

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie**

## STUDIUM ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY VÍNA

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Autor:** Vladimíra Kubištová, Bc.  
**Studijní program:** N1407 – Chemie  
**Studijní obor:** Analytická chemie  
**Vedoucí práce:** Ing. David Milde, PhD.

Olomouc 2012

## **SOUHRN**

Cílem této studie bylo posoudit vliv jednotlivých enologických postupů na celkovou antioxidační aktivitu (TAA) a celkový obsah fenolů (TPC) přítomných ve víně. Ke stanovení celkové antioxidační aktivity tří různých druhů vín (červené, rosé a bílé víno) během jejich výroby, bylo využito dvou rozdílných spektrálních metod: DPPH a FRAP. Ke stanovení obsahu celkových polyfenolů pak bylo využito velmi jednoduché spektrální metody založené na měření absorbance adekvátně naředěného vzorku vína při 280 nm. Pro jednotlivé metody byla provedena optimalizace podmínek měření a stanovena přesnost metody. V závěru práce byla provedena korelační analýza.

## **SUMMARY**

The aim of the present study was to evaluate the influence of different enological practises on the total antioxidant activity (TAA) and total phenolic content (TPC) present in wine. Two different spectral methods: DPPH and FRAP were used to determine the total antioxidant activity of three different kinds of wines (red, rose and white wine) during their production process. The total phenolic content was determined by a simple spectral method based on measurements of absorbance appropriately diluted wine samples at 280 nm. Subsequently, after the measuring conditions were optimized, the precision of each method was determined. The correlation analysis was performed at the end of this work.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Všechny literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou v seznamu literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v Knihovně katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Vladimíra Kubištová

## **Poděkování**

Touto cestou bych velice ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce panu Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za vedení a podnětné připomínky při tvorbě této práce, panu Ing. Janu Stávkovi, Ph.D. za poskytnuté vzorky vína a pomoc při vyhodnocení naměřených dat a dále také Mgr. Janě Hrušíkové za spolupráci při stanovení obsahu celkových fenolů.

Mé největší díky však patří mé mamince, mému příteli Tomášovi a kamarádům, bez jejichž podpory a pochopení by tato práce jistě nevznikla.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Volné radikály .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku.....	10
2.1.1.1 Nejdůležitější reaktivní formy kyslíku .....	11
2.1.1.2 Nejdůležitější reaktivní formy dusíku .....	14
2.1.2 Vznik reaktivních forem kyslíku a dusíku v organismu .....	15
<b>2.2 Antioxidanty .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Dělení antioxidantů.....	16
2.2.2 Přírodní antioxidanty .....	18
2.2.3 Přírodní polyfenolické sloučeniny .....	19
2.2.3.1 Základní strukturní typy přírodních polyfenolických sloučenin .....	19
2.2.3.2 Antioxidační účinky přírodních polyfenolických sloučenin.....	21
<b>2.3 Víno jako zdroj přírodních polyfenolických sloučenin.....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Polyfenolické sloučeniny vína .....	23
2.3.1.1 Neflavonoidní sloučeniny vína .....	24
2.3.1.2 Flavonoidní sloučeniny vína.....	25
2.3.2 Metody stanovení obsahu celkových fenolických sloučenin.....	26
<b>2.4 Antioxidační aktivita a její stanovení.....</b>	<b>28</b>
2.4.1 Metody stanovení antioxidační aktivity.....	28
2.4.1.1 Metody hodnotící eliminaci radikálů.....	29
2.4.1.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek .....	31
2.4.2 Konkrétní případy stanovení TAA a TPC ve vínech.....	32

<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Analyzované vzorky, použité chemikálie a přístrojová vybavení.....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Analyzované vzorky .....	35
3.1.2 Použité chemikálie.....	37
3.1.3 Přístrojová vybavení a laboratorní pomůcky .....	38
<b>3.2 Přípravy roztoků a úprava vzorků .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Příprava roztoků.....	39
3.2.1.1 Přípravy roztoků pro metodu DPPH.....	39
3.2.1.2 Přípravy roztoků pro metodu FRAP.....	39
3.2.1.3 Přípravy roztoků pro stanovení celkových fenolů (TPC).....	40
3.2.2 Úprava vzorků .....	40
<b>3.3 Pracovní postupy .....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Optimalizace kalibračních závislostí .....	41
3.3.1.1 Kalibrační závislosti použité při metodě DPPH.....	41
3.3.1.2 Kalibrační závislosti použité při metodě FRAP .....	42
3.3.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity (TAA) reálných vzorků vín ....	42
3.3.2.1 Pracovní postup metody DPPH .....	42
3.3.2.2 Pracovní postup metody FRAP .....	43
3.3.3 Stanovení obsahu celkových fenolů (TPC) .....	43
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Optimalizace podmínek měření .....</b>	<b>44</b>
4.1.1 Kalibrační závislosti .....	44
4.1.2 Optimalizace doby inkubace pro metodu DPPH.....	46
4.1.3 Vliv centrifugace na hodnotu TAA .....	47
4.1.4 Opakovatelnost metody DPPH, FRAP a metody stanovení TPC.....	47

