výsledným efektem je snížení vodní aktivity. Rozklad flavyliového kationtu má za následek tvorbu bezbarvé karbinolové báze a to následkem působení degradačních produktů cukrů. Tyto produkty jsou odvozeny od furfuralu (derivát aldopentózy) a hydrxylmethylfurfural (derivát ketohexózy). Výsledkem degradačních účinků těchto produktů jsou miliardové reakce nebo oxidace kyselinou askorbovou. Kondenzační produkty se sloučeninami anthokyanů jsou hnědě zbarvené výsledné produkty. Přesný mechanismus reakce není znám a je velmi závislý na teplotě.

### 3.2.7 Kovy

Komplexy kovů společně s anthokyaniny zabezpečují barevné spektrum u rostlin. Kovy (zejména Sn) používané k potahu kovových obalů mají negativní vliv na zbarvení ovoce a zeleniny při sterilizaci. Jiné kovy naopak zvyšují stabilitu anthokyanů. Jsou jimi například Ca, Al a Fe.

### 3.2.8 SO<sub>2</sub>

Oxid siřičitý je v potravinářství používán jako konzervant. Uplatnění nachází při konzervaci vína, či sušeného ovoce. SO<sub>2</sub> chrání potraviny před mikrobiálním napadením. SO<sub>2</sub> tvoří s anthokyaniny stabilní bezbarvé sloučeniny. Při následném okyselení a působení vyšší teplotou se komplex SO<sub>2</sub> a anthokyanu rozruší a anthokyaniny získají svou původní barvu.

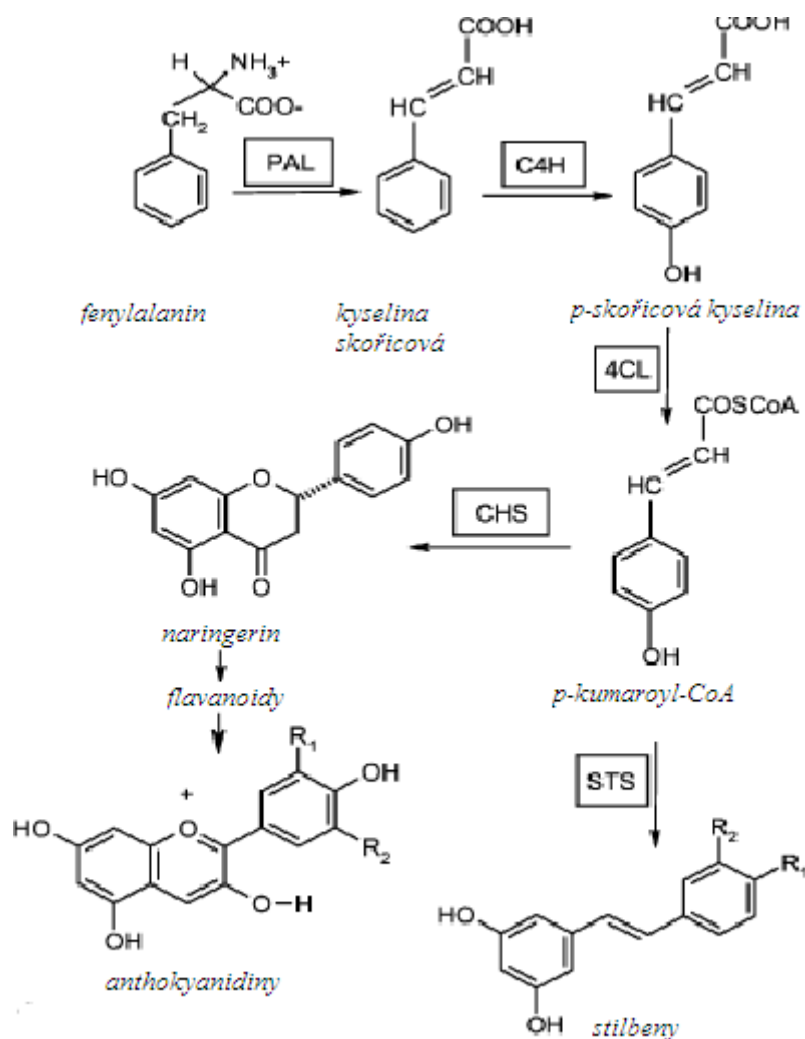
### 3.3 Výskyt [29, 39, 40]

Anthokyany mají značné rozšíření v přírodě. Jsou lokalizovány v buněčných vakuolách stabilizované interakcí typu ion-ion s organickými kyselinami (malonová, jablečná, citrónová). Počet jednotlivých anthokyanů v rostlinách je různý, rostliny mohou obsahovat třeba jen jediný druh anthokyanů nebo až deset různých druhů. Zbarvují např. modře květy pomněnek, červené květy máků či růží, dále jsou obsaženy v mnohých plodech. Podle reakce buněčné šťávy vakuol, tj. její kyselosti či zásaditosti, se mění barva anthokyanů; kyselé roztoky anthokyanů bývají červené, neutrální fialové a zásadité modré.

Hlavními zdroji anthokyanů jsou plody rostlin čeledi révovitých a to plody révy vinné. Dále jsou to plody čeledi růžovitých, jako jsou višně, třešně, jahody, ostružiny, jablka a hrušky. Z čeledi lilkovitých obsahují anthokyanová barviva baklažán a odrůdy brambor s červenou slupkou. Čeleď vřesovitých zahrnuje borůvky a bezinky. Z čeledi srstkovitých jsou hlavními představiteli černý a červený rybíz a červenoplodý angrešt. Dalšími jsou čeledi olejovité – olivy a brukvovité – červené zelí, ředkvičky.

### 3.4 Biosyntéza anthokyanů

Flavonoidy, pod níchž patří také anthokyany, vznikají kulminací dvou metabolických drah. Jednou z nich je šikimátová dráha a druhá fenylypropanoidová. Při fenylypropanoidové dráze se flavonoidy syntetizují karboxylací acetyl-CoA a pomocí aminokyseliny fenylalaninu, který je produktem šikimátové dráhy. Šikimátová dráha popisuje fixaci uhlíku při růstu zelených rostlin. Právě následná fenylypropanoidová dráha je považována za hlavní část biosyntézy anthokyaninových sloučenin. Touto cestou vzniká i mnoho dalších sloučenin jako stilbenů, ligninů, lignanů, auronů, flavonů, isoflavonoidů a hlavně flavonoidy, které zahrnují flavonoly, taniny a anthokyanidiny. Následná enzymatická reakce fenylalaninu katalyzovaná lyázou mění fenylalanin na cinamát a p-cumarát. cinamát-4-hydroxyláza katalyzuje syntézu p-hydroxycinamát a následně pomocí CoA-lygázy převádí p-cumarát na ester CoA, který je nutný pro syntézu malonyl-CoA. Biosyntéza flavonoidů začíná kondenzací jedné molekuly p-cumaroyl-CoA a tří molekul malonyl-CoA za vzniku chalkonu naringerinu. Tento chalkon je následně enzymaticky převeden na flavanon. U tohoto centrálního meziprojektu se syntéza rozděluje na několik bočních větví. Biosyntézu anthokyanů katalyzuje enzym dihydroflavonolreduktáza za vzniku flavan-3,4-diolů a ty jsou již převedeny na anthokyanidiny pomocí anthokyanidinsyntázou. Konečná tvorba glykosidů je uskutečňována enzymem glukóza-flavanoid-3-O-glukosyltransferázou. [31, 41, 42]



Obr. 14: Schematické znázornění biosynetické dráhy flavonoidů. Zkratky enzymů: PAL - fenylalaninamoniaklyáza, C4H - cinamát 4-hydroxyláza, 4CL - 4-kumaroyl-CoA-ligáza, CHS - chalkonsyntáza, CHI - chalkonizomeráza, F3H – flavanon-3-hydroxyláza, DFR – dihydroflavonol-4-reduktáza, ANS - anthokyanidinsyntáza, UFGT - UDPglukóza-flavonoid-3-O-glukosyltransferáza. [31]

### 3.5 Použití v potravinářském průmyslu

Přírodní barviva se již od nepaměti používala k barvení potravin, či textilií. Anthokyany se v potravinářství využívají přes jedno století a to ve formě koncentrátů šťáv. V dnešní době mají přírodní barviva vysokou oblibu u spotřebitelů, ale použité zdroje jsou omezené dostupností. Nevýhodou těchto barviv je, že jsou stabilní pouze v prostředí s pH menším jak 3,5, tudíž se hodí pro kyselé potraviny. [29, 39]

Nejčastějšími zdroji anthokyanových barviv jsou hrozny vinné révy a plody černého bezu. Z hroznů vinné révy se barviva získávají ze slupek nebo ze sedimentu šťávy s obsahem 0,3 – 7,5 g anthokyanů na kilogram sedimentu (slupek). Dalším významným zdrojem jsou bezinky neboli plody bezu černého. Ty obsahují 0,2 – 10 g anthokyanů na jeden kilogram plodů bezinek. Dále to mohou být aronie černoplodné, ostružiny, hlávky červeného zelí a květy ibišku.

V potravinách se anthokyanová barviva vyznačují pod kódem E163 a používají se k obarvení limonád, alkoholických nápojů, zavařenin, cukrovinek, mléčných výrobků a

zmrzlin. Nejsou známe žádné jejich nežádoucí účinky a jsou v ČR povoleny pro použití s potravinami, kromě dětské výživy. [43]

### **3.6 Pozitivní účinky anthokyanů na lidský organismus**

Anthokyany byly zahrnuty do lidské stravy již před několika staletími. Byly součástí tradičních rostlinných léčivých přípravků u indiánů, Evropanů i Číňanů. Na přípravu léčiv používali směsi a extrakty z listů, plodů, kořenů a semen rostlin. Léčili s nimi hypertenzi, horečku, úplavici, poruchy jater, problémy s močovými cestami nebo průjem. Není tedy závratným objevem, že vědecký výzkum v posledním desetiletí poskytl důkazy o tom, že anthokyany mají širokou škálu zdravotních výhod plynoucích z konzumace ovoce a zeleniny. Vědci prováděli výzkum s čistým anthokyanovým výtažkem a potvrdili několik významných účinků. Jsou jimi hlavně ochrana proti poškození jater, významné snížení krevního tlaku, zlepšení zraku, silné protizánětlivé a antimikrobiální aktivity, inhibici mutací způsobenou mutageny z vařených jídel, snížení onemocnění kardiovaskulárních chorob a potlačení šíření rakovinného bujení. Spolu s ostatními fenolickými látkami ničí v těle volné radikály a proto jsou hojně využívány jako antioxidanty. [44, 45]

Volné radikály a škody, které mohou nadělat na buněčné úrovni, získaly v posledních několika letech velkou pozornost. Oxidační stres způsobený volnými radikály - které jsou vyráběny během normálního chodu metabolismu a buněčné funkce, během psychického stresu a také vlivem škodlivých látek v ovzduší, vody a potravin - je zapojen do všeho, od stárnutí a vrásek kůže, poškození DNA, diabetu, po rakovinu a srdeční choroby.

Antioxidační aktivitu anthokyanů zvyšují hydroxylové skupiny. Naopak glykosilace ji snižuje. Antioxidační aktivita (čištění od volných radikálů, kovových chelátů a proteinů) anthokyanů byla prokázána také jako ochrana proti oxidaci LDL. Nedávné studie prokázaly silný inhibiční účinek pelargonidinu, kyanidinu, delfinidinu, peonidinu, malvidinu, malvidin-3-glukosidu a malvidin-3,5-diglykosidu na tvorbu NO v buňkách až o 50 %.

Anthokyanům v červeném víně je připisována souvislost se snížením onemocnění srdce. Proto tedy umírněná konzumace červeného vína přispívá k prevenci k těmto onemocněním, což bylo prokázáno vědeckými studiemi u obyvatel Francie, Španělska a Itálie. [46, 47]

## 4 METODY STANOVENÍ ANTHOKYANŮ

Anthokyanové pigmenty mají rozhodující roli v kvalitě zbarvení v mnohém čerstvém a zpracovávaném ovoci a zelenině. Přesné stanovení anthokyanů spolu s jejich degradačními indexy, je velmi užitečné pro potravinářské technologie a zahradnictví a to v hodnocení kvality surovin a zpracovaných potravin. Protože mnoho přírodních barviv je od anthokyanových barviv odvozených (extrakt ze slupek hroznů, červeného zelí, extrakt z fialové mrkve), mohou být metody měření barviv použity i pro tyto složky potravin. Čím dál více projevují spotřebitelé zájem o obohacení potravin a výživových doplňků o anthokyany, protože mají pozitivní účinky a lidský organismus. Snižují výskyt onemocnění srdečních chorob, zlepšují zrakové schopnosti, mají antioxidační aktivitu a protirakovinné působení. [48]

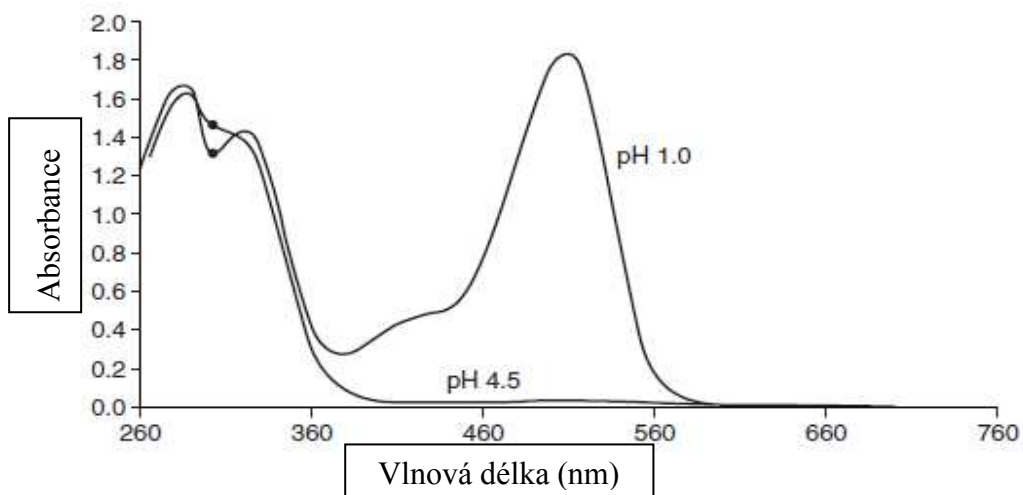
### 4.1 Papírová a tenkovrstvá chromarografie

V potravinářství se k prvotní identifikaci barviv používají nejčastěji metody tenkovrstvá nebo papírová chromatografie. Principem chromatografie je rozdělení látek na základě různé pohyblivosti v systému dvou fází. Stacionární fází je buď papír nebo tenká hliníková fólie s vrstvou  $\text{SiO}_2$  nebo  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Mobilní fází je směs vody a organického rozpouštědla. Při detekci se využívá buď přímá vizualizace skvrn, nebo pomocí jejich fluorescence pod UV zářením. Jelikož se látky identifikují pomocí pohyblivosti skvrny na papíře, jsou tyto výsledky nespolehlivé a jsou možné brát jen jako orientační. [49, 50]

### 4.2 pH diferenciální metoda [48, 51]

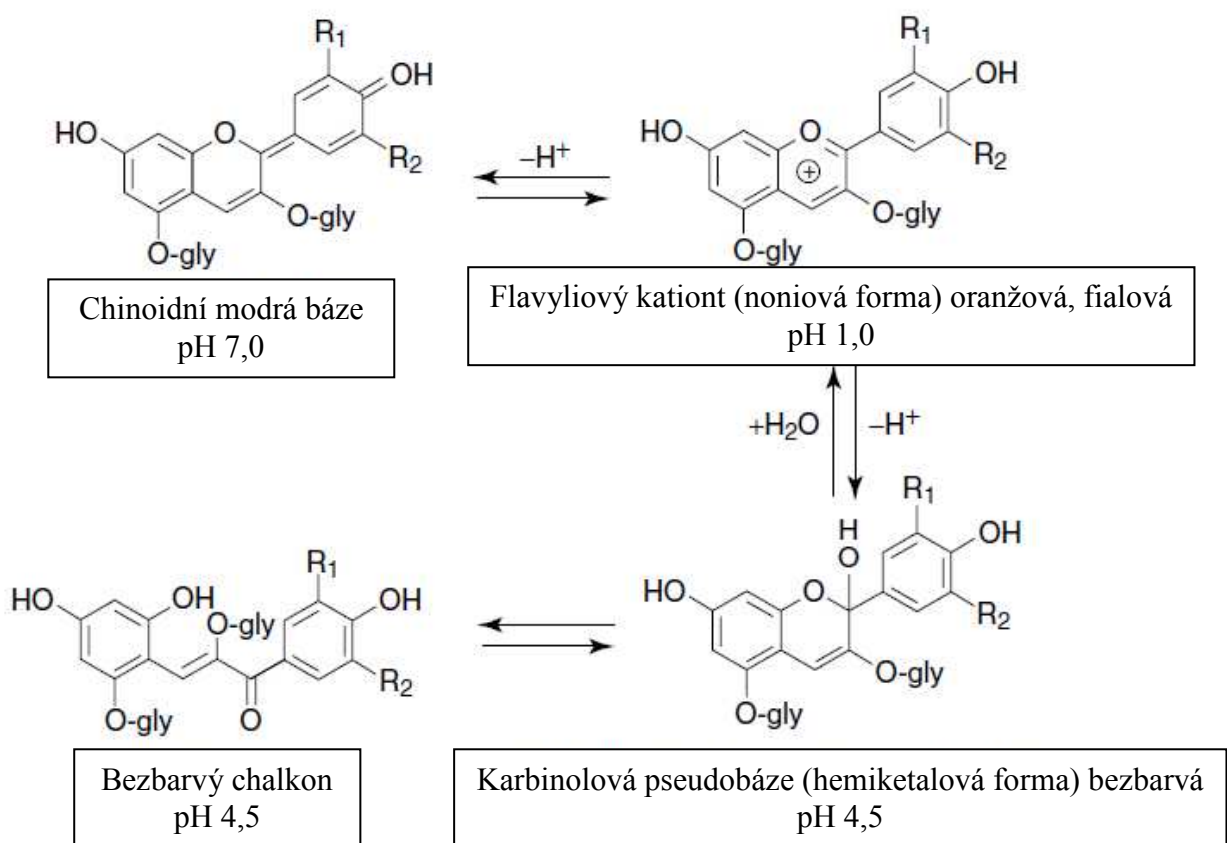
Tato metoda byla vytvořena pro stanovení celkových nomomerních anthokyanů. Podstatné informace o kvalitativním a kvantitativním složení lze získat ze spektrálních charakteristik anthokyanů. V následující metodě je popsána schopnost anthokyanů podléhat strukturální transformaci anthokyanového chromatoforu v závislosti na změně pH prostředí. Změny transformace jsou měřeny pomocí optické spektrofotometrie. pH diferenciální metoda je rychlá a snadná metoda pro kvantifikaci monomerních anthokyanů. Dále je možné metodu použít pro měření anthokyanové polymerace a procesu hnědnutí.

Anthokyanové pigmenty podléhají reverzibilní strukturální změně molekuly v závislosti se změnou pH prostředí (viz. Obr. č. 4). pH-diferenciální metoda tvoří závislost strukturální transformace anthokyanů na oblasti pH. Změna transformace chromatoforu je měřena UV-VIS spektrofotometrií.



Obr. 15: Příklad spektrálních charakteristik anthokyanů při pH 1,0 a pH 4,5. [48]

Barevná noniová forma převládá při pH 1,0 a bezbarvá hemiketalová forma při pH 4,5 (viz. Obr. č. 5). Metoda je umožňuje měření i v přítomnosti polymerovaných degradovaných pigmentu a jiných rušivých látek.



Obr. 16: Struktura anthokyanů při různém pH. [48]

obsah celkových anthokyanů:

$$(mg \cdot l^{-1}) = \frac{A \cdot MW \cdot DF \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l}$$

$A$  značí absorbanci vzorku při určité vlnové délce.  $A = (A_{\max} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{\max} - A_{700})_{pH4,5}$   
 $MW$  je molekulová hmotnost majoritního anthokyanidinu.  $DF$  je faktor zředění.  $\varepsilon$  značí molární excitační koeficient a  $l$  je délka květy.

### 4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Prvním objevitelem chromatografie byl botanik M.S. Cvět v roce 1903. Jeho práce spočívala v dělení chloroplastových pigmentů z rostlinných extraktů na skleněné koloně plněné  $CaCO_3$  s použitím organických rozpouštědel. V polovině 50. let 20. století bylo prokázáno, že separační rychlost je limitována rychlostí difúze rozpuštěné látky z kapalně fáze. Na konci 60. let minulého století Sorben, Peterson Gutter zavedli používání médií na bázi celulózy a o 10 let později popsal Hjerten použití separačních médií na bázi dextranu. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla vyvinuta v polovině roku 1970 a rychle se zlepšovala s vývojem nových vhodných materiálů pro kolony. V létech 1980 – 1989 byla vyvinuta nová média s vyšší mechanickou odolností, umožňující použití vyšších tlaků pro separaci. Takto vznikl systém bio-HPLC pro separaci biopolymerů. [52, 53, 54]

#### 4.3.1 Princip metody

Tato metoda je hojně využívána v biochemii i analytické chemii pro identifikaci a kvantifikaci. Jedná se o separační metodu založenou na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvěma fázemi, stacionární a mobilní. Aby docházelo k separaci složek, musí mezi těmito fázemi existovat fázové rozhraní. Při dělení vzorku dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi stacionární a mobilní fází. Tento děj popisuje distribuční konstanta  $K_D$ . Celý systém HPLC se obecně skládá z kolony, kde probíhá separace látek, vysokotlakého čerpadla, autosamplerem (dávkovačem vzorků) a detektorem. Proti jiným typům kapalinové chromatografie je HPLC zvýhodněna rychlejším průběhem analýzy a to díky použití vysokotlakého čerpadla. Další výhodou je možnost použití malé velikosti částic jako materiálu pro stacionární fázi v koloně. Umožňuje tak větší plochu pro interakci vzorku mezi fázemi a tím lepší oddělení látek ve vzorku. [49, 55, 56]

#### 4.3.2 Separační mechanismy HPLC

Gelová permeační chromatografie (GPC)

Rozdělení molekul analyzovaného vzorku probíhá v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.

Rozdělovací chromatografie (LLC)

Separace probíhá na základě rozdílné rozpustnosti molekul vzorku mezi dvěma nerozpustnými kapalinami.

Absorpční chromatografie (LSC)

Dělení analyzované látky probíhá na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.

Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Separace probíhá na základě rozdílné výměnné absorpce analytů na povrchu iontového měniče.

Po nástřiku vzorku na kolonu dochází k dělení jeho anthokyanového profilu. Následně jednotlivé zóny anthokyanů prochází přes detektor s různým retenčním časem. Chromatogram ukazuje jednotlivé píky dělených anthokyanových barviv a jejich šířku. Termodynamika a kinetika separace určují, jak moc budou sousední píky od sebe dokonale nebo nedokonale odděleny. Kinetické vlastnosti mohou ovlivňovat rozmývání zón při postupu v koloně a tedy i šířku píky na chromatogramu. Termodynamika separace charakterizuje ovlivnění velikosti interakce mezi analytem a sorbentem, retenci analytů, rychlost migrace analytů kolonou a dělení analytů navzájem od sebe.

Lze uplatnit několik způsobů pomáhajících k vylepšení separace analytů. Mohou jimi být změna délky kolony, změna stacionární fáze, zvýšení nebo snížení průtoku mobilních fází, změna složení mobilních fází a další. [53, 54]

### 4.3.3 Základní pojmy:

*Distribuční konstanta  $K_D$*

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

Kde  $(n_A)_s$  a  $(n_A)_m$  jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi,  $V_s$  a  $V_m$  jsou objemy stacionární a mobilní fáze. Čím je konstanta vyšší, tím déle se separovaná látka drží na stacionární fázi v koloně. Pro separaci je důležité, aby dělené látky měli rozdílnou  $K_D$ . Distribuční konstanty jsou určovány určitými zákony. Záleží na jaké fyzikální povaze pracuje rozdělovací děj.

*Kapacitní poměr  $k$*

Kapacitní poměr je definován jako množství separované látky ve stacionární a mobilní fázi:

$$k = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} = K_D \beta$$

Kde  $V_s$  a  $V_m$  jsou objemové veličiny stacionární a mobilní fáze. Udávají fázový poměr  $\beta$ . Vyjadřuje kapacitu kolony. Čím je kapacitní poměr vyšší ( $k = 20 - 1000$ ), tím je analyt více zadržován v koloně a tím pomaleji eluován, tedy i zóny eluovaných látek jsou rozmyté.

*Retenční objem  $V_R$*

Objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se separovaný analyt dostal od začátku ke konci kolony. Je to objem proteklý za retenční čas.

$$V_R = V_M + K_D V_s$$

$V_M$  značí mrtvý objem,  $K_D$  distribuční konstantu a  $V_s$  objem stacionární fáze.



### Retenční čas $t_R$

Jedná se o celkový čas, který analyt stráví v separační koloně, neboli doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky.

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad t_R = t_M (1 + k)$$

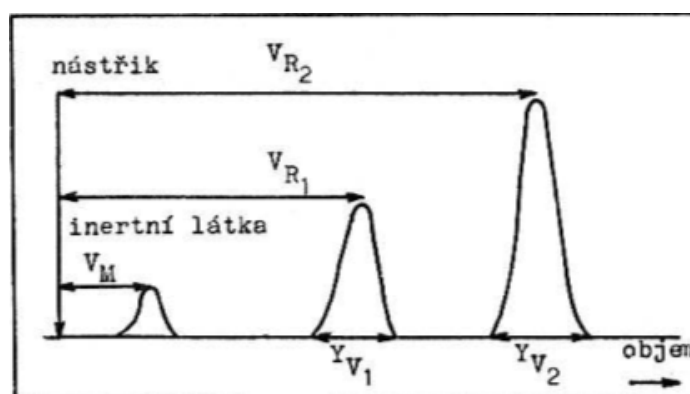
$V_R$  je retenční objem,  $F_m$  je objemová průtoková rychlost,  $t_R$  je retenční čas,  $t_M$  představuje mrtvý čas.

### Mrtvý objem kolony $V_M$

Objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

### Mrtvý čas kolony $t_M$

Je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas – mrtvý čas kolony.



Obr. 17: Eluční profil kapalinové chromatografie ( $V_M$  – mrtvý objem,  $V_{R1,2}$  – retenční objemy látky 1 a 2,  $Y_{V1,2}$  – šířky píků těchto látek v základně). [55]

### Účinnost chromatografické kolony

Odmocnina z počtu teoretických pater  $n$ , představujících pomyslný počet elementárních rovnovážných jednotek na délku kolony. Kolona je účinnější, čím více je teoretických pater. Každé zvýšení jejich počtu má za následek prodloužení doby analýzy, použití vyšších tlaků a prodloužení kolony. [53, 54, 55]

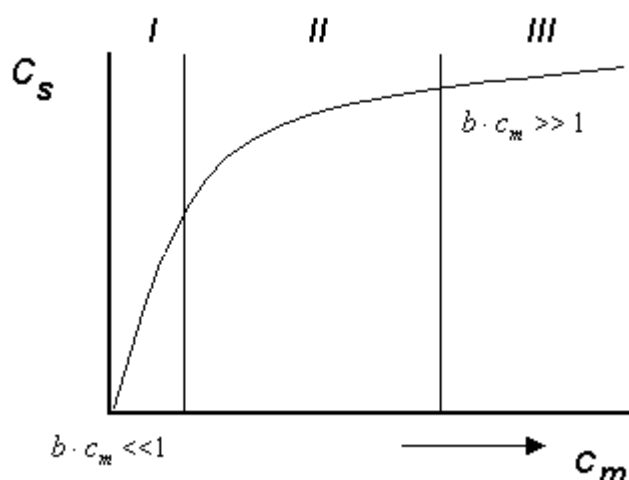
$$n = 16 \cdot \left( \frac{V_R}{Y_V} \right)^2$$

### Izotermický děj ( $T = \text{konstanta}$ )

Látka je zadržována na tuhé stacionární fázi pomocí absorpce. Ustalování rovnováhy se v tomto případě bude řídit absorpční izotermou, kterou lze popsat Freundlichovou, či Langmuirovou izotermou:

$$c_s = c_{s-\max} \cdot \frac{b \cdot c_m}{1 + b \cdot c_m}$$

Kde  $c_m$  je koncentrace složky v mobilní fázi,  $c_s$  udává koncentraci složky ve stacionární fázi. Dále  $b$  a  $c_{s-\max}$  jsou konstanty.  $c_{s-\max}$  označuje maximální možné množství naabsorbované látky na jednotku množství absorbentu.



Obr. 18: Langmuirova izoterma. [55]

Úsek I: Lineární úsek platí pouze pro malé koncentrace složky v mobilní fázi,  $c_m \ll 1$ . Potom zjednodušení izotermy bude:  $c_s = c_{s-\max} \cdot b \cdot c_m$ .

Úsek II: Pro tento úsek platí plně rovnice izotermy.

Úsek III: Koncentrace složky v mobilní fázi je vysoká  $c_m \gg 1$ , koncentrace  $c_s$  není ovlivněna  $c_m$  (aktivní centra jsou nasycena), platí:  $c_s = c_{s-\max}$ . [55]

### Adsorpční chromatografie v systému normálních fází

V koloně se nachází polární stacionární fáze a mobilní fáze je nepolární. Separované látky se zadržují ve směru polární – středně polární – nepolární. Mobilní fází může být například hexan a stacionární silikagel. [52]

### Adsorpční chromatografie v systému obrácených fází

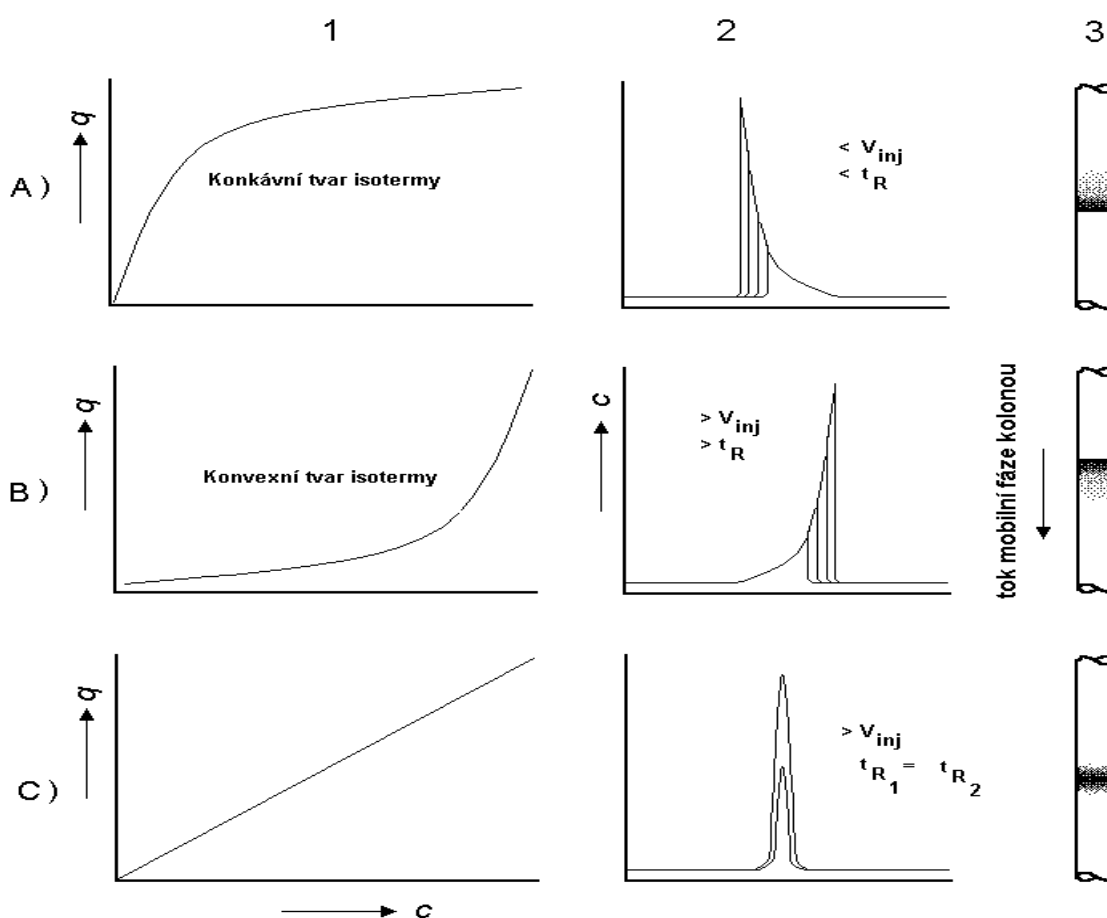
V tomto systému je naopak stacionární fáze nepolární (oktadecylsilikagel) a mobilní fáze je polární (acetonitril). Separované látky se tedy zadržují nepolární – středně polární – polární (viz příloha 1). [52]

### Nerstův rozdělovací zákon

Tento zákon platí rozdělování analytu mezi dvěma nemísitelnými kapalinami:

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Pokud je rozdělovací konstanta konstantní (závislost mezi koncentracemi je lineární), pak eluční zóna má tvar Gaussova rozdělení a vzniká tedy symetrický pík. Retence se se zvyšující koncentrací nemění. Naopak pokud je závislost mezi koncentracemi nelineární, vzniká nesymetrický pík. Při nižších koncentracích analytu a konkávního tvaru adsorpčních rovňah jsou píky eluovány pomaleji, což má za následek chvostování píku. Se zvyšující se koncentrací se retence snižuje. Při opačném zakřivení, tedy při konvexním tvaru, se bude pík rozmývat při nižší koncentraci analytu. Při vyšší koncentraci analytu se retence opět snižuje. [55, 57]



Obr. 19: Vliv tvaru adsorpční izotermy na tvar a retenci píku. [55]

### Gradientová eluce

Nejpoužívanější a neúčinnější technika programování podmínek HPLC. Při gradientové eluci se pracuje s mobilní fází, jejíž složení se mění s časem. Během separace se zvyšuje eluční síla. Časová změna koncentrace během separace se nazývá profil gradientu. Složky tvořící gradient mobilní fáze lze směšovat za nízkého nebo vysokého tlaku. Při nízkotlakém směšování dvou nebo více proudů jsou zásobníky mobilní fáze propojeny ventilem se směšovací komorou. Z této komory je čerpadlem směs odebírána k analýze. Vysokotlaký

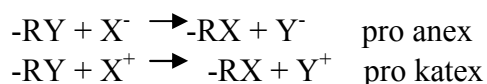
gradient mobilní fáze využívá dvou nebo více čerpadlem. Mobilní fáze jsou dopravovány do mísící komůrky a následně na HPLC kolonu.

Existuje i technika, izokratické eluce, která v průběhu separace nepoužívá změnu složení mobilních fází. [54]

#### *Výměna iontů*

Iontově výměnná chromatografie probíhá na iontoměničích. Ion iontoměniče je vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku. Separace probíhá na principu soutěžení ionexu o tyto ionty. Chromatografie probíhá na iontoměničích. Při tomto způsobu chromatografie zachycuje sorbent určitý typ iontů výměnou za jiný ion.

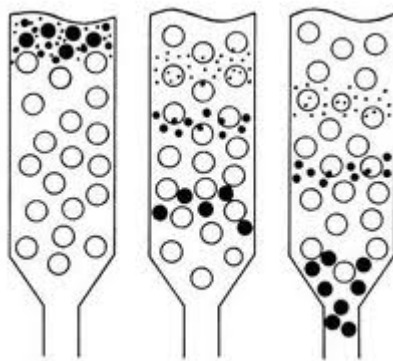
Podstatou je chemická reakce:



Kde  $Y^-$  a  $Y^+$  jsou vyměnitelné ionty, které jsou vázány na funkční skupiny ionexu. Při iontové výměně difundují sorbované ionty z okolního roztoku do ionexu, vytěsňují a vyměňují ekvivalentní množství jiných iontů vázaných na jiných výměnných skupinách. Tento pochod je obousměrný, takže v určitém okamžiku dochází k ustavení rovnováhy. V ionexové chromatografii se však nikdy nevyužívá plná výměnná kapacita ionexu, o celkové rychlosti výměny rozhoduje především difuze kapalinovým filmem a u velmi zředěných roztoků také difuze ionexem. [55, 57]

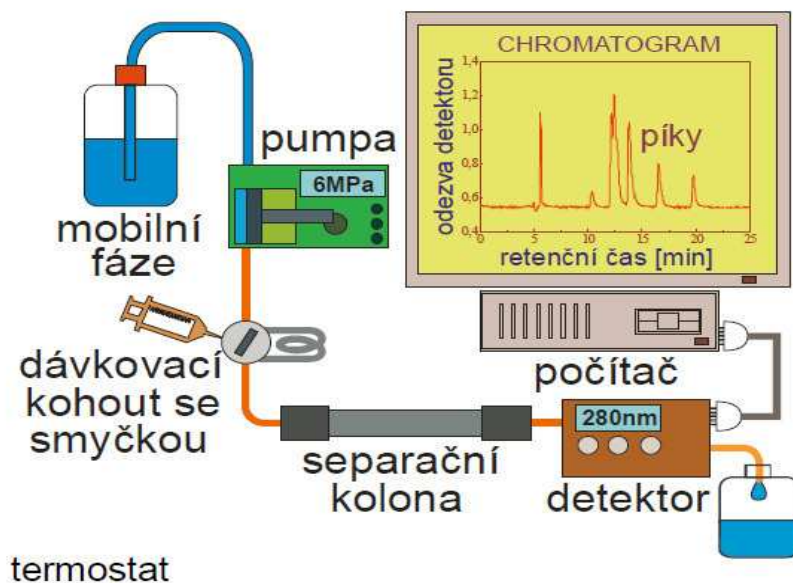
#### *Síťový efekt*

Na separaci mají rozhodující vliv velikosti (rozměry) molekul analyzovaného vzorku. V molekulovém sítu (pórovém gelu) se nejprve vylučují velké molekuly. Menší částice se zachytávají v pórech gelu a opoždují se. Při průtoku vzorku nedochází ke vzniku skutečné rovnováhy mezi koncentrací látek uvnitř či vně gelu. [53, 54]



Obr. 20: Schéma rozdělení směsi látek na gelové permeační chromatografii. [58]

#### 4.3.4 Instrumentace v vysokoúčinné kapalinové chromatografii



Obr. 21: Instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie. [59]

##### *Zásobník mobilní fáze*

Mobilní fáze jsou umístěny v zásobních lahvích o různém objemu. Ve většině případů je v zásobníku umístěn odplyňovač mobilní fáze z důvodu odstranění nežádoucích bublinek plynů v mobilní fázi.

Mobilní fáze je specifická pro každý typ chromatografie. Musí být kompatibilní s detektorem, netoxická, netěkavá, inertní vůči stacionární fázi a analyzovanému vzorku, nízké viskozity. Mobilními fázemi jsou organická rozpouštědla a jejich směsi (s vodou, pufrům). [49, 53]

##### *Čerpadlo mobilní fáze*

Jelikož se v HPLC používají kolony s velmi malými částicemi, kladou velký odpor. Proto je nutné použít vysokotlaká čerpadla pro dosažení požadovaného průtoku mobilní fáze. Průtok by měl být konstantní, reprodukovatelný a bezpulzní. Pro malé průtoky se používají reciprokační čerpadla, zdvojená pístová čerpadla s programovaným pohybem pístu, nebo taková, která se dají kombinovat se zařízeními na tvorbu gradientu. [49, 55, 56]

##### *Dávovací zařízení*

Dávkování vzorku se provádí buď ručně do dávovací smyčky, nebo pomocí automatického dávkovače (autosampleru). Pokud se dávkuje pomocí smyčky, jedná se nejčastěji o šesticestný ventil s vyměnitelnou smyčkou a plní se injekční stříkačkou. Objem smyčky se pohybuje v rozmezí desítek nanolitřů až po mililitry. Dávkovače jsou opatřeny regulovatelnou dobou vyplachování smyčky do kolony.

Automatické dávkovače jsou spojeny se zásobníkem vzorku, v němž jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené perforovanou zátkou z polypropylenu. Je několik druhů konstrukčního spojení injekční stříkačky dávkovače:

Injekční stříkačka dávkovače je fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorku pod zvednutou jehlou injekční stříkačky dávkovače, jejíž píst je ovládán speciálním krokovým motorem. Pohyb zásobníku je buď osový, nebo kruhový (typ tzv. karusel), záleží na typu konstrukce.

Zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky dávkovače ve směru osy x-y-z.

Zásobník i injekční stříkačka dávkovače jsou fixní, vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlou injekční stříkačky dávkovače, kde může docházet k dalšímu zpracování vzorku.

Dále je buď vzorek dávkován pomocí šesticestných ventilů, nebo pomocí několika třicestných ventilů. Při dávkování by neměl být přerušen tok mobilní fáze přes kolonu. K zamezení kontaminace vzorku se používá vnitřní i vnější oplach jehly. Vialky se vzorky jsou temperovány a chráněny před světlem. [49, 55, 56]

Náplňové kolony pro HPLC jsou vyrobeny ze skla nebo nerezové oceli, aby odolaly vysokým tlakům. Jsou to trubky nebo kapiláry rovnoměrně naplněné stacionární fází. Skládají se z kovového pláště, který udržuje stacionární fázi pohromadě. Plášť je uzavřen porézní kovovou fritou, ta zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a zároveň umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem a koncovou hlavicí. V kroužku je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem.

Náplň kolony se skládá z pravidelných kulových částic. Částice mohou být: klasické (25 – 80  $\mu\text{m}$ ), pelikulární (25 – 30  $\mu\text{m}$ , o vrstvě 1 – 3  $\mu\text{m}$ ), povrchově porézní nebo mikropartikulární (3 – 10  $\mu\text{m}$ ). Materiál, ze kterého jsou částice náplně tvořeny, může být polární nebo nepolární. [49, 53, 55, 56]

#### a) Polární adsorbenty

Silikagel (neupravovaný, modifikovaný)

V čisté amorfní formě má různé fyzikální vlastnosti. Výhodný je co největší specifický povrch a relativně velký objem pórů. Hlavní součástí aktivních center jsou hydroxylové skupiny, na které je vodíkovou vazbou adsorbována voda. Zahřátím nad 150 °C je odstraněna voda. Poté je silikagel aktivován. Adsorpcí probíhá na silanových skupinách, povrch silikagelu je slabě kyselý, proto jsou lépe zadržovány bazické látky.

Oxidy kovů ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  - alumina)

Alumina má obdobné vlastnosti jako silikagel. Vyskytuje se v řadě modifikací, dle množství navázané vody. Při vysokém obsahu vody se projevují rozdělovací efekty. Na povrchu se vyskytují protondonorní i protonakceptorní hydroxyly.

Chemicky vázané polární stacionární fáze - Aminopropyl

Zadržování látek na aminopropylu je mnohem vyšší než na silikagelu nebo alumině, zvláště pro kyselá látky. Nevýhodou aminopropylu je jeho vysoká reaktivita za vzniku iminů nebo oxidované  $\text{NH}_2$  skupiny. V přítomnosti vody je  $\text{NH}_2$  skupina hydrolyzována a výsledkem je vysoké alkalické prostředí v pórech.

#### b) Nepolární adsorbenty

Jedná se o chemicky vázané nepolární fáze, obrácené fáze. Obsahují uhlovodíkovou organickou část bez dalších skupin. Příkladem je reakce silikagelu s alkylsilanem. Silanizací silikagelu chlorsilany (funkční skupiny), lze připravit chemicky vázané fáze se slabě či

středně polárním (amino- či kyanoskupiny) popř. charakterem ionexu (sulfoskupiny). [52, 53, 55]

### *Detektory*

Zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru. Detektory se dělí na koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory zaznamenávají změnu hmotnostní koncentrace nezávisle na přívodu složky do detektoru. Hmotnostní detektor zaznamenává změnu hmotnostního toku složky do detektoru. Dále se detektory dělí na destrukční, ve kterých se chemická komponenta ireverzibilně mění. Druhým typem je nedestrukční detektor, v němž se chemická struktura komponenty nemění. V systému HPLC se používají spektrofotometrické UV-VIS detektory, fluorescenční, refraktometrické, amperometrický nebo hmotnostní.

Refraktometrický detektor je často označován jako univerzální. Je založen na měření rozdílu indexu lomu analyzované látky a čisté mobilní fáze. Pokud mobilní fáze unáší přes detektor eluát, objeví se výchylka. Je citlivý ke změně teploty. Detekuje koncentrace látek v rozmezí  $10^{-5}$  až  $10^{-6}$  g·ml<sup>-1</sup>.

Spektrofotometrický detektor patří v dnešní době k nejběžnějším detektorům. Jeho výhodou je jednoduchost a spolehlivost při detekci široké škály látek. Nejdokonalejší spektrofotometrické detektory jsou schopny pomocí diodového pole proměřit celá absorpční spektra během průchodu látky květou v určené oblasti vlnových délek. Detekuje koncentrace eluátu  $10^{-8}$  g·ml<sup>-1</sup>.

Fluorescenční detektor využívá fluorescence, tedy schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Fluorescenční detektor je vysoce selektivní a lze jej kombinovat i s detektorem fotometrickým.

Ampérometrický detektor je založený na měření proudu vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru. Je vhodný pro detekci elektroaktivní substance a má významné použití v biologických aplikacích. Např. pro HPLC separaci a detekci katecholaminů.

Hmotnostní spetrometrický detektor je založen na principu vzniku nabitě molekuly nebo fragmentu molekuly a měření jejich hmotnosti vzhledem k náboji. Vzorek je umístěn do přístroje a odpařován. Následně je vzorek ionizován za vzniku nabitých částic. Částice jsou děleny podle poměru hmotnosti a náboje v analyzátoru elektromagnetického pole. Ionty jsou detekovány a zpracovány hmotnostním spektrometrem. Metoda je používána ve spojení s kapalinovou chromatografií, tedy i HPLC. Podstatným problémem při spojování těchto dvou technik je rozdíl tlaku. Výstup analytu u HPLC je pod vysokým tlakem, kdežto v hmotnostním spektrometru je udržováno vakuum. Používá se spojení s přímým vstupem eluátu, kde se využívá děliče toku mobilní fáze. Do hmotnostního spektrometru se dostává jen malá část eluátu, ale dochází ke snížení citlivosti. Přímé spojování bez děliče toku je možné použít pro kapilární kolony, nebo kolony s malým průměrem. Mobilní fáze zároveň slouží jako reakční plyn pro chemickou ionizaci. Ve spojení s nekonečným pásem (Moving Belt) je eluát na výstupu z kolony rozprášen pod úhlem 45° na nekonečný dopravní polyimidový pás (obr. 1), mobilní fáze se odpaří pod infračervenou lampou a její páry jsou odsáty vakuovými pumpami ve dvou komorách. Analyzované látky jsou pohyblivým pásem vneseny do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, kde jsou bleskovým ohřátím odpařeny a ionizovány nebo jsou přímo na pásu ionizovány desorpcí laserem, nárazem rychlených iontů

nebo atomů. Aplikace této techniky je omezena na málo těkavé látky a dochází při ní k určité ztrátě chromatografického rozlišení při převodu separovaných složek vzorku z eluátu na dopravníkový pás. [52, 49, 53, 55, 56]

#### 4.4 Stanovení anthokyanů černém bezu

Na konci 20. století se opět začalo ve větší míře využívat přírodní barvivo v potravinářském průmyslu. Černý bez se ukázal jako velmi vhodný a bohatý zdroj anthokyanů. Brønnum-Hansen, Jacobson a Flink se roku 1985 zabývali extrakcí anthokyanů z čerstvého materiálu černého bezu. Počali testování různých extrakčních médií s vlivem času a teploty na zisk anthokyanů. Byly vyzkoušeny vodné i alkoholové roztoky okyselené kyselinou chlorovodíkovou. Testy však prokázaly, že pro extrakci anthokyanů z černého bezu je nejúčinnější  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (HCl). [60]

Roku 1995 Fiorini použil preparativní HPLC k purifikaci anthokyanů z výtažků z jahod, černého bezu, lilku a ředkviček. Metoda také sloužila k oddělení anthokyanů od encyaninu. Během jeho práce byly optimalizovány chromatografické podmínky analýzy pro účinné čištění v co nejkratší době. Tyto izolované anthokyanby byly detekovány pomocí UV-VIS spektrofotometru a následně porovnávány s referenčními normami. Stanovení úplné struktury acetylovaných anthokyanů vyžadovalo podporu rychlého atomového bombardování hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR), které byly ještě ve vývoji. [61]

Osamu Inami a jeho kolektiv v roce 1996 studovali dva druhy černého bezu a jejich pigmenty pro využití v nápojovém průmyslu. Zkoumané vzorky byly anthokyanby izolované ze *Sambucus nigra* a acetylované deriváty anthokyanů získané ze *Sambucus canadensis*. U těchto vzorků byla provedena HPLC analýza za použití Capcell Pak C18 200  $\times$  250 mm kolony a mobilní fáze tetrahydrofuranu, jehož pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou. Detektor byl použit UV-VIS. Výsledky testů prokázaly, že derivát anthokyanu kyanidin-3-O-(6-OEP-coumaroyl-2-O- $\alpha$ -D-xylopyranosyl)- $\alpha$ -D-glukopyranosidu-5-O- $\alpha$ -D-glukopyranosid (*S. canadensis*) byly podstatně stabilnější než samotné anthokyan kyanidin-3-sambubiosid (*S. nigra*). Bylo tedy prokázáno, že acetylace anthokyanů zvyšuje jejich tepelnou a světelnou stabilitu. [62]

Roku 1997 byla publikována práce P. Bridle a C. Garcia-Viguerové zabývající se srovnáním metod stanovení anthokyanů v jahodách a černém bezu. První metodou byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie a druhou kapilární zónová elektroforéza (CZE). Separace anthokyanů metodou HPLC podala dostačující výsledky dělení zejména pigmentů jahod. Anthokyanby černého bezu se hůře oddělovaly. CZE poskytovala obdobné výsledky, co se týče anthokyanů jahod, ovšem při separování anthokyanů z černého bezu docházelo k velikým rušivým vlivům způsobeným dalšími sloučeninami z extraktu černého bezu. Pro uspokojivé výsledky získané CZE bylo třeba mnohonásobně zvýšit koncentraci anthokyanů ve vzorku. Závěrem bylo, že pro separaci anthokyanových barviv z černého bezu je vhodnější metodika HPLC. [63]