<b>4.2</b>	<b>Souhrn naměřených výsledků .....</b>	<b>49</b>
4.2.1	Stanovení antioxidační aktivity a obsahu celkových fenolů.....	49
<b>4.3</b>	<b>Porovnání metod .....</b>	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>66</b>

# 1. ÚVOD

Buňky živého organismu v průběhu svého života prakticky nepřetržitě produkují volné radikály, mezi něž patří reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály označované souhrnně jako reaktivní formy kyslíku a dusíku (RNOS). Tyto reaktivní formy mají v organismu řadu nezastupitelných funkcí, avšak nadprodukce těchto forem a jejich následné reakce s biomakromolekulami mohou být příčinou řady negativních faktorů. Lidský organismus si proti působení RNOS vyvinul celou řadu obranných mechanismů, kterých se zúčastňuje řada látek, majících tzv. antioxidační vlastnosti. Definici těchto látek a mechanismus jejich působení detailně popsal ve své práci např. Halliwell a kolektiv<sup>1</sup>.

Potraviny jsou zdrojem nejen klasických antioxidantů esenciální povahy (vitamin C a E, karotenoidy, selen a jiné stopové prvky jako měď a zinek), ale také celé řady látek přírodních, které v modelových systémech *in vivo* či *in vitro* vykazují srovnatelné, či dokonce vyšší antioxidační účinky. Mezi takovéto látky se řadí hlavně polyfenolické sloučeniny. Jedná se o látky všudypřítomné v rostlinné říši a současně také o nejrozšířenější látky s redukčními účinky v naší stravě.

V současnosti roste zájem o studium antioxidační kapacity vína, díky jeho příznivým účinkům v boji proti řadě onemocnění spojených s oxidačním stresem<sup>2</sup>. Antioxidační potenciál vína je spojován hlavně s polyfenolickými sloučeninami v něm obsaženými. Tyto přírodní komponenty vína jsou v současnosti intenzivně studovány ve spojitosti s ochranou lidského organismu vůči kardiovaskulárním a degenerativním chorobám a je jim přisuzována i antimikrobiální aktivita. Konkrétně konzumace červeného vína je spojována s tzv. „Francouzským paradoxem“ popsaný Sergem Renaudem a spol<sup>3</sup>.

Přestože polyfenolické sloučeniny tvoří méně než 5 % složek nacházejících se víně, jsou velmi důležité, protože přispívají jak k celkovému vzhledu vína (barva), tak chuti (hořkost), a také adstringentním vlastnostem vína<sup>4</sup>. Jejich obsah podle řady autorů také přímo koreluje s antioxidačními vlastnostmi vína.

Cílem této studie bylo zhodnotit vliv jednotlivých technologických postupů při výrobě červeného vína Frankovka, rosé vína Frankovka a bílého vína cuveé odrůd Rulandské bílé, Tramín červený a Sauvignon, na změny antioxidační aktivity a na změny obsahu celkových fenolů v těchto vínech s využitím vybraných spektrofotometrických metod.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Volné radikály

V posledních několika letech se volné radikály dostávají do popředí zájmu celé řady vědních oborů a to hlavně v souvislosti s jejich úlohou při tzv. oxidačním stresu. Vzhledem k tomu, že se jedná o molekuly, případně molekulové fragmenty, které obsahují ve svém atomovém či molekulové obalu jeden, či více nepárových elektronů, jsou tyto částice extrémně reaktivní, vyznačují se omezenou dobou existence a nízkou „steady – state“ koncentrací (koncentrace v ustáleném stavu)<sup>5</sup>.