K. Kaack a T. Austed roku 1998 stanovovali obsah anthokyanů, rychlost jejich degradace a obsah kyseliny askorbové. Stanovení anthokyanů prováděli na 14 vzorcích černého bezu metodou HPLC. Po zjištění množství kyseliny askorbové a rychlosti degradace anthokyanů ve šťávách bylo zřejmé, že pro přípravu ovocných šťáv nebo džusů obohacených anthokyanby



z černého bezu jsou vhodné odrůdy bezu s vyšším obsahem kyseliny askorbové, neboť zabraňuje jejich degradačním procesům. [64]

Jelikož mají anthokyaniny velký potenciál jako přírodní antioxidanty, byl proveden výzkum biologické dostupnosti anthokyaninů v krevní plazmě po požití potraviny s obsahem anthokyaninů. Výzkumem se zabýval M. Murkovic, H. Toplak, U. Adam, and W. Pfannhauser roku 2000. Jako vzorek potravin posloužil *Sambucus nigra* a v krevní plazmě byly hledány anthokyaniny s nejvyšším zastoupením metodou HPLC. Jedním byl kyanidin-3-O-glucosid a druhým kyanidin-3-O-sambubiosid. Při projektu byla subjektu podána strava bohatá na anthokyaniny a tuk. Po 2 hodinách bylo možné kvantitativně stanovit obsah anthokyaninů v plazmě. Následně během několika hodin byly anthokyaniny z plazmy eliminovány. Množství anthokyaninů nalezených v krevní plazmě bylo méně než 1 % z požití stravy. [65]

Amitabh Chandra, Jatinder Rana a Yingqin Li vypracovali roku 2001 metodou HPLC a LC-MS-ES pro identifikaci a kvantifikaci anthokyaninů jednotlivých i celkových v botanických surovinách. Anthokyaniny byly děleny na základě hmotnosti kationtů při LC-MS-ES a následně rozpoznány pomocí komerčně dostupnému anthokyaninovému standardu kyanidin-3-glukosid chloridu. Konkrétní množství anthokyaninů bylo vypočítáno vynásobením korekčního faktoru molekulární hmotnosti. Experimentální postupy a použití korekčního faktoru molekulární hmotnosti byly ověřeny pomocí šablon třešňového koláče Balaton a černého bezu. Tato studie prokázala, že používaný standard kyanidin-3-glukosid chlorid poskytuje poměrně přesné výsledky celkových anthokyaninů ve vzorcích botanických surovin. Tato metoda byla ohodnocena jakou jednoduchá metoda pro stanovení celkových anthokyaninů pro rutinní kontroly kvality potravin, či surovin. [66]

V roce 2003 byl vydán článek o studii identifikace anthokyaninů a antioxidačních vlastnostech rostliny Kalina rozšířená. Problematikou se zabýval MI-YEON KIM a kol. Plody této rostliny byly podrobeny analýze Sephadex LH-20 sloupcové chromatografie a preparativní vysoce účinné kapalinové chromatografie. Byly izolovány dva hlavní anthokyaniny a jejich struktury byly specifikovány pomocí metod nukleární magnetické rezonance (NMR) a HPLC-MS-ES. Výsledkem byly anthokyaniny kyanidin 3-O- (2-O- $\alpha$ -D-xylopyranosyl)- $\alpha$ -D-glukopyranosid, neboli kyanidin 3-sambubiosid a kyanidin 3-O- $\alpha$ -D-glukopyranosid, neboli kuromanin. Pomocí NMR byly prokázány aktivity proti aniontům superoxidů a hydroxylových radikálů, zodpovědné za negativní účinky na lidský organismus. Bylo tedy prokázáno, že obsažené anthokyaniny zvyšují antioxidační aktivitu a fyziologické účinky těmto plodům. [67]

Jakobek a Seruga v roce 2005 stanovovali celkové anthokyaniny ve šťávách z čerstvého ovoce a v komerčně dostupných ovocných džusech stejného ovoce. Vzorky ovoce a džusu z nich vyrobených byly: černý rybíz, borůvky, ostružiny, jahody, maliny, bezinky, višně a třešně. Z čerstvého ovoce byla drcením a lisováním získána šťáva, která byla ihned podrobena analýze pomocí RP-HPLC s UV-VIS detekcí. Mobilní fáze se skládala z roztoku metanolu a 0,5% kyseliny fosforečné. Celkové množství anthokyaninů bylo vyjádřeno jako obsah kyanidin-3-glukosid. Ve šťávách z čerstvého ovoce se obsah anthokyaninů pohyboval v rozmezí 199 – 6271 mg·l<sup>-1</sup>. V komerčně dostupných šťávách byl obsah 34 – 317 mg·l<sup>-1</sup>. [68]

Florian C. Stintzing, Jan Trichterborn a Reinhold Carle roku 2006 zkoumali potenciální synergismus směsi přírodních anthokyaninů a betalainů pro barvení potravinářských výrobků. Anthokyaniny a betalainy byly izolovány z přírodních vzorků, jakou jsou černá mrkev, bezinky, višně, jahody a červená řepa. Stabilita směsi těchto pigmentů byla zkoumána po dobu 3 týdnů při různých hodnotách pH. Nejvíce vyhovujících barevných odstínů použitelných k barvení

potravin bylo získáno při pH 4,5 a 5,0. Maximální stabilita pigmentů červené řepy se projevila při pH 3,0. Při pH 3,5 byla stabilní pouze jedna varianta směsi pigmentů, ovšem při pH 7,0 již nikoliv. Jednotlivé zastoupení anthokyanů a betalainů ve směsích bylo analyzováno metodou HPLC-MS. [69]

J. Valls a kol. v článku z roku 2009 aktualizoval vyčerpávající přehled o použití metod HPLC, kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie pro studium polyfenolů v potravinách. Největší třídu tvoří flavonoidy, které jsou široce zastoupeny v rostlinné říši a jsou nejvíce studovány pro své antioxidační a protirakovinné účinky. Článek se také zabývá třídami flavonoidů, jako jsou anthokyany, isoflavony a flavanoly, které se dnes hojně používají pro výrobu nových nutraceutik. [70]

#### **4.5 Stanovení anthokyanů v modrých odrůdách vinné révy**

Práce F. Mattivi a kol. z roku 1990 byla zaměřena na anthokyanový profil modrých odrůd vinné révy. Bylo odebráno kolem 120 kultivarů, zejména starých italských odrůd a asi 30 kultivarů *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* z různých oblastí Itálie. Anthokyany byly separovány pomocí techniky HPLC s fotodiodovým detektorem. Odrůdy vinné révy byly rozděleny do několika skupin podle procentuálního zastoupení monoglukosidů: estery kyseliny malvidin-3-monoglukosid-kávové a estery kyseliny p-kumarové, které souvisí s enzymatickou činností nezbytnou pro esterifikaci glykosidů, hydroxylaci a metylaci vyskytující se v biosyntéze několika anthokyanů. Získané údaje o indexu enzymatické aktivity odrůd umožňuje získat rozdíly mezi vinnou révou, spojené se syntézou anthokyanů. Stabilita anthokyanového profilu v rámci téže odrůdy umožňuje použití této techniky pro taxonomické účely. Díky této výzkumné studii bylo možné uplatnit tuto techniku pro klasifikaci a analýzu fylogeneze hroznů modrých kultivarů. Bylo možné tedy pohlédnout na vztahy mezi šlechtěnými odrůdami a jejich předky, tedy odrůdami divokými, od kterých se šlechtěné odrůdy odvíjely. [71]

Vědecká studie S. Guidoni a kol. z roku 1997 se zabývala účinností aplikace viru typu 3 (GLRaV-3) a viru typu A (GVA) na eliminaci parazitických organismů zvaných svinutky. Viry byly aplikovány na postižený klon Nebbiolo 415 a v průběhu jeho vegetačního období byly prováděny analýzy anthokyanů, katechinů, flavanolů pomocí metody HPLC a celkový obsah anthokyanů metodou spektrofotometrickou. Výsledky prokázaly, že virus eliminoval parazity, kteří způsobovali nižší fotosyntetickou aktivitu a shromažďování flavanolů v čepelích listů. Vinná réva byla opět schopna zvýšit akumulaci anthokyanů v hroznech. [72]

V roce 2003 se tým vědců R. Brouillard, S. Chassaing, A. Fougerousse zabývali různorodostí anthokyanů obsažených v přírodních materiálech. Středem zájmu byly anthokyany zejména v hroznech modrých kultivarů vinné révy. Základem bylo zjištění, že anthokyany v hroznech jsou velmi jednoduché oproti anthokyanům v jiných přírodních zdrojích, jako je černý bez, červené zelí, červené odrůdy brambor. V těchto zdrojích jsou anthokyany složité ze složitých bočních řetězců na dostupných místech aglykonového skeletu. Z potravinářských produktů jsou anthokyany v hroznech jediné, jejichž organoleptický profil se časem zlepšuje, tzv. stárnutím. Mladé víno, které obsahuje anthokyany z hroznů se po několika měsících mění spontánní reakcí na nové pigmenty. Tyto nové pigmenty udávají vínu barvu po mnoho let. Vědci zkoumali průběh vzniku nových pigmentu, tzv. kopigmentaci. Hrozny vinné révy obsahují z anthokyanů 3-monoglykosidy s pěti různými aglykony. Jsou jimi malvidin, peonidin, petunidin, kyanidin a delfinin. Některé

odrůdy modrých kultivarů mohou obsahovat i acetylované anthokyany a druh *Vitis riparia* obsahuje 3,5-diglukosidy. Výchozím anthokyanem je malvidin-3-glukosid. Všechny odrůdy *Vitis vinifera* mají volnou hydroxylovou skupinu na poloze 5 v kruhu A. Studie popisuje, že na udržení zbarvení vína se podílí intramolekulární kopigmentace. Barevný odstín se stává nejvíce stabilní, pokud je pouze jedna acetylová skupina nahrazena skupinou cinamoylovou. [73]

Saigne-Soulard C. a spol. roku 2006 věnovali výzkum biosyntéze anthokyanů a stilbenů ve vinné révě. Nápomocí jim byla metoda nukleární magnetické rezonance, jako doplňková metoda k HPLC. Biosyntéza anthokyanů a stilbenů spolu úzce souvisí. Anthokyany jsou velmi významnou složkou kvality hroznů vinné révy. Stilbeny zaujímají klíčovou roli v obranných mechanismech a jsou tedy považovány za přirozenou odolnost vinné révy. NMR výzkumnému týmu pomohla analyzovat stilbenovou a anthokyanovou dráhu, tedy začleňování molekuly fenylalaninu krok po kroku do molekul stilbenů nebo anthokyanů. Použité metody velmi usnadnily přístup k pochopení základního mechanismu tvorby sekundárních metabolitů vyšších rostlin. [74]

V témže roce 2006 se David Fournand a kol. zabývali obsahem anthokyanů a taninů v závislosti na obsahu cukrů v hroznech vinné révy. Hrozny byly sbírány v pravidelných intervalech procesu vyzrání. Následně byla provedena kvalitativní a kvantitativní analýza obsahu tříslovin a anthokyanů ve vzorku hroznu. Byly pozorovány změny anthokyanového složení s rostoucí hladinou cukrů v bobulích hroznu. Podíl methoxylovaných anthokyanů se se zvyšujícím obsahem cukrů zvyšoval, zatímco podíl kumaroylovaných anthokyanů se nejprve také zvyšoval a následně rychle klesl. U taninů byl detekován pouze minimální nárůst. S následnou zvyšující se polymerací studovaných sloučenin se jejich obsah postupně snižoval. Pro stanovení celkových červených pigmentů byla použita metoda spektrofotrická na standard katechin. Pro specifikaci jednotlivých anthokyanů se použila metoda HPLC s detekcí diodového pole. Při HPLC byl použit standard malvidin-3-O-glukosid. Analýza taninů byla také prováděna metodou HPLC po předcházející kysele katalyzované degradaci v přítomnosti flouroglucinu. Takto byly taniny převedeny na základní jednotky, protoanthokyany. Detekce byla prováděna dvojím způsobem. Prve pomocí fotodiodového pole a následně pomocí fluorimetrického detektoru. [75]

Roku 2008 byla provedena studie závislosti techniky solarizace bobulí hroznů vinné révy na obsah anthokyanů v letech 2004, 2005 a 2006. Výzkumem se zabýval Kozina Bernard a spol. Solarizace byla vysvětlena jako odraz slunečního světla do bobulí hroznu. Byla zaznamenávána změna světelného spektra a změna teploty na odrůdě Pinot noir. Pro analýzu anthokyanů byla použita metoda HPLC. Vliv solarizační techniky byl zřejmý ve všech zkoumaných rocích. Nejvyšší nárůst byl však zaznamenán v roce 2004. Anthokyanové zastoupení bylo měřeno na obsah 3-monoglukosidy jako jsou delfinidin, petunidin, peonidin a malvidin. [76]

Pro využití červených listů vinné révy jako suroviny na výrobu farmaceutických preparátů byla potřeba provést studie, která by upřesnila vhodnou dobu sběru těchto červených listů a zároveň aby nebyla ohrožena nosnost vinné révy v následujícím roce. Pozornost této studii věnoval roku 2008 Ernst Schneider a kol. Studie pojala 135 vzorků listů révy vinné. Analyzovány byly tyto komponenty: obsah anthokyanů, flavonolu a polyfenolových látek. Použitou metodou byla HPLC a konvekční fotometrie. [77]

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- Büchnerova nálevka
- filtrační papír (Papírny Pernštejn, ČR)
- vývěva
- mikropipeta 100 – 1000  $\mu$ l (Biohit, Finsko)
- injekční stříkačka – 2 ml (Chirana Injecta, SR)
- MCE Syringe mikrofiltr, velikost pórů: 0,45  $\mu$ m, průměr: 25 mm, (Fisher Scientific, USA)
- vialky, vršky, septa (Fisher Scientific, USA)
- kolona Synergi 4  $\mu$ m MAX-RP 80A HPLC Column 250 x 4.6 mm (Phenomenex, USA)
- kolona Kinetex 2.6  $\mu$ m C18 100A HPLC Column 100 x 3.0 mm (Phenomenex, USA)

### 5.2 Přístroje

- hlubokomrazicí box
- přístroj na přípravu deionizované vody (Labicom, ČR)
- pH metr (Monokrystaly s.r.o., ČR)
- ultrazvuková vana (Kraintek, SR)
- HPLC system (Spectra SYSTEM, USA):
  - gradientové čerpadlo P 4000
  - autosampler AS 3000
  - spektrofotometrický detektor UV 6000 LP
  - počítač se softwarem pro řízení a sběr dat ChromQuest 4.0
- LC systém (Shimadzu, Japonsko):
  - 2x gradientové čerpadlo LC-10-AD
  - kontrolní systém SCL-10A
  - termostat pro kolonu CTO-10AC
  - detektor s diodovým polem SPD-10A
  - počítač se softwarem pro řízení a sběr dat LC solution
- UV-VIS spektrofotometr Helios  $\gamma$  (Spectronic Unicam, USA)

### 5.3 Chemikálie

- deionizovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- acetonitril HPLC grade (Chem-lab, Belgie)
- kyselina mravenčí, 98% p.a. (Lach-ner s.r.o., ČR)
- ethanol (Sigma Aldrich, Německo)
- octan sodný p.a. (Lachema, ČR)
- chlorid draselný p.a. (Lachema, ČR)
- kyselina chlorovodíková (Lach-ner s.r.o., ČR)
- ethanol 98% HPLC grade (Chem-lab, Belgie)

- metanol 99% HPLC grade (Chem-lab, Belgie)
- kyselina chloristá 68% p.a. (Lach-ner s.r.o, ČR)

## 5.4 Rostlinný materiál a příprava vzorku

### 5.4.1 Vzorky černého bezu

Vzorky byly dodány Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským v Holovousích. Všechny 15 odrůd černého bezu rostlo za stejných environmentálních podmínek (kvalita půdy, sluneční záření). Vzorky byly sbírány na přelomu srpna a září roku 2011 a byly uloženy do mrazničky. Po zmražení byly odstraněny třapiny a volné malvičky byly uloženy do plastových sáčků a vráceny do mrazničky. Na ústav chemie potravin a biotechnologií byly bezinky převáženy ve zmraženém stavu v polystyrenových krabicích zasypány suchým ledem. Zde byly vzorky přemístěny do hlubokomrazicího boxu při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  a uchovány až do doby analýzy. Přesné pojmenování odrůd obsahuje tabulka 5.

Pro výběr gradientu byl použit vzorek černého bezu Allesö.

Tab. 5: Přehled analyzovaných odrůd černého bezu

číslo	odrůda
1.	Allesö
2.	Aurea
3.	Bohatka
4.	Dana
5.	Haschberg
6.	Heidegg 13
7.	Mammut
8.	Prägarten
9.	Riese aus Vossloch
10.	Sambo
11.	Sambu
12.	Samdal
13.	Sampo
14.	Samyl
15.	Weihenstephan

Vzorky vyjmuté z mrazničky byly ponechány při laboratorní teplotě volně rozmrazovat. Rozmražené plody byly přesypány do kádinky o objemu 150 ml a malou 50 ml Ehrlenmayerovou baňkou rozmačkány. Získaná šťáva byla přefiltrována nejprve přes vatou a gázu a následně filtrována pomocí Büchnerovy nálevky a vývěvy. Před plněním do vialek byl vzorek naředěn v poměru 1:5 deionizovanou vodou a filtrován přes mikrofiltr  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ . Nakonec byl odměřen 1 ml vzorku a pipetován mikropipetou do vialky a do doby analýzy uložen v lednici, protože anthokyany jsou tepelně a světelně nestabilní. Ještě týž den byl

vzorek analyzován. K analýzám byly odebrány vždy 3 vzorky z dostupného množství černého bezu.

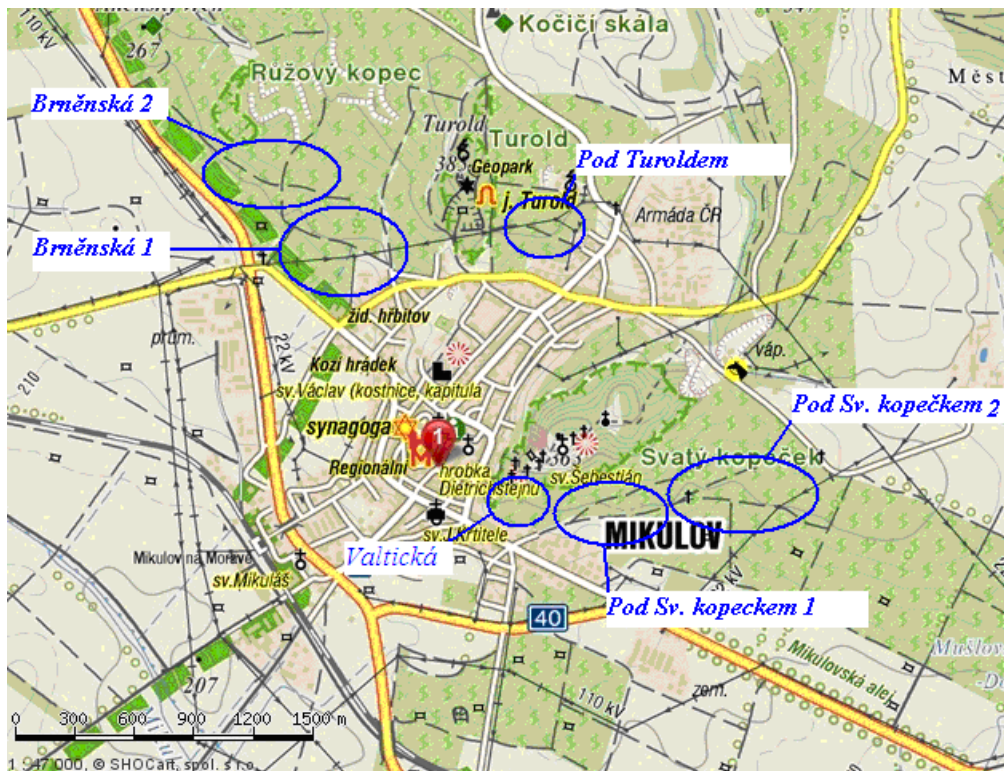
#### 5.4.2 Vzorky modrých kultivarů vinné révy

Vzorky hroznů modrých kultivarů byly dodány čtyřmi vinařskými podniky v Mikulově. Polohy vinic jsou znázorněny na obrázcích 22 a 23. Půda ve vinicích byla stejného složení, s vyšším obsahem CaCO<sub>3</sub>, což je pro tuto oblast charakteristické. Vzorky odrůd a poloha jejich vinic jsou zaznamenány v tabulce 6. Hlavním faktorem podporujícím různorodost obsahu anthokyanů bylo sluneční záření. Každý vinohrad byl jinak vystaven působení slunečního záření, viz obrázek 22 a 23. Vzorky hroznů byly odebírány z vinic, dle vyzrálosti jednotlivých odrůd. Odebrané hrozny byly dále zabaleny do plastových sáčků a uloženy v mrazicím přenosném boxu se suchým ledem a dopraveny na ústav chemie potravin a biotechnologie. Zde byly uloženy do hlubokomrazicího boxu při teplotě – 70 °C a uchovány až do doby analýzy.

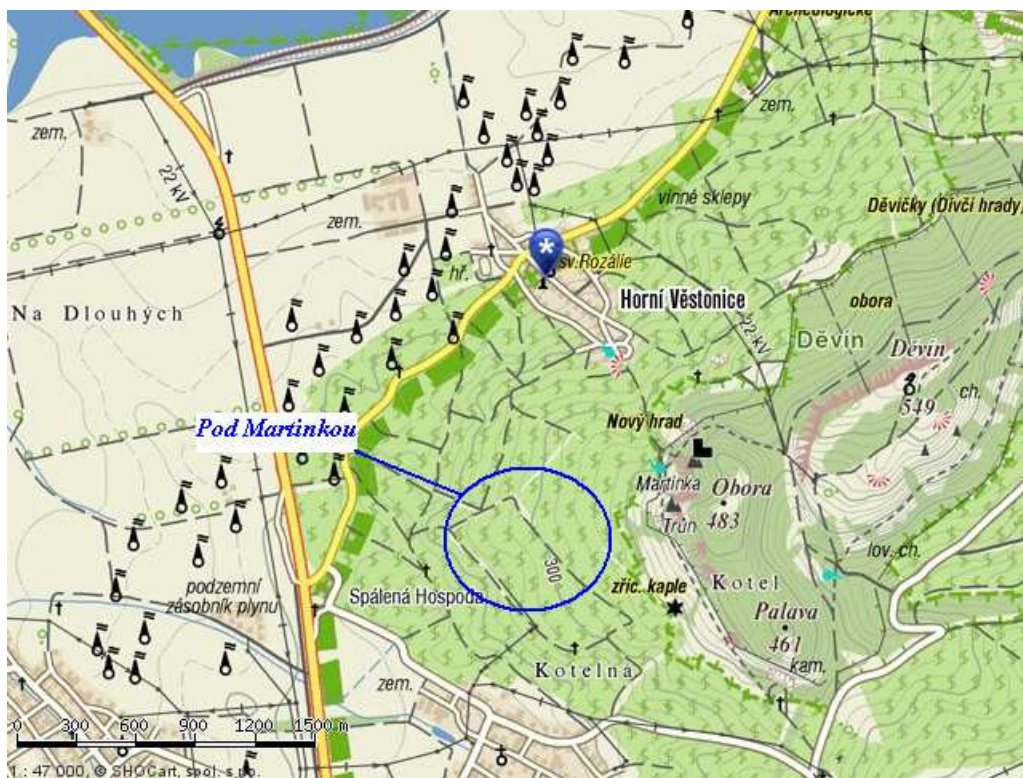
Vzorky vyjmuté z mrazničky byly ponechány při laboratorní teplotě volně rozmrazovat a poté byly naváženy. Ke každému vzorku bylo přidáno stejné množství 98% etanolu, jako byla navážka, a následně byl vzorek zhomogenizován. Homogenizát vzorku byl ponechán stát za laboratorní teploty asi 1 hod., aby se ze slupek dokonale vyluhovala anthokyanová barviva. Dále byl vzorek lisován, filtrován přes vatu a několikrát filtrován přes Büchnerovu nálevku a na závěr filtrován přes mikrofiltr 0,45 µm od nečistot. Byl odměřen 1 ml vzorku, pipetován do vialky a opět uložen do lednice kvůli zachování stability barviv. Těsně před analýzou byl vzorek vyjmut z lednice a vložen do spektrofotometru nebo dávkován na HPLC kolonu.

Tab. 6: Přehled odrůd modrých kultivarů podrobených analýze

viniční trať	odrůda
Brněnská 1	Cabernet Moravia
	Frankovka
	Zweigeltrebe
Brněnská 2	Svatovavřínecké
	Zweigeltrebe
Pod Sv. kopečkem 1	Rulandské modré
	Alibernet
	Cabernet Sauvignon
Pod Sv. kopečkem 2	Svatovavřínecké
Tuold	Svatovavřínecké
Valtická	Svatovavřínecké
	Zweigeltrebe
	Alibernet
	Neronet
Pod Martinkou	Cabernet Sauvignon
	Zweigeltrebe
Břeclav	Bago



Obr. 22: Mapa s vyznačenými polohami vinic kolem Mikulova



Obr. 23: Mapa se zaznačenou polohou vinice v okolí Horních Věstonic

## 5.5 Stanovení anthokyanů pH-diferenciální metodou

### *Příprava roztoků*

0,025 mol·l<sup>-1</sup> NaCl

Do 1000 ml kádinky bylo odváženo 1,86 g NaCl a přidáno 980 ml deionizované vody. Navážka byla dokonale rozpuštěna a roztok byl následně okyselen koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu pH 1,0. Takto upravený roztok byl kvantitativně převeden do 1000 ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou po rysku.

0,4 mol·l<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONa

Do 1000 ml kádinky bylo odváženo 54,43 g pevného CH<sub>3</sub>COONa. Navážka byla dokonale rozpuštěna asi v 960 ml deionizované vody. Vzniklý roztok byl dále okyselen koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 4,5. Okyselený roztok byl kvantitativně převeden do 1000 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

### *Stanovení obsahu anthokyanů pomocí pH-diferenciální metody*

Do tří suchých zkumavek bylo pipetováno 2,9 ml 0,025 mol·l<sup>-1</sup> NaCl a 0,1 ml úměrně naředěné čerstvé šťávy z černého bezu nebo modrých hroznů. Do dalších tří zkumavek bylo pipetováno 2,9 ml 0,4 mol·l<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONa a opět 0,1 ml vzorku čerstvé šťávy. Zkumavka byla uzavřena gumovou zátkou a řádně promíchána.

Stanovení celkových monomerních anthokyanů bylo prováděno na spektrofotometru Helios (příloha 2) při vlnové délce 510 a 700 nm. Jako blank byla použita deionizovaná voda. Při vlnové délce 510 nm mají absorbanci hledané monomerní anthokyanů. Jelikož reálný vzorek může obsahovat i rušivé barevné nečistoty, provádí se korekce při vlnové délce 700 nm. Takto získané hodnoty byly přepočítány podle vzorce uvedeného v kapitole 4.2. na obsah anthokyanů vztažených na majoritní anthokyan. V černém bezu je majoritní kyanidin-3-glukosid a v modrých hroznech malvidin-3-*O*-glukosid.

## 5.6 Stanovení anthokyanových barviv kapalinovou chromatografií

### 5.6.1 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze a jejich poměry byly použity na základě literatury, která byla dodána společně s kolonou Synergi C12 Max-RP (pro černý bez) a kolonou Kinetex 2.6 C18 100A (pro vinné hrozny).

Pro stanovení anthokyanů v černém bezu byla mobilní fáze A připravena smícháním deionizované vody a acetonitrilu v poměru 87:3 a okyselena koncentrovanou kyselinou mravenčí na pH 1,8. Toto nízké pH zajišťuje stabilitu červeně zbarveného flavyliového kationtu. Následně byla mobilní fáze umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně z důvodu odplynění. Mobilní fáze B byla připravena smícháním deionizované vody a acetonitrilu v poměru 40:60. Její pH bylo také upraveno na hodnotu 1,8 pomocí koncentrované kyseliny mravenčí.

Pro stanovení anthokyanů v modrých hroznech byl použit gradient mobilních fází C a D. Mobilní fáze C byla připravena smícháním 0,56 ml koncentrované kyseliny chloristé a deionizované vody. Výsledný objem činil 1 litr. Mobilní fáze D byla připravena smícháním 500 ml acetonitrilu, 100 ml methanolu, 0,864 μl koncentrované kyseliny chloristé a doplněna



deionizovanou vodou na 1 litr. Nakonec byla mobilní fáze umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně.

### 5.6.2 Optimalizace gradientu pro stanovení anthokyanů v černém bezu

Pro analýzy anthokyanů v bezinkách byl nejdříve použit gradient mobilní fáze uvedený v tabulce 7 dle literatury 78. S použitím tohoto gradientu však nebyly dobře rozděleny složky vycházející hned za mrtvým objemem kolony. Proto bylo nutné eluci složek upravit.

K optimalizaci eluce byl použit čerstvý vzorek černého bezu odrůdy Allesö. Kolona byla vždy důkladně promyta mobilní fází, aby došlo k její stabilizaci. Vzorek černého bezu byl třikrát dávkován a na základě chromatogramu bylo složení mobilní fáze dále upravováno.

Tab. 7: Gradient pro stanovení anthokyanů v černém bezu z liter. zdroje 78

t (min)	mobilní fáze A	mobilní fáze B
0	85	15
15	80	20
18	60	40
21	96	4
25	96	4

### 5.6.3 Gradient pro stanovení anthokyanů v modrých hroznech

Pro stanovení anthokyanů se vycházelo ze separačního systému, který byl vyvinut v laboratoři ústavu vinohradnictví a vinařství na Zahradnické fakultě Mendelu v Lednici. Jednotlivé anthokyany byly z kolony eluovány gradientem mobilních fází C a D, který je uveden v tabulce 8. Před každou analýzou byla kolona vždy několikrát promyta mobilními fázemi, aby se stabilizovala. Teprve potom byl na kolonu dávkován vzorek.

Tab. 8: Gradient č 1 pro stanovení anthokyanů v hroznech modrých kultivarů

t (min)	mobilní fáze C	mobilní fáze D
0	95	5
5	90	10
15	70	30
20	55	45
23	40	60
24	25	75
25 - 27	0	100
27 - 28	100	0
28 - 30	95	5

### 5.6.4 HPLC analýzy

Separované anthokyany jsou polární sloučeniny velmi podobné struktury. K jejich separaci se proto s výhodou využívá gradientová eluce s rostoucí polaritou mobilní fáze.

#### *HPLC stanovení anthokyanů v bezu černém*

Tyto analýzy byly prováděny na systému kapalinového chromatografu HPLC Spectra SYSTEM (příloha 2). K separaci anthokyanových barviv ve vzorcích bylo použita kolona Synergi C12 Max-RP o rozměru 250 × 4,6 mm vyplněná částicemi o průměru 4 μm. Gradientová eluce byla uskutečňována pomocí dvou mobilních fází A a B. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Na každou analýzu byl dávkován vzorek o objemu 20 μl. Každý vzorek byl dávkován celkem třikrát. Teplota autosampleru a kolony byla nastavena na 28 °C a na tlak 9 MPa. Detektor s diodovým polem zaznamenával spektrum v rozmezí vlnových délek 200 – 600 nm, analýzy anthokyanů byly sledovány při 520 nm. Po ukončení analýzy byla kolona promyta methanolem.

Pomocí dostupné odborné literatury byla jednotlivá anthokyanová barviva identifikována.

#### *HPLC stanovení anthokyanů v modrých hroznech*

Druhá sada stanovení anthokyanů v modrých hroznech byla prováděna na kapalinovém chromatografu Shimadzu Pro dělení barviv byla použita kolona Kinetex 2.6 C18 100A speciálně vyvinutá pro dělení anthokyanových barviv ve vinných hroznech. Kolona o rozměrech 150 × 3,0 mm byla naplněna sorbentem s pevným jádrem, což přispívá k lepšímu dělení anthokyanů. Průtok mobilní fáze byl stanoven na 0,6 ml·min<sup>-1</sup>. Systém vyžadoval manuální nástřik o maximálním objemu 20 μl na stanovení. Teplota kolony byla nastavena na 50 °C a tlak 20 MPa. Detektor s diodovým polem zaznamenával spektrum v rozmezí vlnových délek 200 – 600 nm. Detekční délka anthokyanů byla 520 nm. Po ukončení analýzy byla kolona promyta methanolem.

Pomocí dostupné odborné literatury byla jednotlivá anthokyanová barviva identifikována.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Černý bez

#### 6.1.1 Metoda stanovení pH-diferenciální

Pro získání správné a přesné hodnoty koncentrace anthokyanů obsažených v analyzovaných bezinkách je důležité, aby se tato barviva při rozmrazování dokonale uvolnila z buněk do roztoku. Proto byla nejdříve zjišťována doba totální plazmolýzy všech buněk obsahujících barevné pigmenty. Bezinky byly ponechány pozvolna rozmrazovat při laboratorní teplotě postupně po dobu 15, 30, 45 a 60 min., poté byly zpracovány k analýze podle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1 a analyzovány. Získané výsledky ukázaly, že doba potřebná pro uvolnění všech obsažených barviv do roztoku je 45 min. Množství anthokyanů stanovené po 60minutovém rozmrazování bylo stejné, jako když byly plody ponechány rozmrazat 45 min. Tato doba byla tedy stanovena jako dostatečná pro důkladné rozmrznutí a uvolnění anthokyanů a byla používána při všech experimentech.

Obsah anthokyanů ve vzorcích 15ti odrůd bezu černého byl stanovován podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Výsledná koncentrace byla spočtena pomocí vzorce v kap. 4.2. a přepočítána na mg pigmentu v 1 litru bezové šťávy a zahrnuta do grafu. Od každé odrůdy byly analyzovány 3 vzorky, každý vzorek byl měřen 3krát. Tabulka 9 a graf 1 znázorňuje získané výsledky.

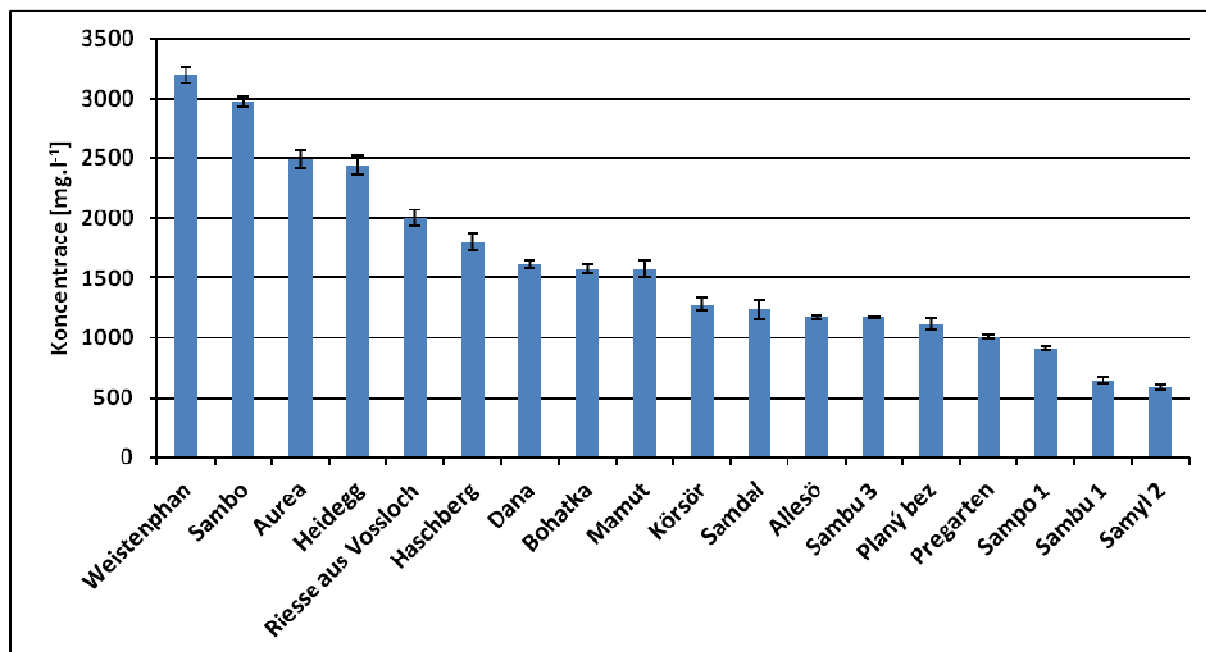
Tab. 9: Koncentrace anthokyanů vzorcích černého bezu.

Odrůda černého bezu	Koncentrace anthokyanů (mg·l <sup>-1</sup> )
Weihenstephan	3198,2 ± 14,3
Sambo	2977,8 ± 65,7
Aurea	2492,8 ± 20,3
Heidegg	2445,7 ± 64,1
Riesse aus Vossloch	2001,2 ± 17,3
Haschberg	1801,5 ± 18,7
Dana	1618,1 ± 73,7
Bohatka	1581,1 ± 12,5
Mammut	1573,0 ± 66,3
Samdal	1240,4 ± 26,2
Allesö	1173,6 ± 66,4
Prägarten	1015,0 ± 34,4
Sampo	909,1 ± 60,5
Sambu	643,2 ± 44,5

pH-diferenciální metodou bylo stanoveno, že nejvyšší koncentrace anthokyanových barviv je v odrůdě Weihenstephan 3198, 2 ± 14,3 mg·l<sup>-1</sup> a nejnižší v odrůdě Sambu 643,2 ± 44,5 mg·l<sup>-1</sup>.

Veškeré naměřené hodnoty byly podrobeny statistickému Dean-Dixonovu testu na vylučování odlehlých výsledků. Žádná hodnota nebyla vyloučena. U všech výsledků byla

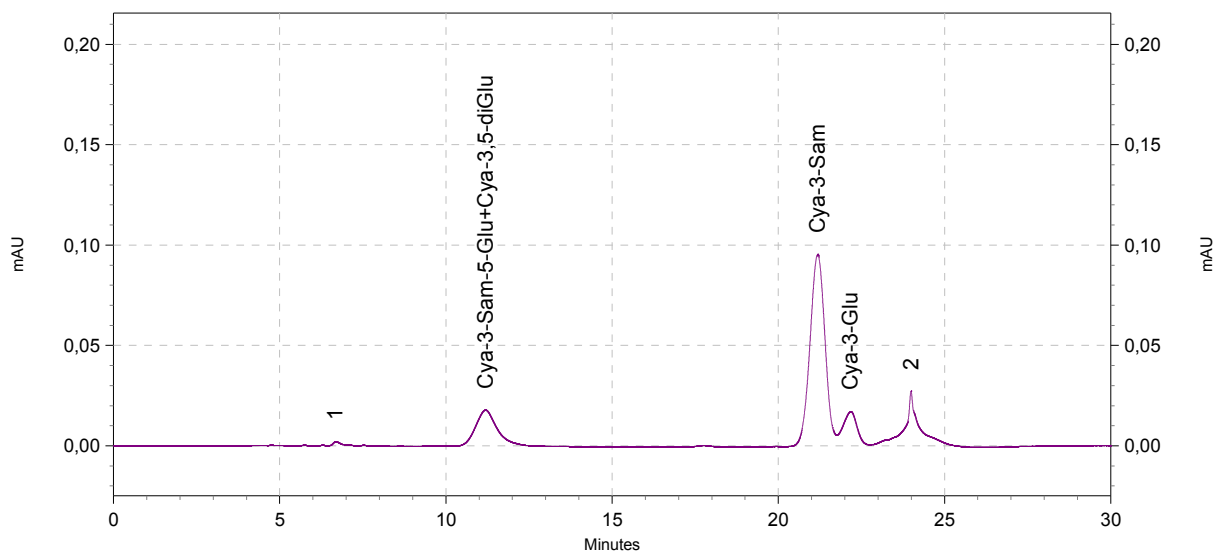
vypočítána směrodatná odchylka. U všech získaných výsledků byl také spočítán interval spolehlivosti a vyneseno do grafů jako chybové úsečky.



*Graf 1: Koncentrace anthokyanů v černém bezu stanovené pH-diferenciální metodou*

### 6.1.2 Metoda stanovení HPLC

Prvním krokem při stanovení obsahu anthokyanů v černém bezu metodou HPLC byla optimalizace jejich eluce. Záměrem bylo zajistit dobré dělení barviv a pokud možno zkrátit dobu separace. Jelikož gradient dodaný výrobcem kolony Synergi C12 Max-RP byl vytvořen pro stanovení jiných anthokyanů, bylo potřeba gradient uzpůsobit potřebám dělení anthokyanů v černém bezu. Původním použitým gradientem nebylo možné oddělit dva anthokyanu patřící mezi minoritní, tj. kyanidin-2,5-diglukosid a kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid.



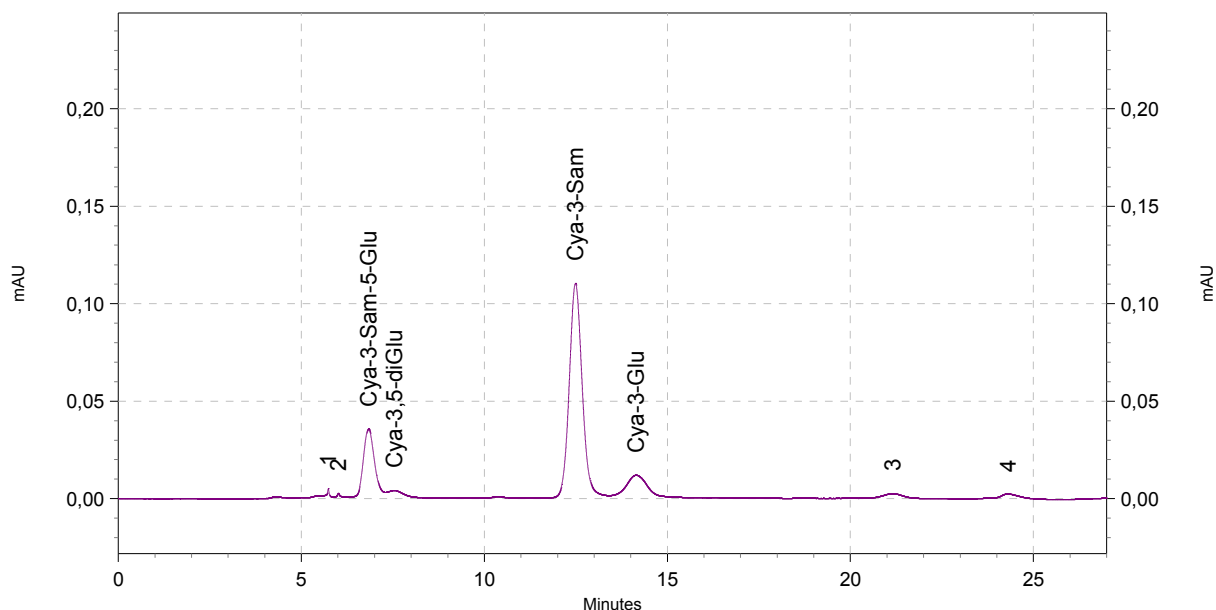
Obr. 24: Chromatogram gradientové analýzy anthokyanů černého bezu podle lit. (1 – nečistota, Cya-3-Sam-5-Glu - Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, Cya-3,5-diGlu – Kyanidin-3,5-diglukosid, Cya-3-Sam – Kyanidin-3-sambubiosid, Cya-3-Glu – Kyanidin-3-glukosid, 2 - nečistota)

Bylo zkoušeno celkem 5 verzí eluce anthokyanů, jednak gradientová eluce a potom izokratická eluce. Dále byl posuzován vliv změny rychlosti toku mobilní fáze na rozdělení jednotlivých anthokyanů.

Nejprve byla provedena změna poměrů mobilních fází A a B v 0. minutě na 80:20. Viz. Tab. 10, obr. 25.

Tab. 10: Gradient č. 2

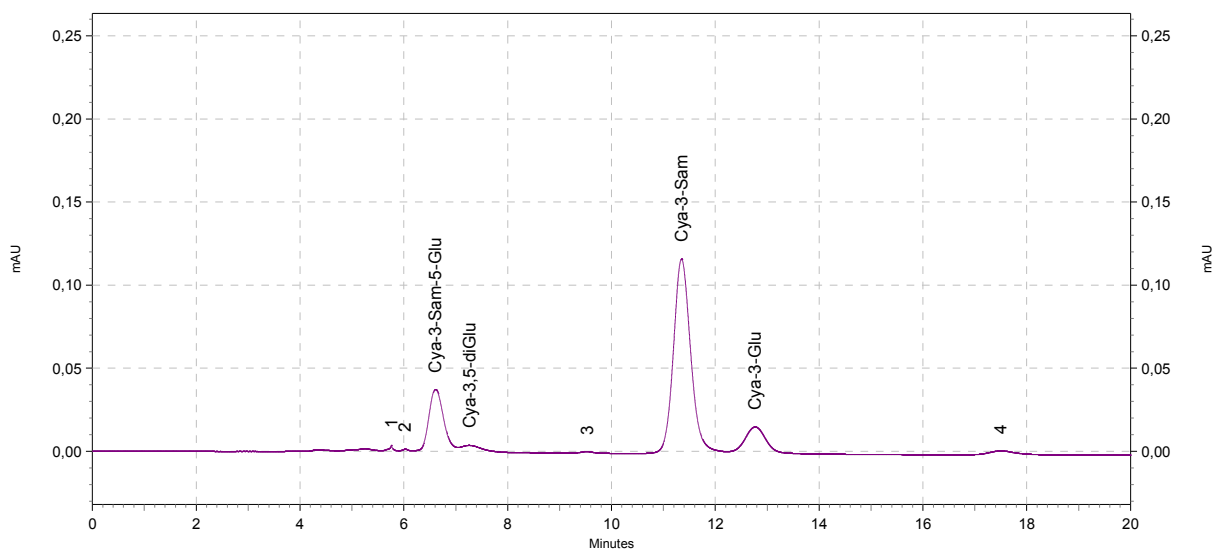
t (min)	mobilní fáze A	mobilní fáze B
0	80	20
15	80	20
18	60	40
21	96	4
25	96	4



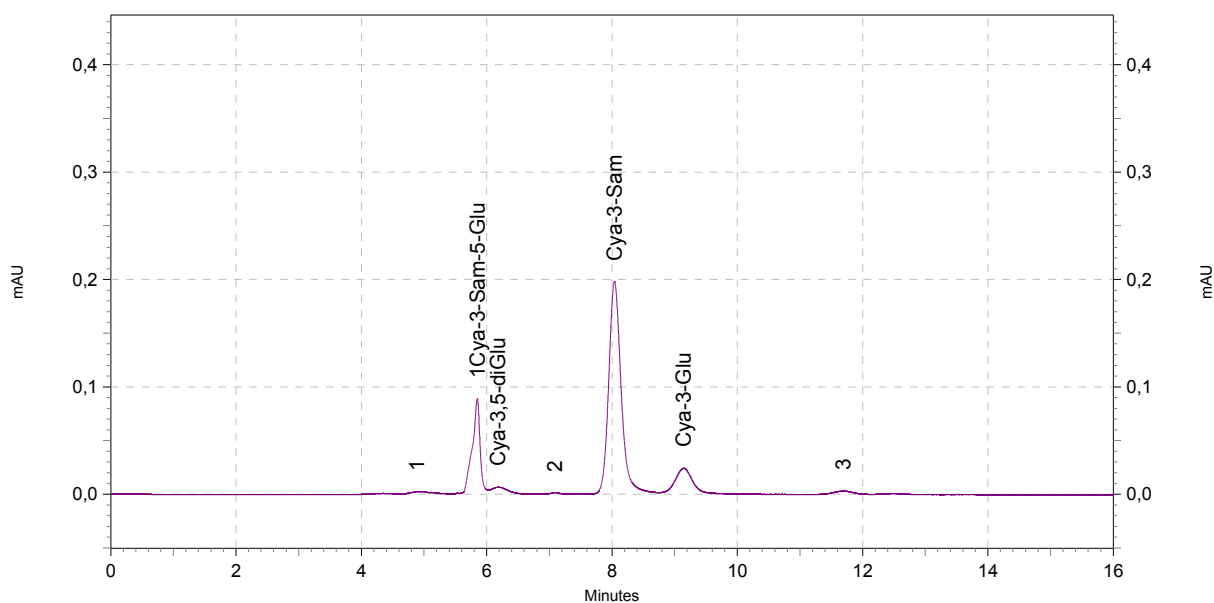
Obr. 25: Ukázka chromatogramu s upraveným gradientem č. 2 (1, 2 – nečistoty, Cya-3-Sam-5-Glu - Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, Cya-3,5-diGlu – Kyanidin-3,5-diglukosid, Cya-3-Sam – Kyanidin-3-sambubiosid, Cya-3-Glu – Kyanidin-3-glukosid, 3, 4 – nečistoty)

Při této úpravě gradientu stále nedocházelo k rozdělení dvou prvních anthokyanů a proto byla vyzkoušena obyčejná izokratická eluce.