#### 2.1.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

V živých organismech se běžně takovéto částice vyskytují v podobě volných radikálů kyslíku a dusíku, z nichž mohou vznikat jiné reaktivní látky, které již nepárový elektron nemají (např. peroxid vodíku, kyselina chlorná, kyselina dusitá). Souhrnně jsou pak tyto volné radikály a příslušné látky neradikálové povahy označovány jako reaktivní formy kyslíku či dusíku (reactive oxygen species – ROS, resp. reactive nitrogen species – RNS vizte Tab. 1).

RONS zastávají v organismu celou řadu nezastupitelných funkcí. Podílejí se například na ničení fagocytovaných mikroorganismů při ovulaci a oplodnění vajíčka<sup>6</sup>, slouží jako signální molekuly, faktory imunitní ochrany, a jsou považovány za významné prostředníky přenosu energie. Přes všechny tyto klady, bývají reakce reaktivních forem kyslíku či dusíku s biomakromolekulami nejčastější příčinou poškození buněčných struktur, buněk a celých tkání<sup>7</sup> a mohou tedy sehrávat negativní roli v patogenezi řady nemocí.

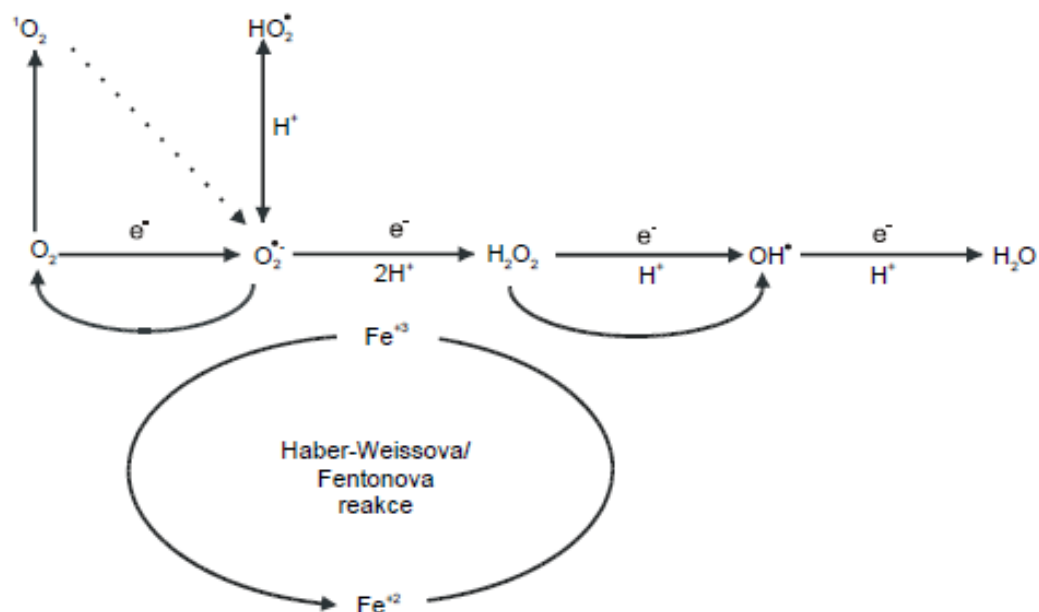
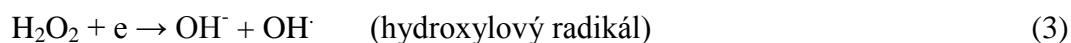
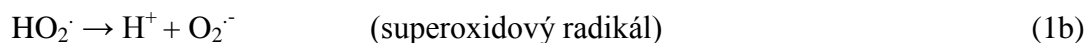
Původcem většiny těchto negativ je role RONS na vzniku tzv. oxidačního stresu. Termín oxidační stres definuje nerovnováhu mezi RONS a antioxidační obranou buňky. Přestože byla organismem vyvinuta celá řada obranných systémů k boji proti hromadění RONS, mohou být RONS produkovány rychleji, než je stačí ochranný mechanismus buňky odstranit a dochází tak k oxidačnímu stresu<sup>8</sup>. Ten pak může být příčinou řady onemocnění jako je diabetes mellitus, rakovina, ateroskleróza, ischémie a reperfuze, chronická zánětlivá onemocnění nebo neurodegenerativní choroby<sup>9,10,11</sup>.

Tabulka 1. Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku<sup>12</sup>

Reaktivní formy kyslíku (ROS)			
<i>Volné radikály</i>		<i>Látky neradikálové povahy</i>	
Superoxidový radikál	$O_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku	$H_2O_2$
Hydroperoxylový radikál	$HO_2^{\cdot}$	Kyselina chlorná	$HClO$
Hydroxylový radikál	$OH^{\cdot}$	Ozón	$O_3$
Peroxylový radikál	$ROO^{\cdot}$	Singletový kyslík	$^1O_2$
Alkoxylový radikál	$RO^{\cdot}$		
Reaktivní formy dusíku (RNS)			
<i>Volné radikály</i>		<i>Látky neradikálové povahy</i>	
Oxid dusnatý	$NO^{\cdot}$	Kyselina dusitá	$HNO_2$
Oxid dusičitý	$NO_2^{\cdot}$	Oxid dusitý	$N_2O_3$
		Peroxyinitrit	$ONOO^{\cdot-}$
		Kyselina peroxodusitá	$ONOOH$
		Alkylperoxyinitrit	$ROONO^{\cdot-}$
		Nitroniový kationt	$NO_2^+$
		Chlorid nitrilu	$NO_2Cl$

### 2.1.1.1 Nejdůležitější reaktivní formy kyslíku

Molekulární kyslík  $O_2$  je základním prvkem aerobního života. Jedná se o biradikál mající jeden elektron v každém ze svých  $\pi^*$  protivazebných orbitalů. Avšak vzhledem k paralelnímu uspořádání obou elektronů, je reaktivita molekulárního kyslíku poměrně nízká<sup>5</sup>. Dodáním energie lze však reaktivitu molekulárního kyslíku zvýšit, jelikož dochází buď ke změně spinu jednoho z elektronů, či jejich spárování v jednom  $\pi^*$  orbitalu. Takovýto proces vede ke vzniku singletového kyslíku. Při oxidačních reakcích s molekulami se kyslík redukuje za vzniku meziproduktů, které jsou volnými radikály<sup>13</sup>. Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázena postupnou jedno až tři elektronovou redukcí, kdy dochází k tvorbě hydroperoxylového radikálu, superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu<sup>14</sup> (vizte Obr. 1).



Obrázek 1. Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu<sup>14</sup>

### **Singletový kyslík $^1\text{O}_2$**

Existují dvě formy singletového kyslíku: delta - singletový kyslík ( $^1\Delta_g\text{O}_2$ ) a sigma – singletový kyslík ( $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ ). První z nich je z biologického hlediska důležitější a to díky své delší době života. Nicméně není volným radikálem, protože neobsahuje nepárový elektron (jeho dva elektrony se nacházejí ve stejném orbitalu a mají opačný spin). Sigma – singletový kyslík naopak obsahuje dva elektrony s antiparalelními spiny a to ve dvou různých orbitalech. Tato forma je velmi reaktivní, má ale krátký poločas života, jelikož se bezprostředně po svém zrodu rozkládá, anebo snadno přechází na delta - singletovou formu kyslíku<sup>5</sup>. Singletový kyslík může svou excitační energii přenést buď na jiné biologické molekuly, nebo s nimi může reagovat ze vzniku peroxidů či hydroperoxidů<sup>14</sup>.

### ***Superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$***

Volný superoxidový radikál  $O_2^{\cdot-}$  vzniká z tripletového kyslíku přijetím jednoho elektronu a to jako jeden z produktů při mitochondriální respiraci. Superoxidový radikál je považován za „primární ROS“ a může interagovat s dalšími molekulami za vzniku „sekundárních ROS“ a to jako redukční či oxidační faktor<sup>15</sup>. Ve vodném prostředí podléhá superoxidový radikál spontánní dismutaci za vzniku kyslíku a peroxidu vodíku, přičemž v biologických systémech je tato reakce katalyzována enzymem superoxid dismutázou (SOD)<sup>14</sup>. Superoxid dismutáza je přítomna v podstatě v každé buňce těla a bylo prokázáno, že hraje důležitou roli v ochraně buňky a tkání právě díky své funkci katalyzátoru při samovolné dismutaci superoxidového radikálu, jak je uvedeno v následující rovnici<sup>16</sup>:



### ***Peroxid vodíku $H_2O_2$***

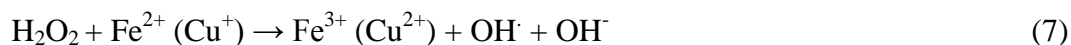
Peroxid vodíku vzniká dvojelektronovou redukcí kyslíku. Nejedná se o volný radikál, nicméně jeho nebezpečnost spočívá ve snadné prostupnosti většinou biologických membrán. Přestože není příliš reaktivní, jeho škodlivé účinky se projevují skrz produkt jeho přeměny - extrémně reaktivní hydroxylový radikál. Během fagocytózy neutrofilů produkují velmi nebezpečný chlornan (který je také generován z peroxidu vodíku reakcí s chloridovými ionty a za katalýzy enzymem myeloperoxidázou), který může reagovat s volnými aminy za tvorby chloraminů, které jsou pro buňky taktéž toxické<sup>17</sup>.