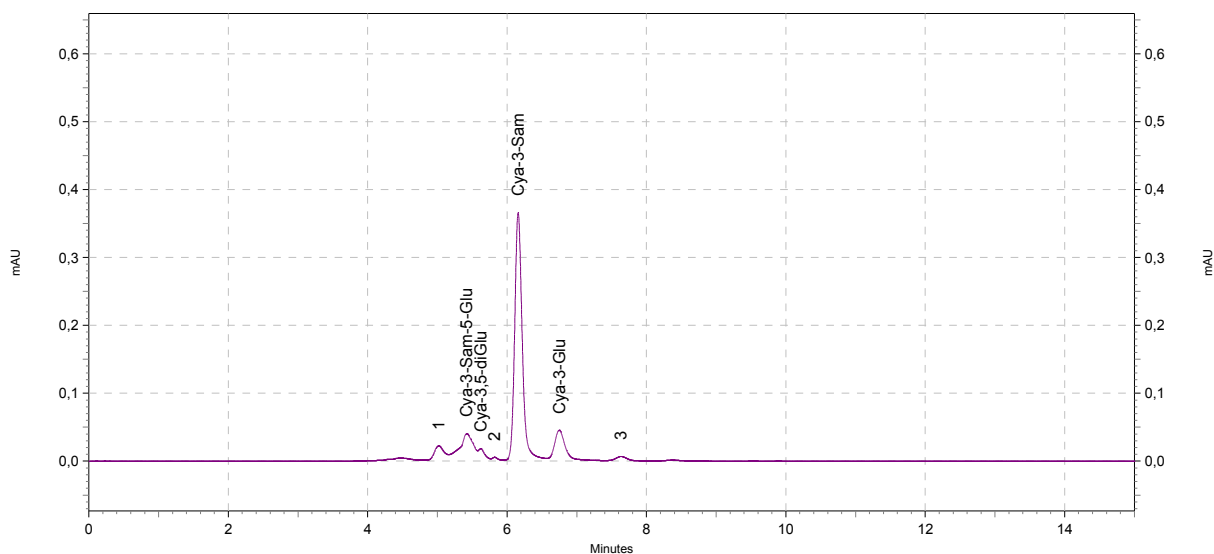
Nejprve byl nastaven poměr mobilních fází na A:B (80:20) obr. 26. Dělení dvou anthokyanů bylo zřetelně lepší, nežli v předchozích gradientech. Dále byl vyzkoušen poměr A:B (75:25) viz obr. 27. Se zvyšujícím se podílem polárního acetonitrilu, který interaguje s polárními anthokyanými se retenční časy velmi přiblížily k nižším hodnotám. Posledním zkoušeným poměrem byl A:B (70:30), který poskytoval rozdělené anthokyanů již do 10 minut. Stanovení bylo prováděno při průtoku  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (obr. 28). Při snížení průtoku na  $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  bylo dělení nejdokonalejší (viz obr. 29). Výsledným tokem mobilních fází byl poměr A:B (70:30) a průtok  $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , kterým byla separována anthokyanová barviva ve všech vzorcích černého bezu. Obrázek 30 ukazuje rozdělená anthokyanová barviva u odrůdy Mammut.



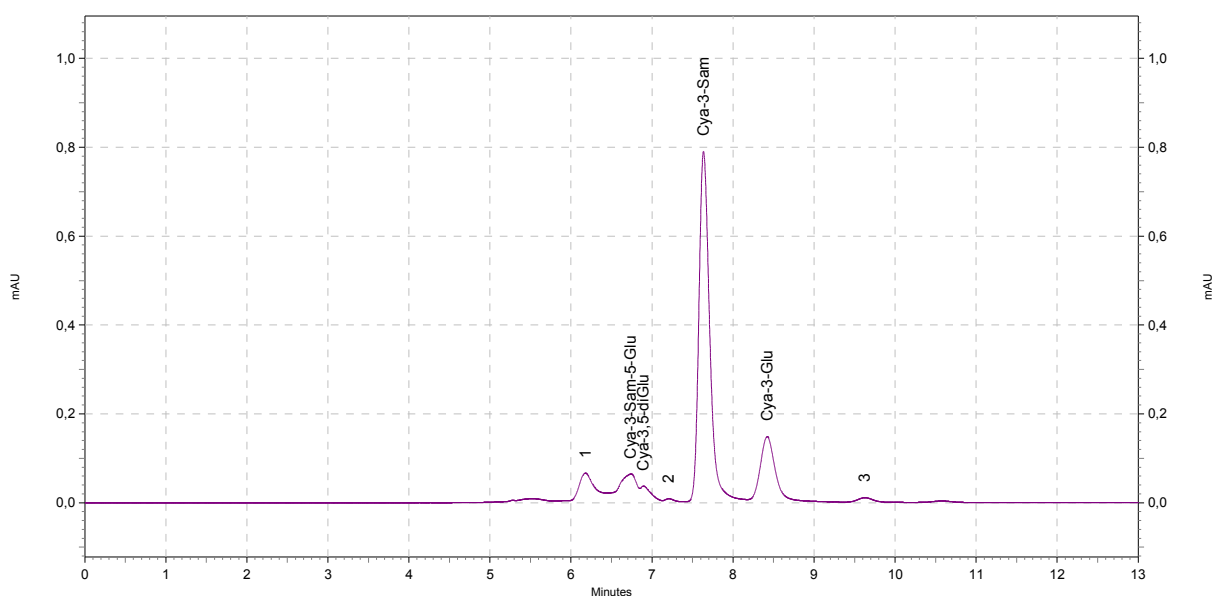
Obr. 26: Chromatogram s izokratickou elucí a poměrem mobilních fází A:B (80:20), (1, 2 – nečistoty, Cya-3-Sam-5-Glu - Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, Cya-3,5-diGlu – Kyanidin-3,5-diglukosid, 3 – nečistota, Cya-3-Sam – Kyanidin-3-sambubiosid, Cya-3-Glu – Kyanidin-3-glukosid, 4 – nečistota)



Obr. 27: Chromatogram s izokratickou elucí a poměrem mobilních fází A:B (75:25), (1 – nečistota, Cya-3-Sam-5-Glu - Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, Cya-3,5-diGlu – Kyanidin-3,5-diglukosid, 2 – nečistota, Cya-3-Sam – Kyanidin-3-sambubiosid, Cya-3-Glu – Kyanidin-3-glukosid, 3 – nečistota)

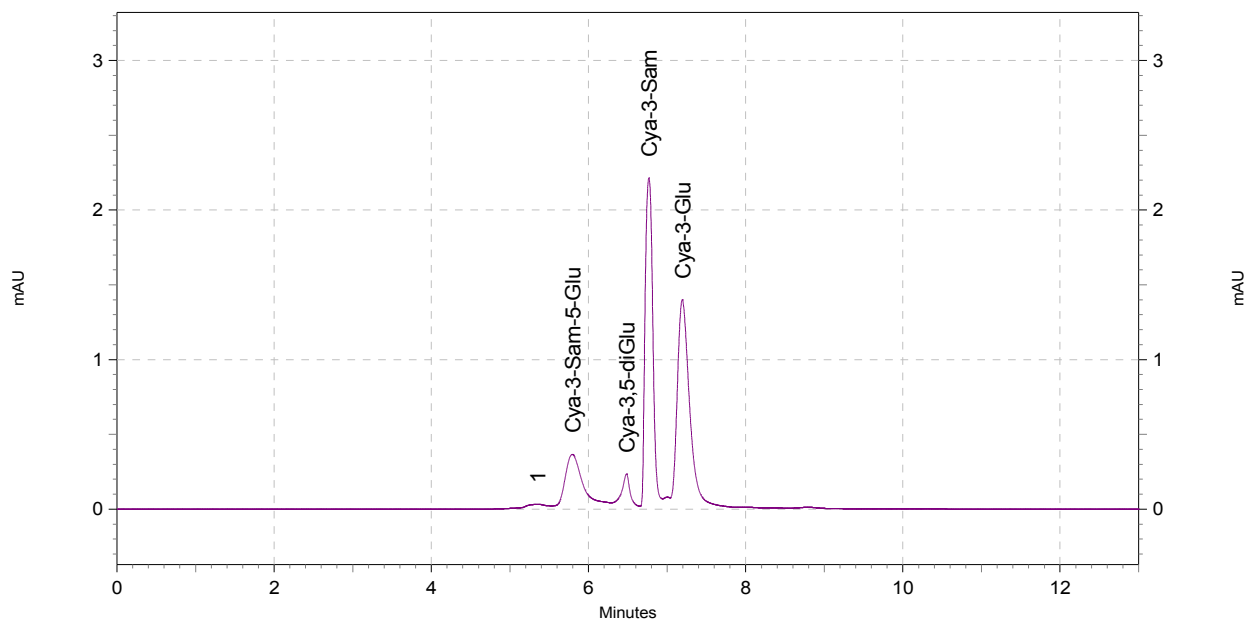


Obr. 28: Chromatogram s izokratickou elucí a poměrem mobilních fází A:B (70:30) a průtokem  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ , (1 - nečistota, Cya-3-Sam-5-Glu - Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, Cya-3,5-diGlu – Kyanidin-3,5-diglukosid, 2 – nečistota, Cya-3-Sam – Kyanidin-3-sambubiosid, Cya-3-Glu – Kyanidin-3-glukosid, 3 – nečistota)



Obr. 29: Chromatogram s izokratickou elucí a poměrem mobilních fází A:B (70:30) a průtokem  $0,4 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ , (1 - nečistota, Cya-3-Sam-5-Glu - Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, Cya-3,5-diGlu – Kyanidin-3,5-diglukosid, 2 – nečistota, Cya-3-Sam – Kyanidin-3-sambubiosid, Cya-3-Glu – Kyanidin-3-glukosid, 3 – nečistota)



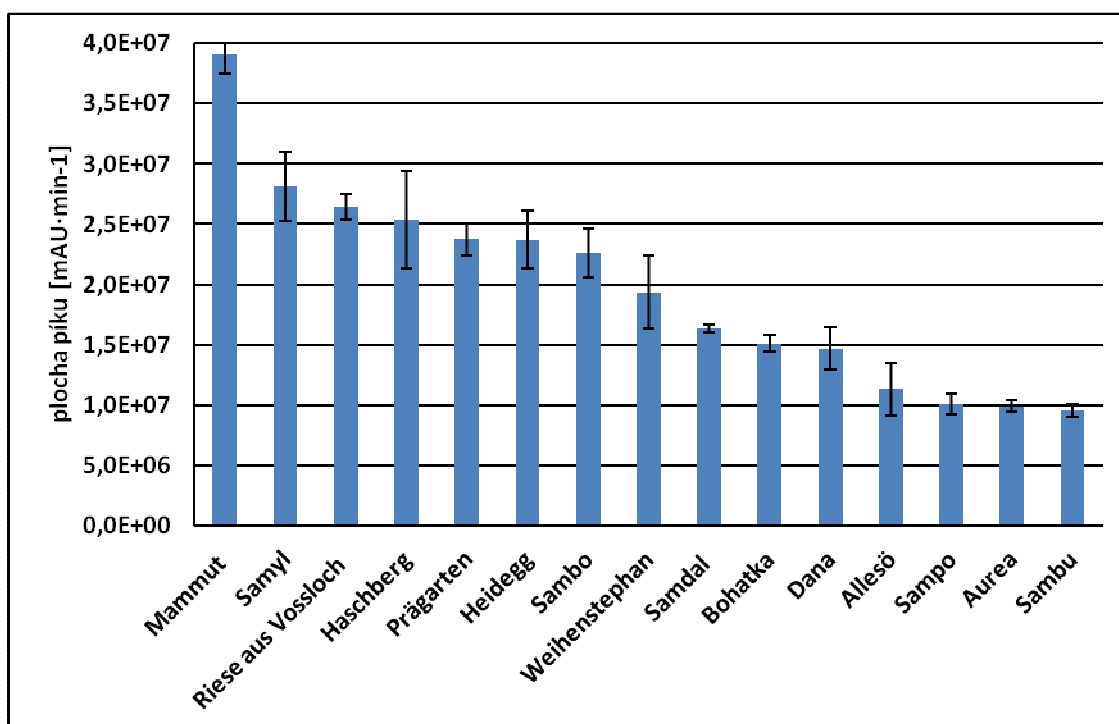


Obr. 30: Ukázka chromatogramu odrůdy Mammut (1 – nečistota, Cya-3-Sam-5-Glu - Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, Cya-3,5-diGlu – Kyanidin-3,5-diglukosid, Cya-3-Sam – Kyanidin-3-sambubiosid, Cya-3-Glu – Kyanidin-3-glukosid)

V následující tab. 11 jsou znázorněny plochy píků anthokyanových barviv v černém bezu stanovené pomocí HPLC metody. Z tabulky 11 a grafu 2 je možné vyčíst celková množství anthokyanů obsažených v jednotlivých odrůdách černého bezu. Celková plocha zahrnuje minoritní kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid, majoritní kyanidin-3-sambubiosid a kyanidin-3-glukosid. Největší koncentraci anthokyanových pigmentů obsahuje odrůda Mammut s plochou  $39031516 \pm 2303478 \text{ mAU} \cdot \text{min}^{-1}$ . Nejméně barviv má odrůda Sambu o celkové ploše píků  $9576169 \pm 80512 \text{ mAU} \cdot \text{min}^{-1}$ . Veškeré naměřené hodnoty byly podrobeny Dean-Dixonovu testu na vylučování odlehlých výsledků. Vyloučeny byly hodnoty u odrůdy Bohatka a Riese aus Vossloch. U všech výsledků byla vypočítána směrodatná odchylka a interval spolehlivosti.

Tab 11: Celkové plochy píků anthokyanů v černém bezu

Odrůda černého bezu	Plochy píků [mAU·min <sup>-1</sup> ]
Mammut	39031516 ± 2303478
Samyl	28172006 ± 4381927
Riese aus Vossloch	26402189 ± 1538508
Haschberg	25385587 ± 6215039
Prägarten	23729661 ± 1974768
Heidegg	23718620 ± 3175611
Sambo	22657423 ± 3077384
Weihenstephan	19367341 ± 4572096
Samdal	16313344 ± 482575
Bohatka	15107628 ± 986229
Dana	14703721 ± 2714766
Allesö	11342988 ± 3139034
Sampo	10110507 ± 1267061
Aurea	9908204 ± 459209
Sambu	9576169 ± 805129

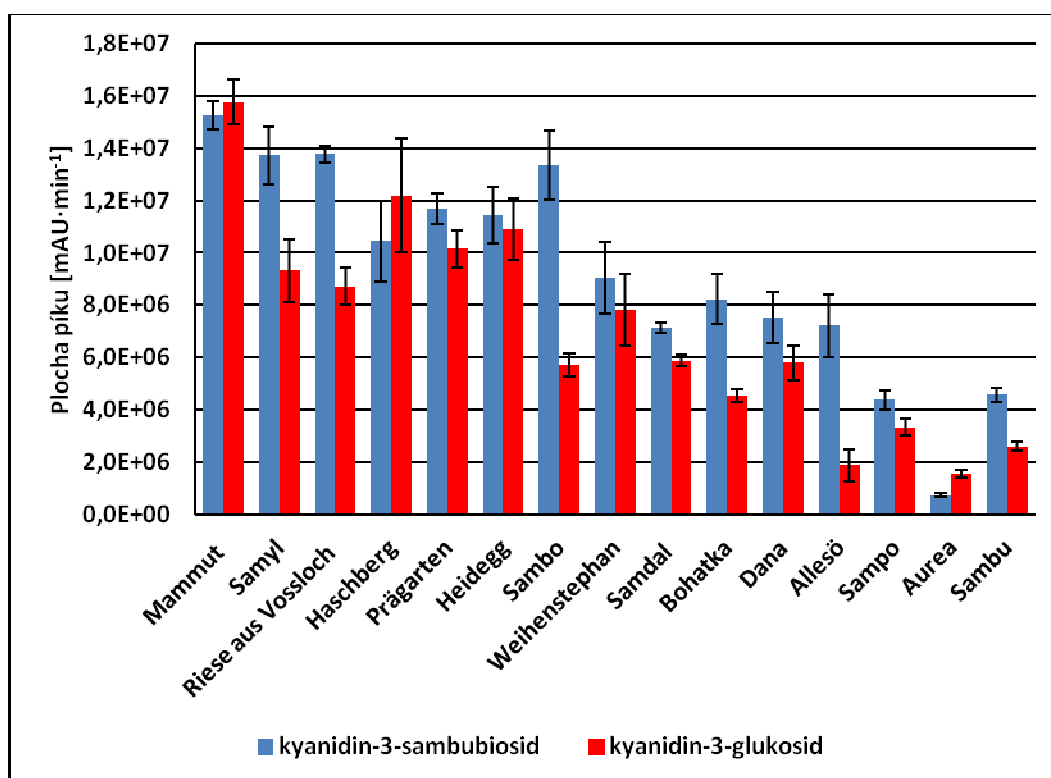


Graf 2: Celkové plochy píků anthokyanů černého bezu.

### 6.1.3 Srovnání obou metod

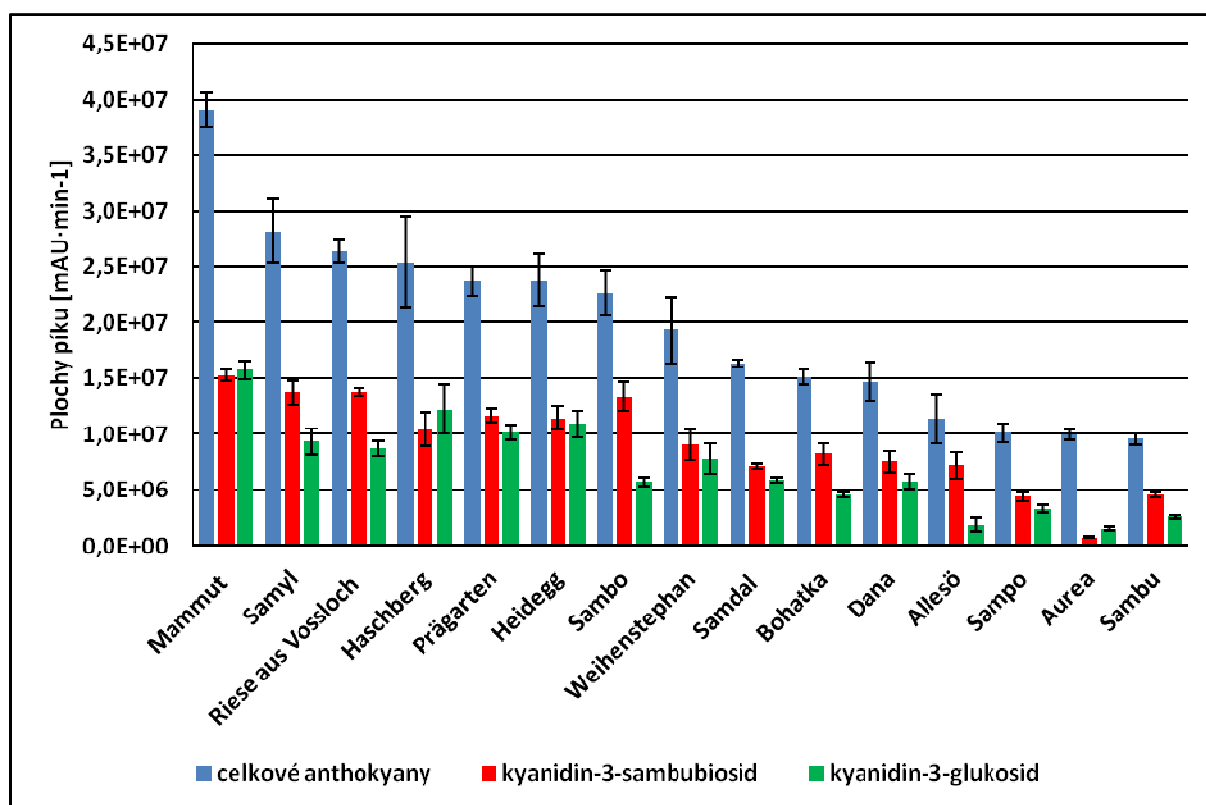
Z následujících grafů 3 a 4 je zřejmé, že výsledky ze stanovení pH-diferenciální metody příliš nesouhlasí s výsledky pořízenými metodou HPLC. Nepřesnosti porovnání výsledků těchto dvou metod byly způsobeny tím, že v případě pH-diferenciální metody byly anthokyany přepočítány na majoritní kyanidin-3-glukosid. Mezi majoritní anthokyany však patří také kyanidin-3-sambubiosid. V grafu 4 je možné vyčíst odlišnosti u několika odrůd

vzhledem k nejvyššímu obsahu majoritního anthokyanu. U odrůd Mammut, Haschberg a Aurea byl nalezen nejvýše zastoupený anthokyan kyanidin-3-glukosid. Podle použité literatury bylo možné celkové anthokyany vztahovat pouze na kyanidin-3-glukosid. Ovšem zbylé zastoupení anthokyanů, jako jsou kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid a kyanidin-3-sambubiosid, představují více než 50 %. Pro přesnější určení jednotlivých i celkových anthokyanů je vhodnější metoda HPLC. pH-diferenciální metoda může být a je používána pouze pro orientační stanovení obsahu anthokyanů v reálných vzorcích.



Graf 3: Plochy píků kyanidin-3-sambubiosidu a kyanidin-3-glukosidu.

Provnání obsahu celkové plochy píků anthokyanů a jednotlivé zastoupení majoritních anthokyanů zobrazuje graf 4. Všechny odrůdy vykazují majoritní zastoupení kyanidin-3-sambubiosidu a kyanidin-3-glukosidu. Pouze odrůda Aurea obsahuje tyto anthokyany v minimálním množství. Z uvedených odrůd je jediná, která jako majoritní anthokyany obsahuje kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid.



Graf 4: Plochy píků celkových anthokyanů, kyanidin-3-sambubiosidu a kyanidin-3-glukosidu

## 6.2 Vinná réva

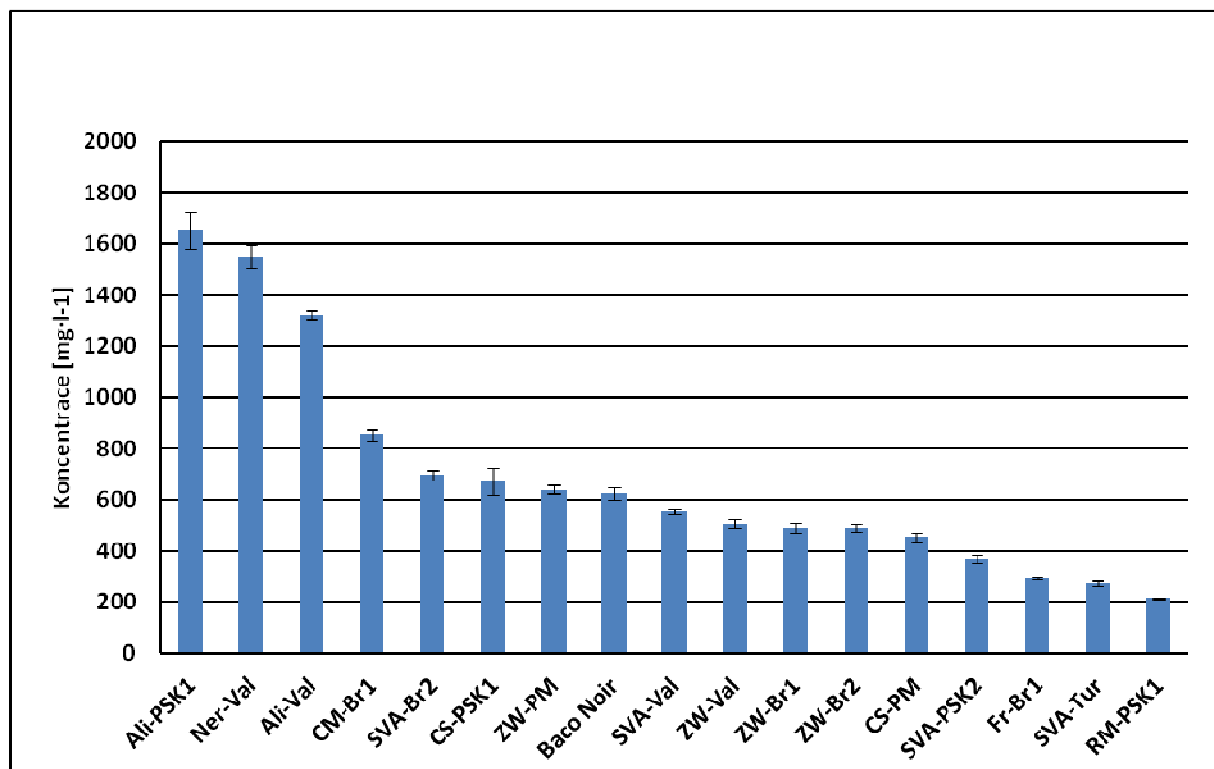
### 6.2.1 Metoda stanovení pH-diferenciální

Uvedená pH-diferenciální metoda byla také použita ke stanovení celkového obsahu anthokyanových barviv ve vybraných odrůdách modrých hroznů, pěstovaných na různých viničních tratích mikulovské oblasti. Výsledky stanovení jsou uvedeny v následující tabulce 12 a grafu 5.

Naměřené výsledky byly přepočítány dle vzorce (kap. 4.2.) na majoritní malvidin-3-glukosid. Pomocí této metody byly určeny odrůdy Alibernet ( $1650,8 \pm 63,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a Neronet ( $1551,5 \pm 40,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), jako největší producenti anthokyanových barviv. Naopak nejméně vykazují odrůdy Frankovka ( $290,3 \pm 4,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a Rulandské modré ( $211,2 \pm 4,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Veškeré naměřené hodnoty byly testovány Dean-Dixonovým testem na vylučování odlehlých výsledků. Žádná hodnota nebyla vyloučena. U výsledků byla určena směrodatná odchylka a interval spolehlivosti.

Tab. 12: Koncentrace anthokyanových barviv v červených kultivarech stanovených pH-diferenciální metodou.

Odrůda modrých kultivarů	Koncentrace anthokyanů (mg·l <sup>-1</sup> )
Ali-Br1	1650,8 ± 63,7
Ner-Val	1551,5 ± 40,4
Ali-Val	1323,2 ± 14,9
CM-Br1	852,9 ± 18,9
SVA-Br2	695,4 ± 17,1
CS-PSK1	670,1 ± 46,6
ZW-PM	640,5 ± 15,3
Baco Noir	623,6 ± 19,5
SVA-Val	554,9 ± 9,8
ZW-Val	505,2 ± 14,7
ZW-Br1	489,9 ± 16,7
ZW-Br2	494,3 ± 13,2
CS-PM	456,6 ± 14,4
SVA-PSK2	359,3 ± 13,5
Fr-Br1	290,3 ± 4,8
SVA-Tur	269,2 ± 8,7
RM-PSK1	211,2 ± 4,1

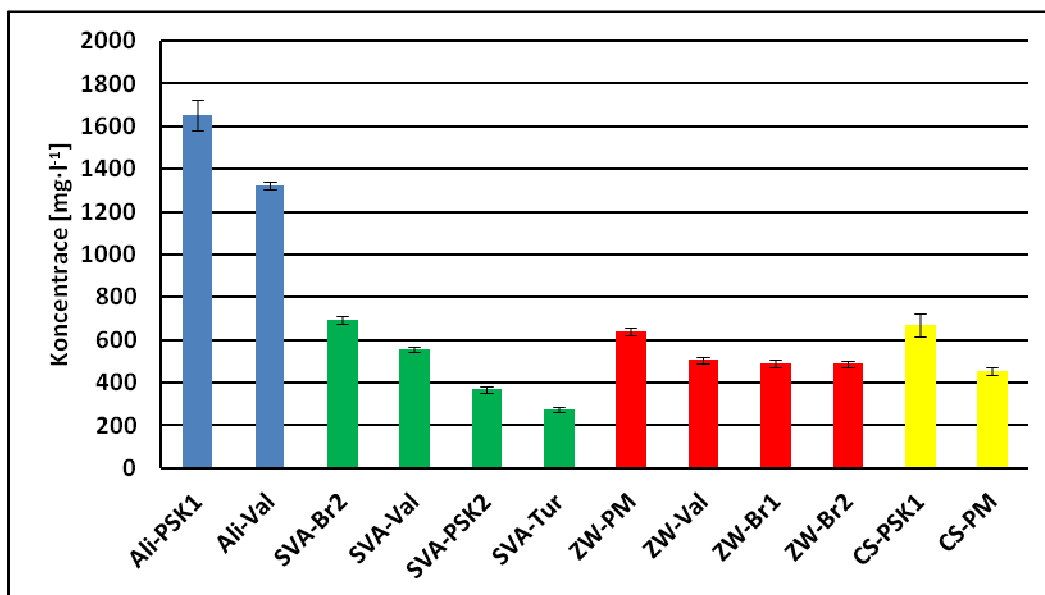


Graf 5: Koncentrace anthokyanů v červených hroznech stanovených pomocí pH-diferenciální metodou.

Většina odrůd obsahovala jako majoritní anthokyan malvidin-3-glukosid. Pouze u odrůdy Baco Noir se jako hlavní anthokyan objevuje delphinin-3-glukosid.

Vzorky hroznů sbírané na různých viničních tratích vykazovaly různé obsahy anthokyanů, vzhledem k odrůdě i vzhledem k poloze tratě. Cílem bylo poukázat, která viniční trať je na produkci anthokyanů v bobulích hroznů nejideálnější. Byly pominuty rozdíly ve složení půdy i stáří vinné révy. Zohledňován byl nejdůležitější faktor, klimatické podmínky, zejména sluneční záření. Viniční tratě se lišily polohou vzhledem k světovým stranám. Vinice rozprostírající se pod útvarem Sv. kopeček jsou vysázeny směrem jižním až jihovýchodním. Zde se nalézají viniční tratě Valtická, Pod Sv. kopečkem 1 a 2. Viniční tratě pod názvem Brněnská 1 a 2 leží jihozápadně. Tratě nacházející se u Turoldu jsou jižní. Poněkud vzdálenější viniční tratě pojmenované Pod Martinkou jsou položeny jihozápadně. Limitujícími faktory přísunu slunečního záření byla vždy správná volba polohy tratě.

Graf 6 zobrazuje rozdílné koncentrace anthokyanů u stejných odrůd Svatovavříneckého, Zweigeltrebe, Alibernetu a Cabernet Sauvignonu. Vzorky hroznů byly sbírány na odlišných viničních tratích. Nejvhodnějším místem pro pěstování odrůdy Zweigeltrebe se jeví trať Pod Martinkou, která je jihozápadní. Také pro odrůdu Svatovavřínecké je nejvhodnějším místem k pěstování podle obsahu anthokyanových barviv jihozápadní poloha viniční trati. Největší obsah červených pigmentů měla odrůda Svatovavřínecké, sbíraná na trati Brněnská 2. Naopak pro odrůdy Alibernet a Cabernet Sauvignon byl nejvyšší obsah anthokyanů nalezen v hroznech sbíraných na viničních tratích jihovýchodní orientace. Tyto odrůdy byly bohužel sbírány jen ze dvou vinic. Lze tedy jen obtížně objektivně hodnotit nejvhodnější polohu viniční trati. Pro přesnější určení nejlepší polohy by bylo třeba získat více stejných odrůd z jednotlivých tratí.



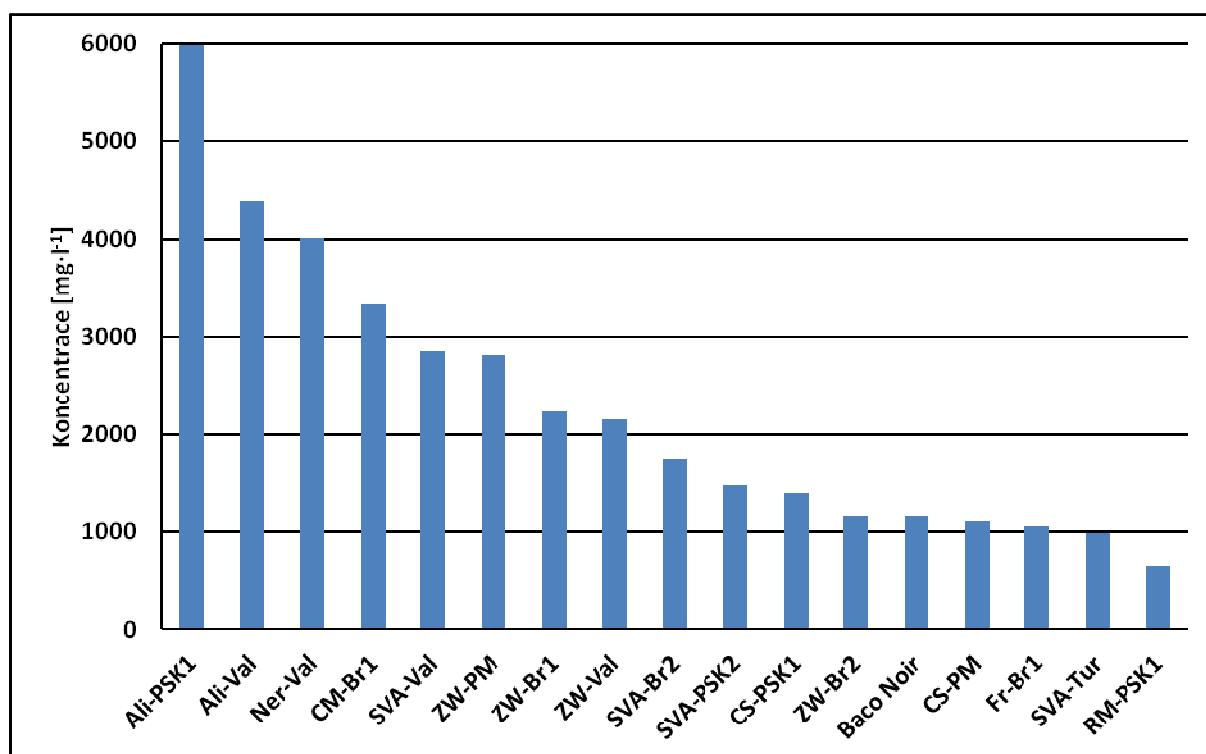
Graf 6: Srovnání obsahu anthokyanů u stejných modrých kultivarů sbíraných na odlišných viničních tratích stanovených pH-diferenciální metodou.

## 6.2.2 Metoda stanovení HPLC

Ke stanovení anthokyanů HPLC byl zvolen gradient č. 1 (Tab. 13.). Jelikož je malvidin-3-glukosid majoritní anthokyan ve všech odrůdách vinných hroznů s výjimkou Baco Noir, bylo metodou HPLC dosaženo obdobných výsledků, co se týče určení odrůdy s nejvyšším zastoupením anthokyanových barviv jako u pH-diferenciální. Naměřené hodnoty byly přepočítány na koncentraci anthokyanů v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  na standard malvidin-3,5-diglukosid. Tab.13 nabízí přehled koncentrace anthokyanů v odrůdách vinných hroznů od nejvyšší (Alibernet 5994,6  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) po nejnižší (Rulandské modré 657,4  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Alibernetu konkuruje odrůda Neronet, oba kultivary patří totiž mezi tzv. barvíčky. Svým obsahem anthokyanových barviv téměř dvojnásobně převyšují ostatní odrůdy (viz. graf 7).

Tab. 13: Koncentrace anthokyanů v modrých kultivarech vinných hroznů stanovených pomocí HPLC metod

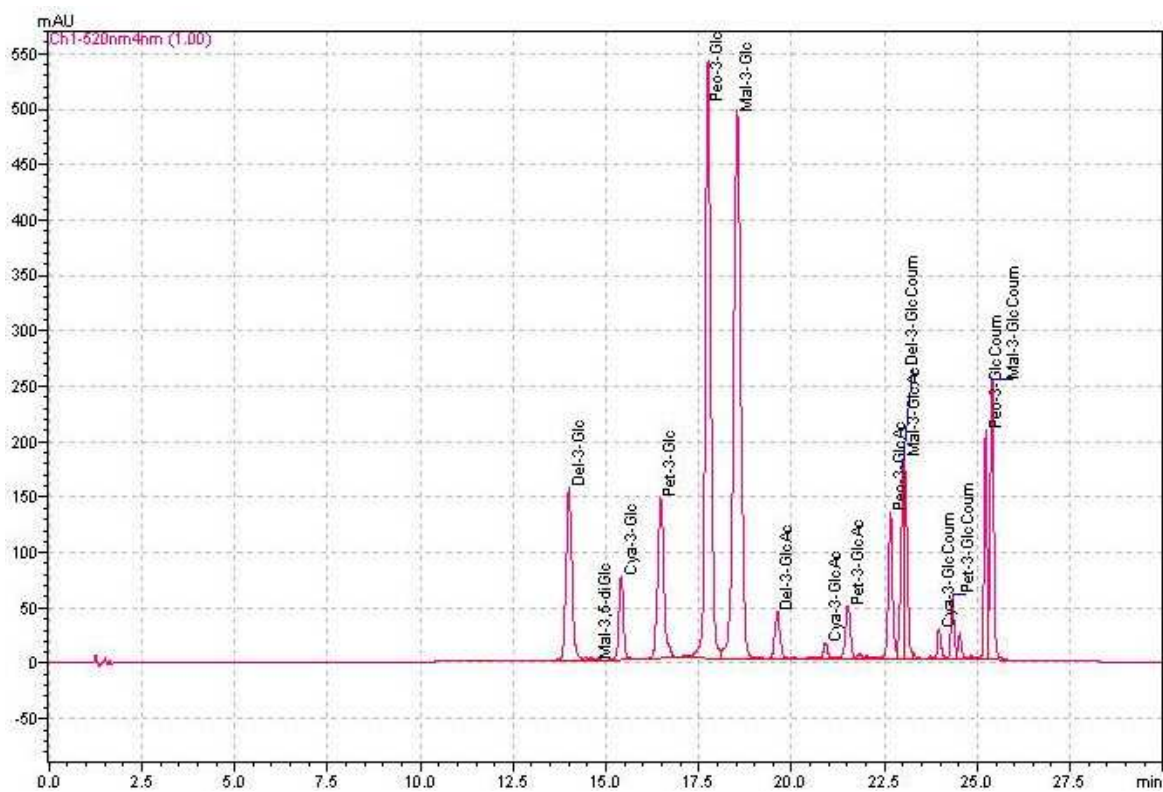
odrůda	Koncentrace [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
Ali-PSK1	5994,6
Ali-Val	4380,9
Ner-Val	4008,5
CM-Br1	3331,9
SVA-Val	2860,7
ZW-PM	2814,7
ZW-Br1	2227,3
ZW-Val	2151,5
SVA-Br2	1753,7
SVA-PSK2	1476,9
CS-PSK1	1399,2
ZW-Br2	1164,7
Baco Noir	1152,2
CS-PM	1101,6
Fr-Br1	1051,4
SVA-Tur	985,7
RM-PSK1	657,4



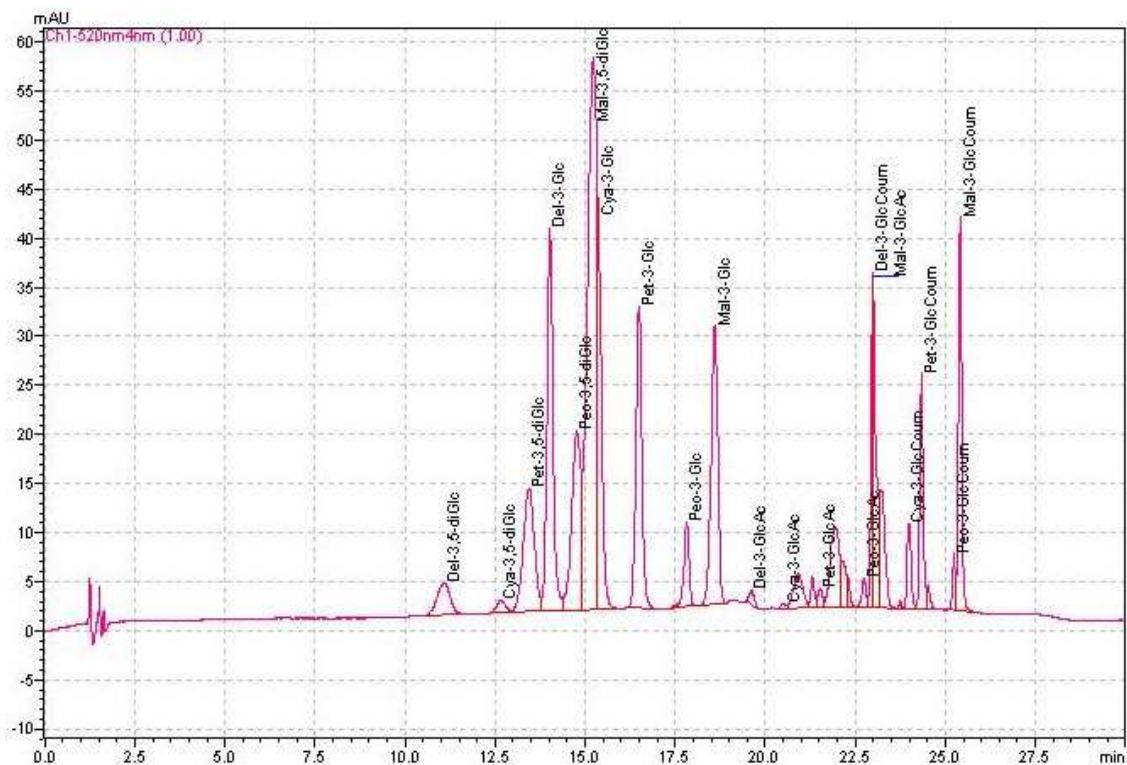
Graf 7: Koncentrace anthokyanů ve vzorcích modrých kultivarů stanovené metodou HPLC.

Na obrázku 31 a 32 jsou ukázky chromatogramů odrůd Alibernet a Baco Noir. Anthokyanová barviva jsou rozdělena na základní pigmenty malvidin-3-glukosid, delphinin-3-glukosid, kyanidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid. Určitou část anthokyanů tvoří také jejich acetylované a kumarované deriváty. V poměru majoritních anthokyanů tvoří výjimku odrůda Baco Noir. Vznikla křížením *Vitis vinifera* a *Vitis riparia*, přičemž *Vitis riparia* obsahuje jako majoritní anthokyan delphinin-3-glukosid. Chromatogramy ostatních odrůd jsou uvedeny v příloze 3.



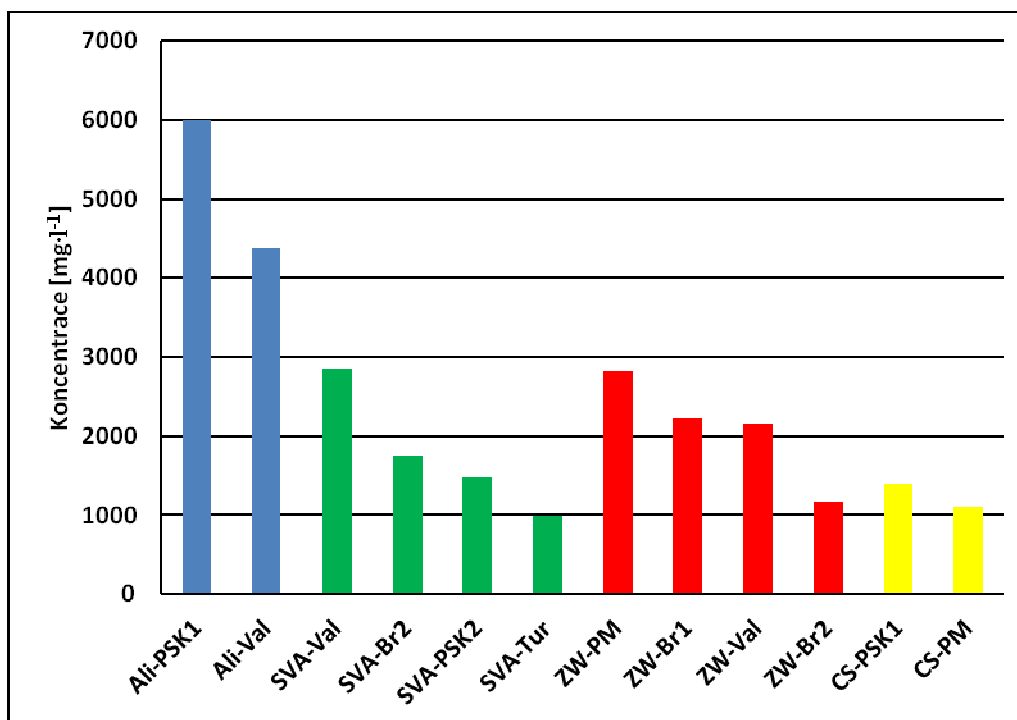


Obr. 31: Chromatogram odrůdy Alebernet (*Del-3-Glu* – delfinin-3-glukosid, *Mal-3,5-diGlu* – malvidin-3,5- diGlukosid, *Cya-3-Glu* – kyanidin-3-glukosid, *Pet-3-Glu* – Petunidin-3-glukosid, *Peo-3-Glu* – Peonidin-3-glukosid, *Mal-3-Glu* – malvidin-3-glukosid, *Del-3-Glu* – delfinin-3-glukosid, *Ac* – acetylované, *Coum* – kumarované)



Obr. 32: Chromatogram odrůdy Baco Noir (*Del-3-Glu* – delfinin-3-glukosid, *Mal-3,5-diGlu* – malvidin-3,5- diGlukosid, *Cya-3-Glu* – kyanidin-3-glukosid, *Pet-3-Glu* – Petunidin-3-glukosid, *Peo-3-Glu* – Peonidin-3-glukosid, *Mal-3-Glu* – malvidin-3-glukosid, *Del-3-Glu* – delfinin-3-glukosid, *Ac* – acetylované, *Coum* – kumarované)

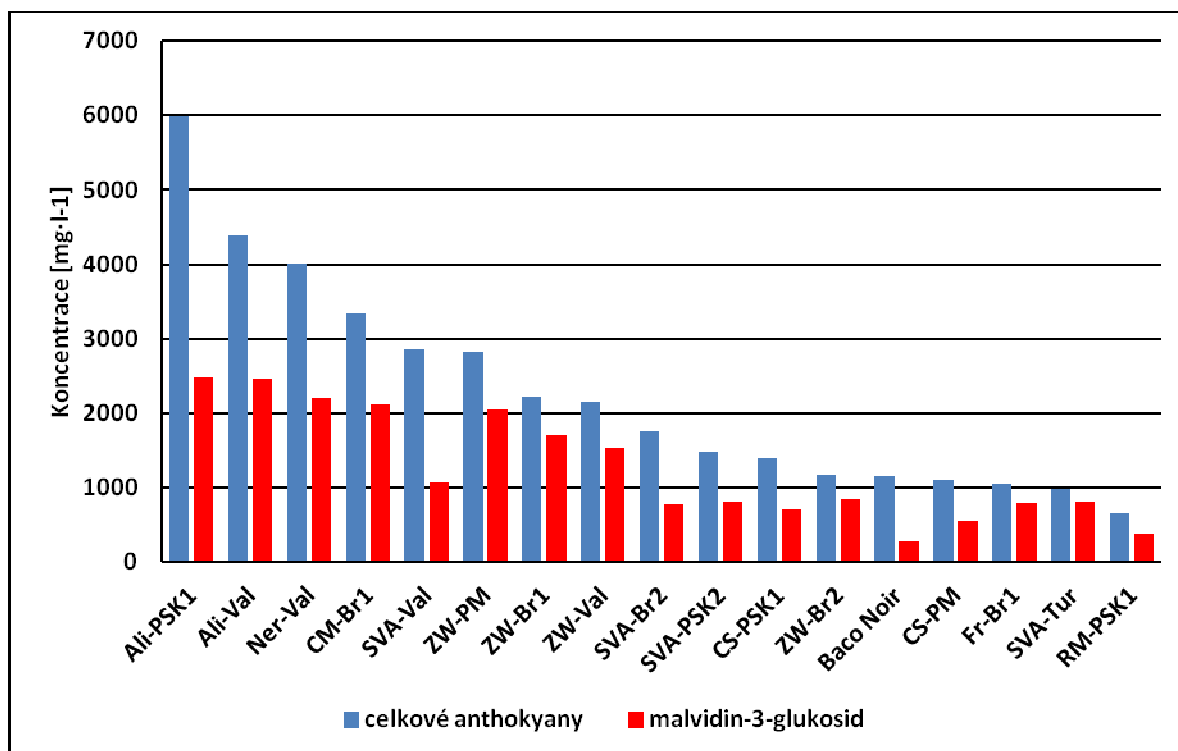
Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla určena jako nejlepší trať pro vysoký obsah anthokyanů v hroznech spíše jihovýchodní. Tento závěr naznačuje graf 8. Odrůdy Alibernet, Svatovavřínecké a Cabernet Sauvignon vykazují vyšší koncentrace barviv na tratích Valtická a Pod Sv. kopečkem 1, jež jsou jihovýchodní. Odrůda Zweigeltrebe z tratí Pod Martinkou a Brněnská 1, které jsou orientovány jihozápadně, převyšuje obsah anthokyanů z tratě Valtická.



Graf 8: Srovnání obsahu anthokyanů ve stejných odrůdách stanovených metodou HPLC

### 6.2.3 Srovnání obou metod

V následujícím grafu 9 je možné zhlédnout zastoupení majoritního anthokyanu malvidin-3-glukosidu v poměru k celkovému obsahu anthokyanů v hroznech. Procentuálně je v odrůdách zastoupen od 40 do 75 % mimo Bago Noir, u níž má převahu pigment delphinin-3-glukosid. Jelikož většina odrůd obsahuje malvidin-3-glukosid, jako majoritní anthokyan více než 50 %, výsledky obou metod se příliš nelišily. Rozdílné pořadí je viditelné pouze u odrůd Svatovavřínecké a Baco Noir, jelikož procentuální zastoupení malvidinu-3-glukosidu činí od 25 do 40 %.



Graf 9: Celková koncentrace anthokyanů a malvidin-3-glukosidu.

V případě k orientačnímu určení celkové koncentrace anthokyanů ve vzorcích modrých odrůd vinné révy je metoda pH-diferenciální zcela postačující. Metoda HPLC poskytuje přesné hodnoty koncentrace jak jednotlivých, tak celkových anthokyanů. U této metody je možné dobré porovnání zastoupení jednotlivých základních pigmentů mezi odrůdami.

## 7 ZÁVĚR

Teoretická část této diplomové práce obsahuje literární přehled vlastností a potravinářského využití plodů černého bezu (*Sambucus nigra*), hroznů vinné révy (*Vitis vinifera*). V této části práce je věnována pozornost přehledu charakteristických vlastností anthokyanových barviv obsažených v bezinkách a modrých odrůdách hroznů.

V bezinkách jsou obsaženy anthokyaniny odvozené pouze od kyanidinu: kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid, kyanidin-3-sambubiosid a kyanidin-3-glukosid. Modré hrozny obsahují základní deriváty 5 anthokyanidinů: malvidin-3-glukosid, delphinin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid a kyanidin-3-glukosid.

Teoretická část práce obsahuje dále literární rešerši metod stanovení anthokyanů v plodech černého bezu a v modrých hroznech. Důraz je kladen na metodu pH-diferenciální a dále pak na stanovení s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Cílem praktické části bylo porovnání obsahu anthokyanů v 15-ti odrůdách černého bezu v rámci projektu QH92223 s názvem Výzkum odrůd černého bezu pro využití v ovocnářské praxi. Dále byl stanoven celkový obsah anthokyanů v hroznech 9-ti modrých odrůd vinné révy. Současně byl studován vztah obsahu anthokyanů vzhledem k poloze trati, na níž jsou modré kultivary pěstovány.

Ke stanovení anthokyanů v černém bezu byla metoda pH-diferenciální pro stanovení obsahu celkových anthokyanů a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Vzorky černého bezu byly podrobeny analýze metodou pH-diferenciální a obsah anthokyanů přepočítán na majoritní anthokyan kyanidin-3-glukosid. Nejvíce anthokyanů bylo nalezeno v odrůdách Weistenphan, Sambo, Aurea, Heidegg nebo Riese aus Vossloch. Mezi odrůdy s nižším obsahem anthokyanů patří Sampo a Sambu. Metodou HPLC byl nejvyšší obsah anthokyanů stanoven v odrůdách Mammut, Samyl, Riese aus Vossloch a Haschberg. Nejnižší obsah vykazovaly odrůdy Sampo, Sambu a Aurea. Výsledky obou metod se příliš neshodovaly. Důvodem je to, že metoda pH-diferenciální přepočítává celkový obsah anthokyanů jen na jeden majoritní anthokyan kyanidin-3-glukosid. Ostatní anthokyaniny ovšem představují více než 50 % z celkového obsahu. Ty již nejsou do výpočtu zahrnuty. Metoda HPLC odhalila zastoupení anthokyanových pigmentů. Jsou jimi dva majoritní kyanidin-3-sambubiosid a kyanidin-3-glukosid. Mezi minoritní anthokyaniny byly přiřazeny kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid. Téměř ve všech odrůdách černého bezu byl objeven jako nejvíce zastoupený anthokyan kyanidin-3-sambubiosid. Pouze u odrůd Mammut a Haschberg byl nejvíce zastoupen kyanidin-3-glukosid. Speciální výjimku z odrůd černého bezu tvoří Aurea, která se pyšní hlavním anthokyanem kyanidin-3,5-diglukosidem. Závěrem lze říci, že pro pěstování černého bezu na území České republiky je z hlediska obsahu anthokyanů nejvýhodnější odrůda Mammut, Samyl, Riese aus Vossloch a Haschberg.

Metody pH-diferenciální a HPLC byly aplikovány také na vzorky modrých kultivarů vinné révy. Nejvyšší obsah anthokyanů byl pomocí pH-diferenciální metody nalezen v odrůdách Alibernet a Neronet, dále pak v odrůdě Svatovavřínecké. Nejméně anthokyanových pigmentů obsahují odrůdy Frankovka a Rulandské modré. Celkový obsah anthokyanů byl přepočítán na majoritní anthokyan malvidin-3-glukosid a detekován při vlnové délce 520 nm.

Jako nejvhodnější viniční trať pro produkci anthokyanových barviv byla v současném výzkumu vyhodnocena trať jižní až jihozápadní. Výzkum byl aplikován na odrůdy Svatovavřínecké, Zweigeltrebe, Alibernet a Cabernet Sauvignon. Pro zcela objektivní

rozhodnutí nejlepší tratě by však bylo potřeba více vzorků stejné odrůdy sbíraných na různých tratích.

Díky metodě HPLC byly anthokyany v hroznech separovány. Nalezené anthokyanové pigmenty byly malvidin-3-glukosid, delphinin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid, malvidin-3,5-diglukosid a acetylované a kumarované deriváty. Osm analyzovaných odrůd obsahuje jako majoritní anthokyan malvidin-3-glukosid. V jediné odrůdě Baco Noir byl nejvíce zastoupených anthokyanem delphinin-3-glukosid.

Také metoda HPLC potvrdila nejvyšší koncentrace anthokyanů v odrůdách Alibernet, Neronet a Svatovavřínecké. Nejmenší produkci barviv poskytují odrůdy Frankovka a Rulandské modré. Studie obsahu anthokyanů vzhledem k viniční trati, kde jsou odrůdy pěstovány, poukazuje oproti metodě předchozí na jižní až jihovýchodní orientaci, jako nejlepší pro výsadbu vinné révy. Tyto viniční tratě poskytují největší přísun slunečního záření, což má příznivý vliv na vyzrállost bobulí hroznů a tím i vysokou produkci anthokyanových pigmentů. Na zcela objektivní rozhodnutí o nejvhodnější trati by bylo třeba získat více vzorků stejných odrůd, sbíraných na tratích lišících se orientací výsadby. V případě porovnání použitých metod stanovení na vzorcích vinné révy bylo vyhodnocení spíše shodné, alespoň co do celkové koncentrace anthokyanů.

Závěrem lze poukázat na stanovení celkových anthokyanů metodou pH-diferenciální, jako na metodu zcela orientační. Pro přesné stanovení koncentrace anthokyanů a kvantifikaci jednotlivých barviv je lepší metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] STEVENS Michelle. Plant Guide for common elderberry *Sambucus nigra* L. ssp. *canadensis* (L.) [PDF dokument]. Baton Rouge (Los Angeles): National Plant Data Center. 2001 [cit. 2012-08-02]. Dostupný z: <[http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs\\_san1c4.pdf](http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_san1c4.pdf)>
- [2] Herbář Wendys. *Sambucus nigra*, Bez černý, baza čierna [online]. 2012 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: <<http://botanika.wendys.cz/kytky/K501.php>>
- [3] ZAJÍC Vladimír. *Bezy* [online]. 2012, poslední revize 2012-04-01 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: <<http://ekozahrady.com/index.htm>>
- [4] KADLÍKOVÁ Lenka. *Příroda.cz* [online]. 2004 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: <<http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=816>>
- [5] Naše kuchyně. *Černý bez, bezinky* [online] 2011 [cit. 2012-03-03]. Dostupné z: <<http://nasekuchyne.blogspot.com/2011/06/cerny-bez-bezinky.html>>
- [6] BROWN, D. The ABC clinical guide to Elderberry [PDF dokument]. The Journal of the American Botanical Council. 2004 [cit. 2012-03-04]. Dostupné z: <<http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/Elderberry-scr.pdf?docID=165>>
- [7] VULIC, Jelena, Ljubo VRACAR a Zdravko SUMIC. Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. *Acta periodica technologica*. 2008, č. 39, s. 85-90
- [8] FLORIAN C. STINTZING et al. *Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses*. Journal Elsevier, food chemistry. 2006, č. 94, s. 296 - 309.
- [9] KOCIÁN Petr. *Květena ČR* [online] 2003 [cit. 2012-03-04]. Dostupné z: <<http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=577>>
- [10] VYPLELOVÁ Hana. *Dary přírody* [online] 2012 [2012-03-04]. Dostupné z: <<http://www.daryprirody.cz/dychaci-cesty/sirup-cerny-bez>>
- [11] Online lékárna Marineta. *Leros Černý bez – květ* [online] 1995 [cit. 2012-03-04]. Dostupné z: <<http://www.manitera.cz/bylinne-caje/leros-caje/bylinne-caje/leros-cerny-bez-kvet-20x1g>>
- [12] Fany Gastroservis. *Jogurt Activia lesní plody* [online] 2006 [cit. 2012-03-04]. Dostupné z: <<http://www.fany.cz/cz/eshop/index.php?op=detailp&produkt=15-252&nazev=JOGURT-ACTIVIA-LESNI-PLODY-120g&sortiment=2.5>>
- [13] THOLE, Julie M. et al. A Comparative Evaluation of the Anticancer Properties of European and American Elderberry Fruits. *Journal of Medicinal Food*. 2007, roč. 4, č. 9, s. 498 - 504.
- [14] BADENES, Marisa Luisa. *Fruit breeding*. New York: Springer, 2011. ISBN 978-144-1907-622, 875 s.
- [15] KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 3. vyd. Praha: Brázda, 2010, 267 s. ISBN 978-80-209-0378-5.
- [16] TERRAL, J.-F., E. TABARD, L. BOUBY, S. IVORRA, T. PASTOR, I. FIGUEIRAL, S. PICQ, J.-B. CHEVANCE, C. JUNG, L. FABRE, C. TARDY, M. COMPAN, R. BACILIERI, T. LACOMBE a P. THIS. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*. 2010-02-22, roč. 105, č. 3, s. 443-455.

- [17] SKELTON, Stephen. *Viticulture: an introduction to commercial grape growing for those in the wine-trade, students taking the WSET Diploma and Master of Wine candidates*. London: Stephen Skelton, 2007, 263 s. ISBN 978-095-1470-329.
- [18] LAMAR Jim. *Viniculture and Grape Growing* [online] 2000, poslední revize 2011-09-24 [cit. 2012-0307]. Dostupné z: <<http://www.winepros.org/wine101/viniculture.htm>>
- [19] Tips on Grape Growing. *Essential minerals and soils for Growing Grapes* [online] 2012 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: <<http://tipsongrapegrowing.com/minerals-and-types-of-soils/>>
- [20] Naše výživa. *Hroznové víno (réva vinná)* [online] 2010 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: <<http://www.nasevyziva.cz/sekce-ovoce/clanek-hroznove-vino-reva-vinna-204.html>>
- [21] Kaktusy - jíky. *O révě vinné* [online] 2007, poslední revize 2011-06-30 [cit. 2012-03-08]. Dostupné z: <<http://kaktusy-jiky.ic.cz/foto-index.php?fid=495&gal=9>>
- [22] LEVE Jeff. *St. Laurent* [online] 2011 [cit. 2012-03-08]. Dostupné z: <<http://www.thewinecellarinsider.com/2011/10/st-laurent-austria%E2%80%99s-rare-red-wine-grape-treasure/>>
- [23] Wines of Germany. *Lemberger* [online] 2012 [cit. 2012-03-08]. Dostupné z: <<http://www.germanwineusa.com/german-wine-101/leberger.html>>
- [24] CHRISTENSEN, Pete. *Wine grape varieties of California*. Davis, CA: University of California Division of Agriculture and Natural Resources, 2004. 189 s. ISBN 18-799-0663-5.
- [25] BOWERS, John E. et al. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Journal Nature Genetics*. 1997, č. 16, s. 84 - 87.
- [26] Land of wine. *Alibernet* [online] 2011 [cit. 2012-03-08]. Dostupné z: <<http://www.landofwine.cz/201-alibernet>>
- [27] SOTOLÁŘ. Multimediální atlas podnožových, moštových a stolních odrůd révy [PDF dokument]. Lednice: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 2006 [cit. 2012-03-09]. Dostupný z: <[http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/556/ustav\\_556/atlas\\_reva/Atlas\\_reva\\_Adobe/historicke\\_mostove/baco\\_noir.pdf](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/556/ustav_556/atlas_reva/Atlas_reva_Adobe/historicke_mostove/baco_noir.pdf)>
- [28] Find The Best. *What is the history of Baco Noir wine* [online] 2012 [cit. 2012-03-09]. Dostupné z: <<http://wine-grape.findthebest.com/q/127/2226/What-is-the-history-of-Baco-Noir-wine>>
- [29] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [30] VIVAR-QUINTANA, A.M., C. SANTOS-BUELGA a J.C. RIVAS-GONZALO. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*. 2002, roč. 458, č. 1, s. 147-155.
- [31] DOWNEY, Mark O. et al. Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2006, roč. 3, č. 57, s. 258 - 267.
- [32] NUNAN, Kylie J. et al. Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. *Journal Plant Psychology*. 1998, č. 118, s. 783 - 792.
- [33] PROZIL S., EVTUGUIN D. Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Jurnal Elsevier*. 2012, roč. 35, s 179 184.



- [34] KIM, Mi-Yeon, Kunihisa IWAI, Akio ONODERA a Hajime MATSUE. Identification and Antiradical Properties of Anthocyanins in Fruits of *Viburnum dilatatum* Thunb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, roč. 51, č. 21, s. 6173-6177.
- [35] Miss Pepper. *Vínem ke zdraví* [online] 2011 [cit. 2012-03-10]. Dostupné z: <<http://www.miss-pepper.cz/03/vinem-ke-zdravi/>>
- [36] FIALA Petr. *Mošt vinný červený* [online] 2012 [cit. 2012-03-10]. Dostupné z: <<http://www.bioviolka.cz/most-vinny-cerveny-200ml-vaalkova>>
- [37] Vom Fass. Olej z hroznových jader [online] 2008 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <<http://www.vomfass.cz/produkty/oleje/seminkove-oleje/z-hroznovych-jader/>>
- [38] Přírodní léčiva. *Hroznový olej lisovaný za studena* [online] 2005 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <<http://ostatni.prirodni-leciva.cz/hroznovy-olej-lisovany-za-studena-187ml/d-44324/>>
- [39] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [40] FENNEMA, Owen R. *Food chemistry*. 3rd Ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996, 1069 s. ISBN 08-247-9691-8.
- [41] Oulu University Library. *Flavonoid biosynthetic pathway* [online] 2003 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: <<http://herkules oulu.fi/isbn9514271599/html/x155.html>>
- [42] CONN, Simon. Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture . *Biotechnology Letters*. roč. 25, č. 11, s. 835-839.
- [43] VOSTRÝ Miroslav. *E163 – Anthokyany* [online] 2010 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: <<http://ostatni.prirodni-leciva.cz/hroznovy-olej-lisovany-za-studena-187ml/d-44324/>>
- [44] ANTAL, Diana-Simona et al. The anthokyans: Biologically-active substances of food and pharmaceutical interest. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati*. 2003, s. 1 - 10.
- [45] LILA, Mary Ann. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004, č. 2004:5 s. 306 – 313.
- [46] KONCZAK, Izabela; ZHANG, Wei. Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2004, s. 239 – 240.
- [47] MAZZA Giuseppe. Anthocyanins and heart health. *Journal World of Food Science*. 2007, roč. 43, č. 4, s. 369 – 374.
- [48] GIUSTI, M. Mónica; WROLSTAD, Ronald E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, s. 1 – 13.
- [49] CHRISTIAN, Gary D. *Analytical chemistry*. 5th ed. New York: John Wiley and Sons, 1994, 812 s. ISBN 04-713-0582-0.
- [50] Oficiální výukové stránky fakulty chemické v Brně <http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom.pdf>
- [51] WROLSTAD, Ronald E., Robert W. DURST a Jungmin LEE. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science*. 2005, roč. 16, č. 9, s. 423-428
- [52] Polymer. *Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC)* [online]. 2012 [cit. 2012-02-26]. Dostupné z WWW: <[http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx\\_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf](http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf)>.

- [53] Cromatografické metody. Kapalinová chromatografie [PPT dokument] 2012 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: <<http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/bam/07.ppt>>
- [54] BARKOVICH Matthew. *High performance liquid chromatography* [online] 2010 [cit. 2012-03-13]. Dostupné z: <[http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/High\\_performance\\_liquid\\_chromatography](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_performance_liquid_chromatography)>
- [55] DOUŠA michal. *High Performance liquid chromatography* [online] 2001, poslední revize 2011-01-24 [cit. 2012-03-13]. Dostupné z: <<http://www.hplc.cz/>>
- [56] SKOOG, Douglas A. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed. Fort Worth: Harcourt Brace College Publishers, 1992, 700 s. ISBN 00-307-5398-8.
- [57] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [58] Separační metody. *Separační metody v analytické chemii* [online] 2012 [cit. 2012-03-13]. Dostupné z: <[http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separa.htm](http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm)>
- [59] BOSÁKOVÁ. *Separace* [online] 2012 [cit. 2012-03-18]. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/separace.pdf>>
- [60] BRØNNUM-HANSEN, KIRSTEN, F. JACOBSEN a J. M. FLINK. Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). 1. Process considerations for production of the liquid extract. *International Journal of Food Science*. 1985, roč. 20, č. 6, s. 703-711.
- [61] FIORINI, M. et al. A Preparative High-performance Liquid-chromatography for the Purification of Natural Anthocyanins. *Journal of Chromatography*. 1995, s. 213 - 219.
- [62] UNAMI, Osamu et al. Stability of Anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 1996, č. 44, s. 3090 – 3096.
- [63] DVOŘÁKOVÁ, Markéta a kol. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladínách, mladínách a pivech. *Časopis Kvasný průmysl*. 2006, roč. 52/2006, č. 4, s. 111 - 114.
- [64] KAACK, K. a T. AUSTED. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing *Journal Plants foods for Human nutrition* roč. 52, č. 3, s. 187-198
- [65] MURKOVIC, M et al. Analysis of Anthocyanins in Plasma for Determination of their Bioavailability *Journal of food composition and analysis: an official publication of the United Nations University*, International Network of Food Data Systems. 2000, č. 13, s. 291 – 296. ISSN 0889-1575.
- [66] CHANDRA, Amitabh et al. Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal Agric. Food Chem*. 2001, roč. 49, č. 8, s. 3515 - 3522.
- [67] KIM, Mi-Yeon, Kunihisa IWAI, Akio ONODERA a Hajime MATSUE. Identification and Antiradical Properties of Anthocyanins in Fruits of *Viburnum dilatatum* Thunb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, roč. 51, č. 21, s. 6173-6177
- [68] BOWERS, John E. a Carole P. MEREDITH. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics*. 1997, roč. 16, č. 1, s. 84-87

- [69] STINTZING, Florian C. et. al. Characterisation of anthocyanin betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Journal Elsevier*. 2006, č. 94, s. 296 - 309.
- [70] VALLS, Josep, Silvia MILLÁN, M. Pilar MARTÍ, Eva BORRÀS a Lluís AROLA. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*. 2009, roč. 1216, č. 43, s. 7143-7172
- [71] MATTIVI, F. et. al. *Vitis vinifera* - a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. *Web of Science*. 1990, s. 119 - 133.
- [72] GUIDONI, S. et. al. The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enology and Viticulture*. 1997, s. 438 - 442.
- [73] BROUILLARD, R., S. CHASSAING a A. FOUGEROUSSE. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?. *Phytochemistry*. 2003, roč. 64, č. 7, s. 1179-1186
- [74] RITI, Marcello. et. al. Benzothiadiazole Enhances Resveratrol and Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine, Meanwhile Improving Resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2004, č. 52, s. 4406 - 4413.
- [75] FOURNAND, David, Anysia VICENS, Louise SIDHOUM, Jean-Marc SOUQUET, Michel MOUTOUNET a Veronique CHEYNIER. Accumulation and Extractability of Grape Skin Tannins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, roč. 54, č. 19, s. 7331-7338.
- [76] KOZINA, Bernard et. al. Effect of Grapevine Solarization on the Anthocyanins Composition of Pinot Noir wines. *Croatian scientific bibliography*. 2008, s. 47 - 50.
- [77] SCHNEIDER, Ernst, Holger VON DER HEYDT a Anke ESPERESTER. Evaluation of Polyphenol Composition in Red Leaves from Different Varieties of *Vitis vinifera*. *Journal Thieme*. 2008, s. 565 - 572.
- [78] PEPRNÁ Tereza.: Anthocyanová barviva ve vybraném ovoci. Brno, 2011. 75 s., 7 s. příloh. Diplomová práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLU

4CL	(4-coumaroyl-CoA-ligase) - 4-kumaroyl-CoA-ligáza
Ac	(acetylated derivatives) acetylované deriváty
Ali-Br1	Alibernet – trať Brněnská 1
Ali-Val	Alibernet – trať Valtická
ANS	(anthocyanidinsynthase) - anthokyanidinsyntáza
C4H	(cinnamate-4-hydroxylase) - cinamát-4-hydroxyláza
CHI	(chalconisomerase) – chalkonizomeráza
CHS	(chalconsynthase) – chalkonsyntáza
CM-Br1	Cabernet Moravia – trať Brněnská 1
Coum	(coumaric) – kumarované
CS-PM	Cabernet Sauvignon – trať Pod Martinkou
CS-PSK1	Cabernet Sauvignon – trať Pod Sv. kopečkem 1
Cya-3,5-diGlu	(cyanidin-3,5-diglucoside) – kyanidin-3,5-diglukosid
Cya-3-Glu (CG)	(cyanidin-3-glucoside) – kyanidin-3-glukosid
Cya-3-Sam (CS)	(cyanidin-3-sambubioside) – kyanidin-3-sambubiosid
Cya-3-Sam-5-Glu	(cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside) – kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid
CZE	(capillary zone electrophoresis) – kapilární zónová elektroforéza
ČR	Česká republika
Del-3-Glu	(delphinin-3-glucoside) – delfinin-3-glukosid
DFR	(dihydroflavanone-4-reductase) – dihydroflavanon-4-reduktáza
DNA	(deoxyribonucleic acid) – deoxyribonukleová kyselina
ES	(electrospray) – elektrosprej
F3H	(flavanone-3-hydroxylase) – flavanon-3-hydroxyláza
Fr-Br1	Frankkovka – trať Brněnská 1
HPLC	(high performance liquid chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	(ion-exchange chromatography) – iontově výměnná chromatografie
LC	(liquid chromatography) – kapalinová chromatografie
LDL	(low-density lipoprotein) - nízkodenzitní lipoprotein
LLC	(liquid-liquid chromatography) – kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	(liquid-solid chromatography) – kapalinová absorpční chromatografie
Mal-3,5-diGlu	(malvidin-3,5-diglucosid) – malvidin-3,5-diglukosid
Mal-3-Glu	(malvidin-3-glucoside) – malvidin-3-glukosid
MS	(mass spectrometry) – hmotnostní spektrometrie
MZLU	Mendelova zemědělsko-lesnická univerzita
Ner-Val	Neronet – trať Valtická
NMR	(nuclear magnetic resonance) – nukleární magnetická rezonance
PAL	(phenylalanineamoniomlyase) – fenylalaninamoniomlyáza
Peo-3-Glu	(peonidin-3-glucoside) – peonidin-3-glukosid
Pet-3-Glu	(petunidin-3-glucoside) – petunidin-3-glukosid
RM-PSK1	Rulandské modré – trať Pod Sv. kopečkem

RP-HPLC	(Reverse phase-high performance chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází
SR	Slovenská republika
SVA-Br2	Svatovavřínecké – trať Brněnská 2
SVA-PSK2	Svatovavřínecké – trať Pod Sv. kopečkem 2
SVA-Tur	Svatovavřínecké – trať Turoid
SVA-Val	Svatovavřínecké – trať Valtická
UFGT	(UDP-glucose-flavanoid-3- <i>O</i> -glucosyltransferase) – UDP-glukóza-flavanoid-3- <i>O</i> -glukosyltransferáza
USA	(United states America) – spojené státy Americké
UV-VIS	(ultraviolet-visible light) – ultrafialové-viditelné světlo
ZW-Br1	Zweigeltrebe – trať Brněnská 1
ZW-Br2	Zweigeltrebe – trať Brněnská 2
ZW-PM	Zweigeltrebe – trať Pod Martinkou
ZW-Val	Zweigeltrebe – trať Valtická

## 10 SEZNAM PŘÍLOH

### *Příloha 1. Tabulky*

Tabulka 1: Tabulka rozpouštědel mobilní fáze pro HPLC

### *Příloha 2. Fotografie*

Fotografie 1: HPLC Spectra SYSTÉM

Fotografie 2: UV-VIS spektrofotometr Helios

### *Příloha 3. Obrázky chromatogramů*

Obr. 33: Chromatogram odrůdy Cabernet Moravia

Obr. 34: Chromatogram odrůdy Cabernet Sauvignon

Obr. 35: Chromatogram odrůdy Frankovka

Obr. 36: Chromatogram odrůdy Neronet

Obr. 37: Chromatogram odrůdy Rulandské modré

Obr. 38: Chromatogram odrůdy Svatovavřinecké

# 11 PŘÍLOHY

## Příloha 1 Tabulky

Tab. 14: Rozpouštědla mobilní fáze pro HPLC

Rozpouštědlo	Absorpční hrana <sup>2</sup> (nm)	Index lomu	Teplota varu (°C)	Viskozita (mPa s, 25 °C)	Parametr polarity P'	Eluční síla ε <sup>3</sup> (alumina)
pentan	190	1,358	36	0,22	0,1	0,01
hexan	190	1,372	69	0,30	0,1	0,01
isooktan	197	1,389	99	0,47	0,1	0,01
diisopropylether	220	1,368	67,8	0,37	2,2	0,29
butanol	207	1,400	117	2,64	3,9	0,26
benzen	278	1,501	81	0,65	2,7	0,32
methyl terc. butylether	210	1,369	56	0,27	2,5	0,35
diethylether	202	1,353	35	0,23	2,9	0,38
chloroform	245	1,443	61	0,53	4,1	0,40
dichlormethan	233	1,421	40	0,41	3,1	0,42
dioxan	215	1,420	101	1,18	4,8	0,56
aceton	330	1,356	56	0,31	5,1	0,56
ethylacetát	256	1,370	77	0,43	4,4	0,58
acetonitril	190	1,341	82	0,34	5,8	0,65
propanol	240	1,385	97	1,94	4,0	0,82
tetrahydrofuran	212	1,405	66	0,46	4,0	0,82
ethanol	210	1,359	78	1,08	4,3	0,88
methanol	205	1,326	65	0,54	5,1	0,95
octová kyselina	230	1,370	118	1,06	6,0	vysoká
voda	180	1,333	100	0,89	10,2	vysoká

<sup>1</sup> Eluotropní řada je definována pro chromatografii s normálními fázemi – alumina jako stacionární fáze.

<sup>2</sup> Absorpční hrana je definována jako vlnová délka, při které rozpouštědlo způsobuje absorpenci rovnou jedné v optické dráze rovné 1 cm.

## Příloha 2 Fotografie



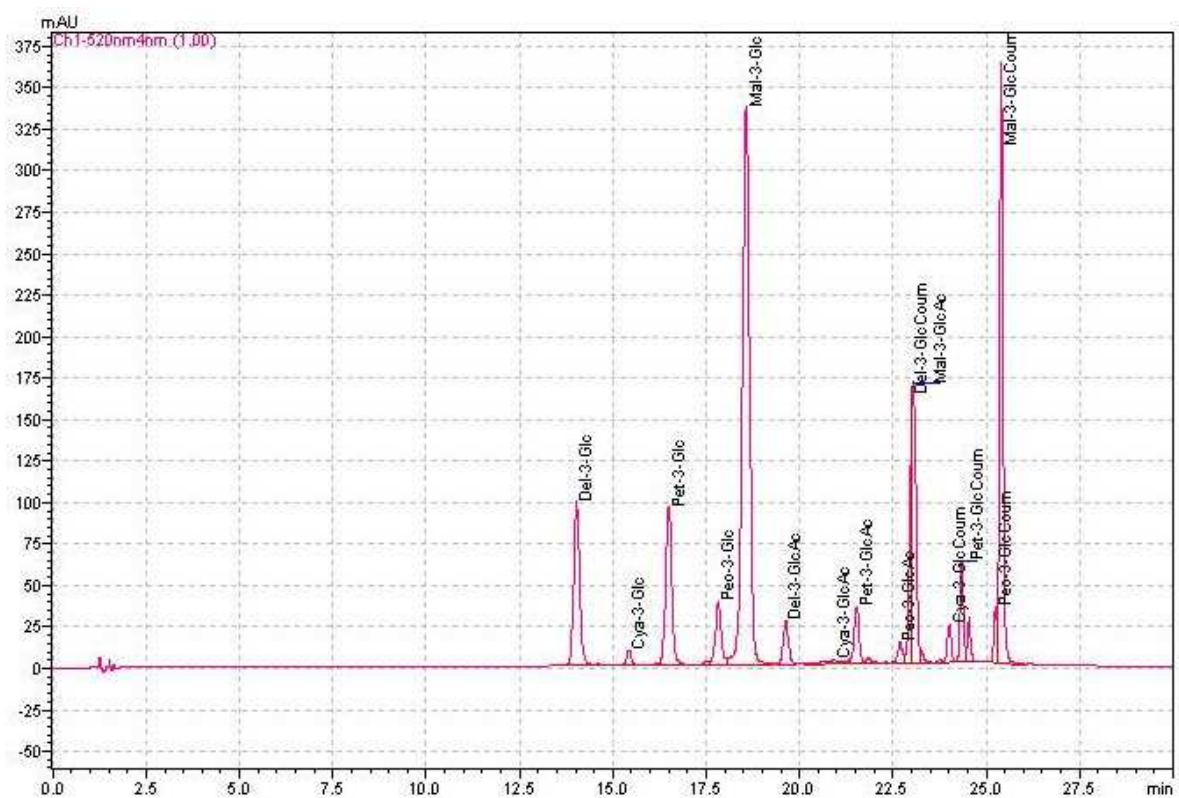
Fotografie 1: HPLC Spectra SYSTÉM



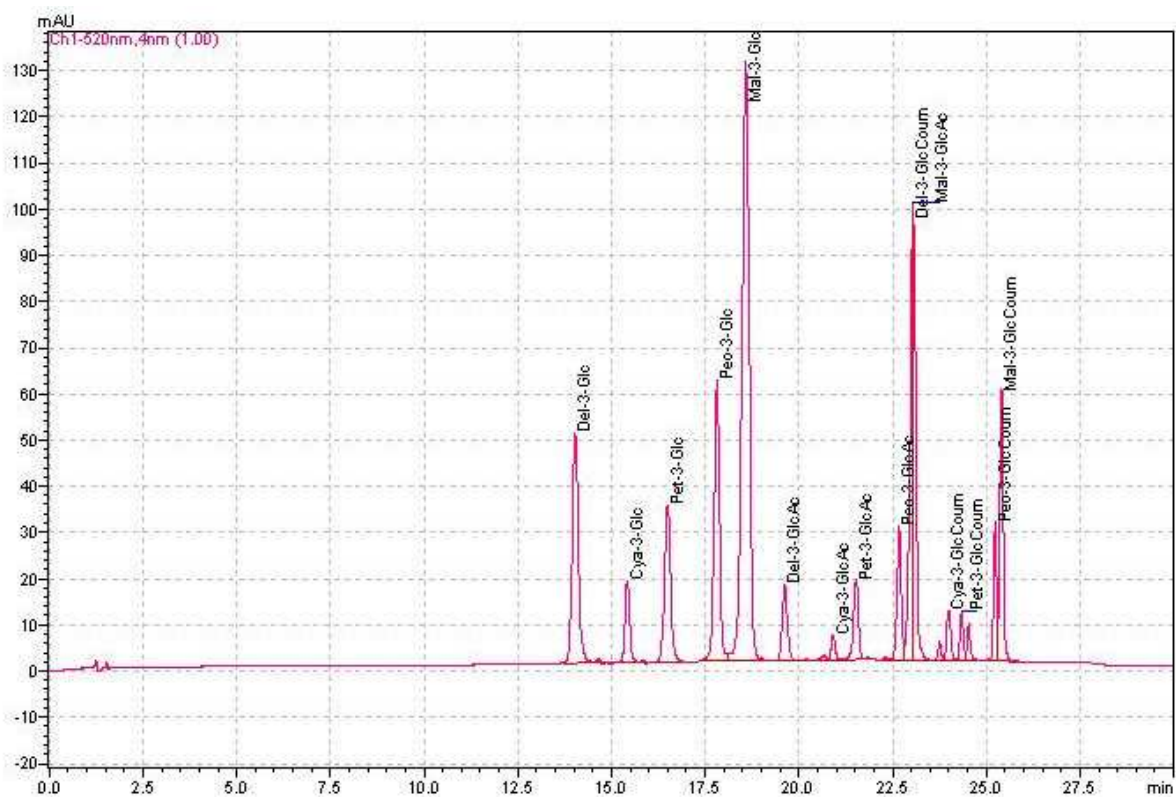
Fotografie 2: UV-VIS spektrofotometr Helios



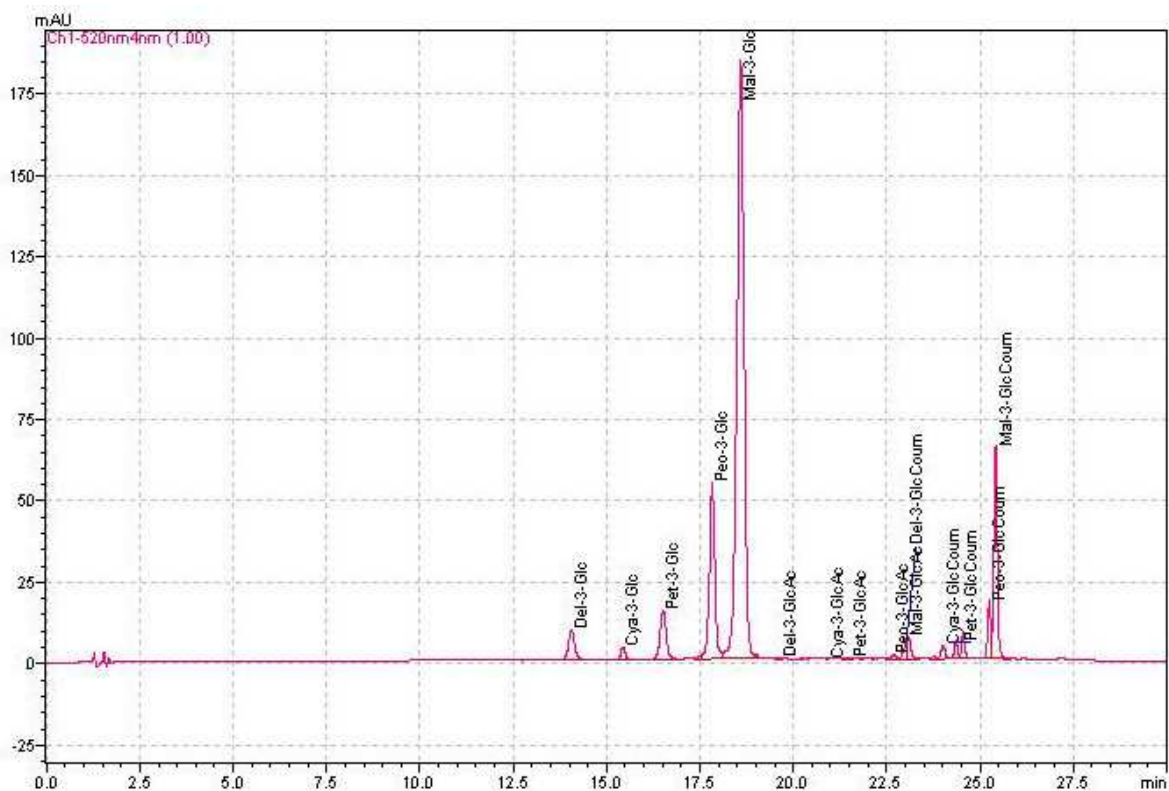
### Příloha 3 Obrázky chromatogramů



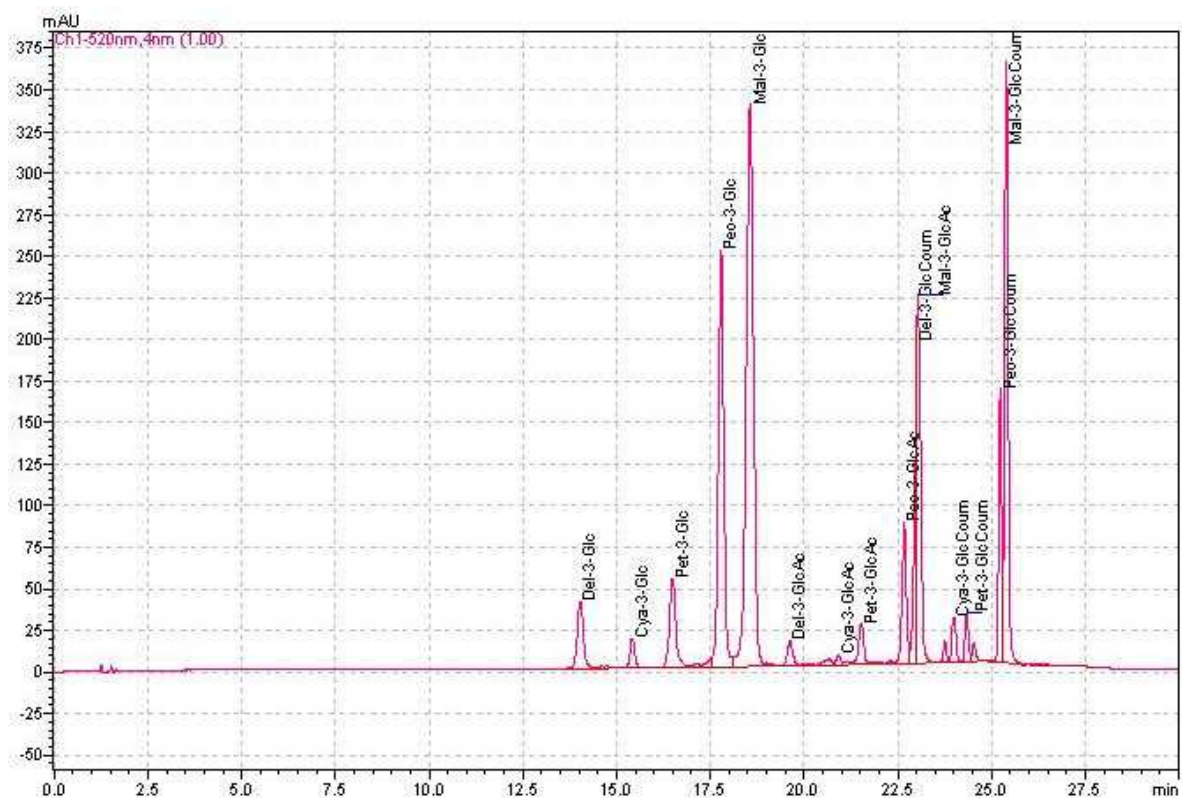
Obr. 33: Chromatogram odrůdy Cabernet Moravia (Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Mal-3,5-diGlu – malvidin-3,5- diGlukosid, Cya-3-Glu – kyanidin-3-glukosid, Pet-3-Glu – Petunidin-3-glukosid, Peo-3-Glu – Peonidin-3-glukosid, Mal-3-Glu – malvidin-3-glukosid, Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Ac – acetylované, Coum – kumarované)



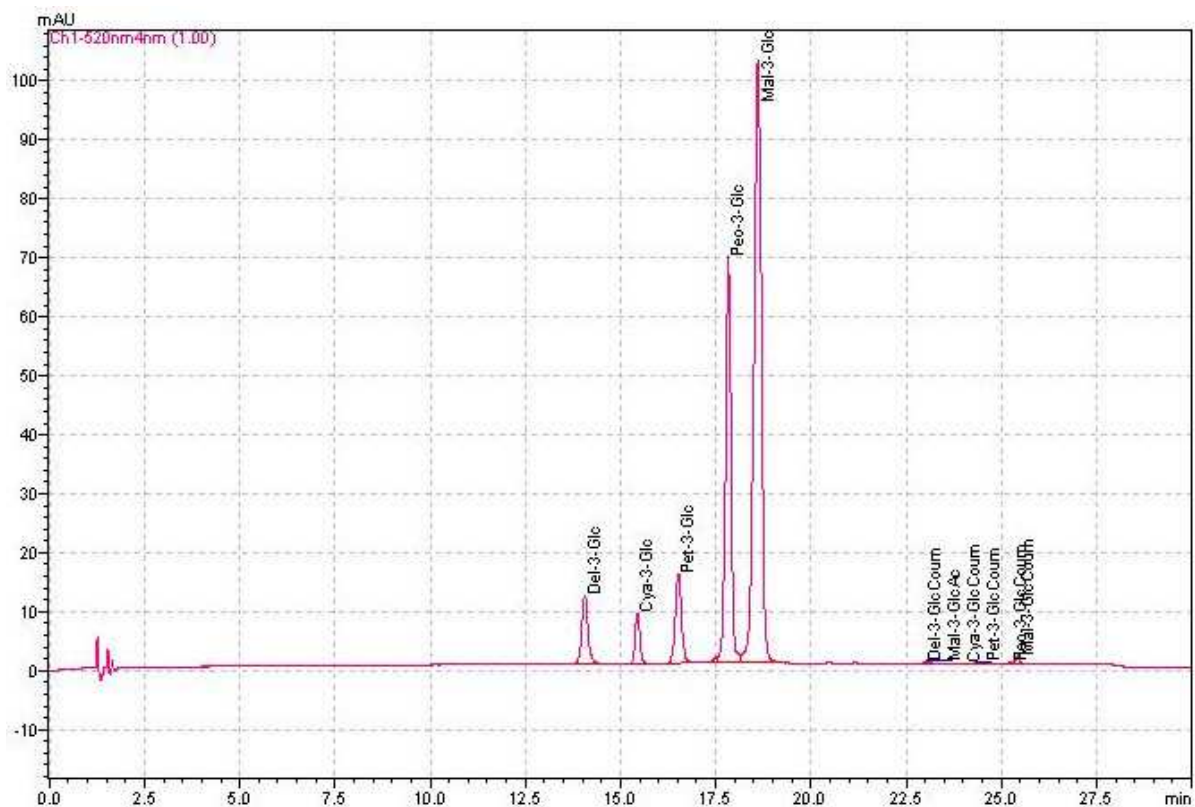
Obr. 34: Chromatogram odrůdy Cabernet Sauvignon (Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Mal-3,5-diGlu – malvidin-3,5- diGlukosid, Cya-3-Glu – kyanidin-3-glukosid, Pet-3-Glu – Petunidin-3-glukosid, Peo-3-Glu – Peonidin-3-glukosid, Mal-3-Glu – malvidin-3-glukosid, Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Ac – acetylované, Coum – kumarované)



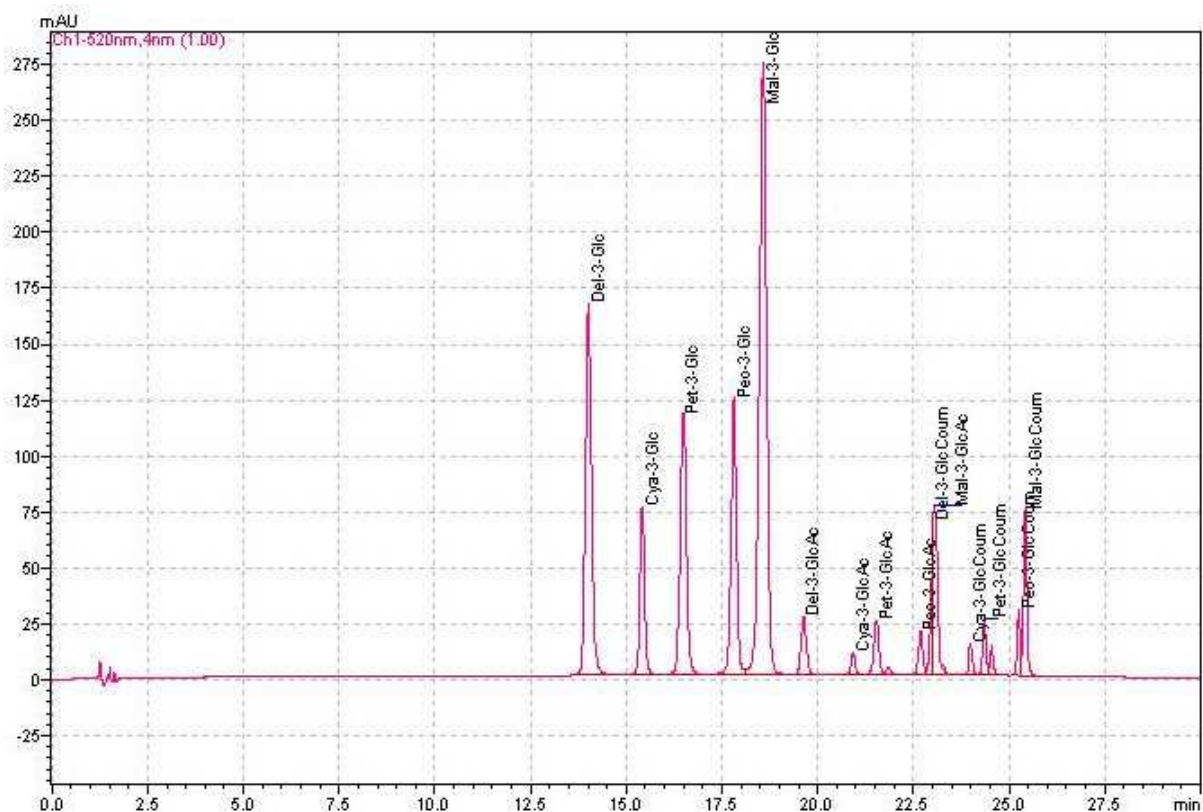
Obr. 35: Chromatogram odrůdy Frankovka (Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Mal-3,5-diGlu – malvidin-3,5- diGlukosid, Cya-3-Glu – kyanidin-3-glukosid, Pet-3-Glu – Petunidin-3-glukosid, Peo-3-Glu – Peonidin-3-glukosid, Mal-3-Glu – malvidin-3-glukosid, Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Ac – acetylované, Coum – kumarované)



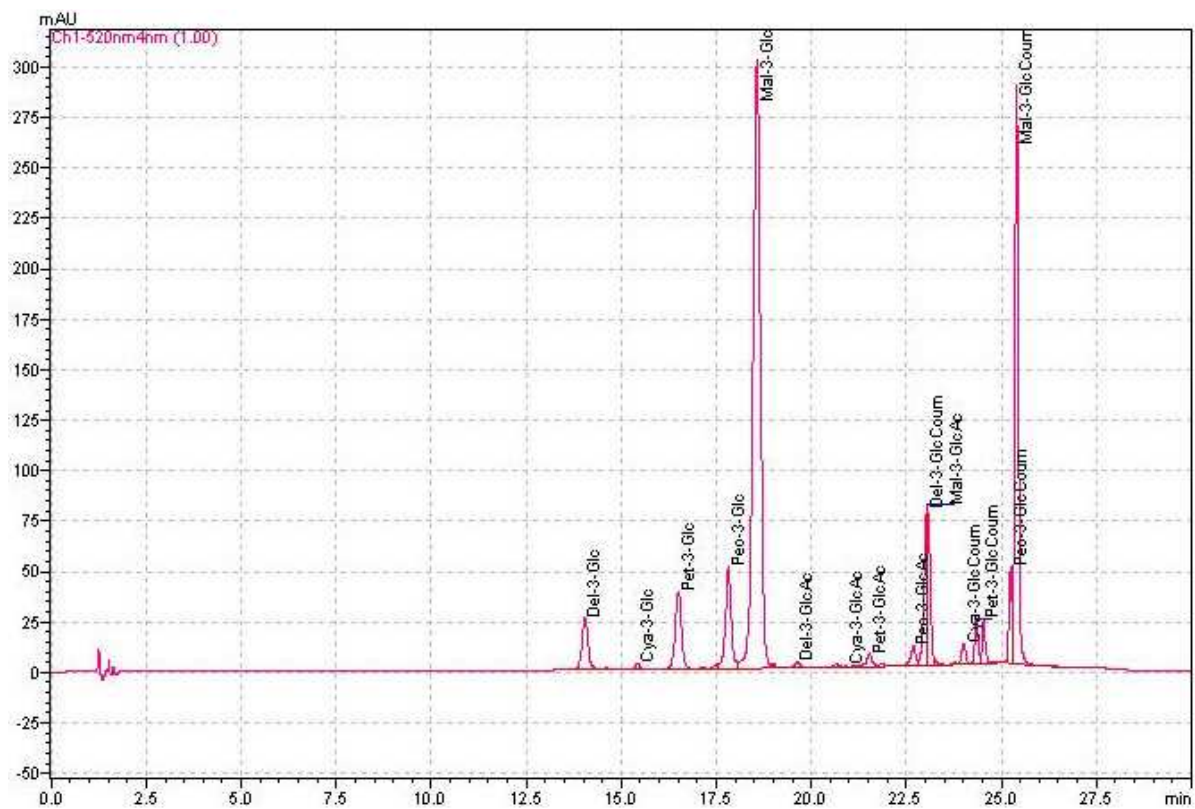
Obr. 36: Chromatogram odrůdy Neronec (*Del-3-Glu* – delfinin-3-glukosid, *Mal-3,5-diGlu* – malvidin-3,5- diGlukosid, *Cya-3-Glu* – kyanidin-3-glukosid, *Pet-3-Glu* – Petunidin-3-glukosid, *Peo-3-Glu* – Peonidin-3-glukosid, *Mal-3-Glu* – malvidin-3-glukosid, *Del-3-Glu* – delfinin-3-glukosid, *Ac* – acetylované, *Coup* – kumarované)



Obr. 37: Chromatogram odrůdy Rulandské modré (Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Mal-3,5-diGlu – malvidin-3,5- diGlukosid, Cya-3-Glu – kyanidin-3-glukosid, Pet-3-Glu – Petunidin-3-glukosid, Peo-3-Glu – Peonidin-3-glukosid, Mal-3-Glu – malvidin-3-glukosid, Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Ac – acetylované, Coum – kumarované)



Obr. 38: Chromatogram odrůdy Svatovavřinecké (Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Mal-3,5-diGlu – malvidin-3,5- diGlukosid, Cya-3-Glu – kyanidin-3-glukosid, Pet-3-Glu – Petunidin-3-glukosid, Peo-3-Glu – Peonidin-3-glukosid, Mal-3-Glu – malvidin-3-glukosid, Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Ac – acetylované, Coum – kumarované)



Obr. 39: Chromatogram odrůdy Zweigeltrebe (Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Mal-3,5-diGlu – malvidin-3,5- diGlukosid, Cya-3-Glu – kyanidin-3-glukosid, Pet-3-Glu – Petunidin-3-glukosid, Peo-3-Glu – Peonidin-3-glukosid, Mal-3-Glu – malvidin-3-glukosid, Del-3-Glu – delfinin-3-glukosid, Ac – acetylované, Coum – kumarované)