### ***Hydroxylový radikál $OH^{\cdot}$***

Třielektronovou redukcí molekulárního kyslíku vzniká nejreaktivnější forma kyslíku – hydroxylový radikál, který má in vivo velmi krátký poločas života (cca  $10^{-9}$  s)<sup>18</sup>. Tato extrémně reaktivní forma může reagovat velmi rychle s většinou biomolekul<sup>5</sup>. Hydroxylový radikál se může tvořit přímo například při tzv. Haber – Weisově reakci peroxidu vodíku a superoxidu:



Dále může být hydroxylový radikál tvořen cyklem Fentovy reakce zahrnující oxidaci přechodných kovů, jako jsou železnaté či měďnaté ionty<sup>14</sup>:



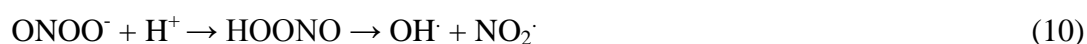
### 2.1.1.2 Nejdůležitější reaktivní formy dusíku

#### *Oxid dusnatý NO*

V biologických systémech je oxid dusnatý primárním zdrojem všech RNS<sup>19</sup>. Jedná se o bioaktivní, potencionálně toxický, relativně nestabilní volný radikál, který se vzhledem k jeho lipofilní povaze může šířit přes buněčné membrány bez specifických membránových transportérů<sup>20</sup>. Na druhou stranu, však může být transportován prostřednictvím nitrosothiolů, které vznikají reakcí oxidu dusnatého s -SH skupinami albuminu, cysteinu či glutationu. Biosyntéza oxidu dusnatého probíhá z L-argininu prostřednictvím enzymů NO synthasy. Dvě z nich, tzv. konstituční synthasy (nNOS – neuronální a eNOS – endoteliální) produkují NO v relativně malých, stabilních množstvích, které se spolu s dalšími NO – obsahujícími molekulami podílejí na regulaci fyziologických procesů. Oxid dusnatý vyprodukovaný třetí formou – indukční NO synthasou (iNOS) působí převážně jako protizáněťový mediátor s významným imunomodulačním efektem<sup>21</sup>. V organismu se dále podílí na udržování krevního toku a tlaku.

#### *Peroxyinitrit ONOO*

Oxid dusnatý může být v organismu přeměňován na celou řadu vysoce reaktivních metabolitů jedním z nichž je peroxyinitrit, vznikající při velmi rychlé reakci superoxidu s oxidem dusnatým, či kyselina peroxodusitá, jejímž rozkladem vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál:



Obě tyto formy jsou vysoce reaktivní a mohou vést k oxidačnímu poškození DNA, či iniciovat peroxidaci lipidů apod.

### 2.1.2 Vznik reaktivních forem kyslíku a dusíku v organismu

Mezi endogenní zdroje volných radikálů produkovaných v organismu patří lysozomy a peroxysomy, buňky schopné fagocytózy, biotransformační procesy na endoplazmatickém retikulu, Fentova či Haber – Weissova reakce přechodných kovů a některé fyzikální faktory jako UV záření apod. Jedním z procesů, při kterém také dochází k tvorbě volných radikálů, je dýchací řetězec v mitochondriích<sup>12,22</sup>. K endogenním faktorům podílejícím se na tvorbě konkrétně ROS patří i celá řada enzymů jako je NADPH – oxidasa (hlavní enzym katalyzující vznik volných radikálů v buňkách), myeloperoxidasa (katalyzuje reakci peroxidu vodíku s chloridovými ionty za vzniku kyseliny chlorné), NO – synthasa a podobně<sup>6</sup>. Mezi reaktivní formy kyslíku a dusíku vznikající *in vivo*, patří například i volné radikály generované fyziologicky během oxidativní fosforylace. Mají různé fyziologické role a jsou velmi rychle odstraňovány ven z těla. Jejich setrvání v organismu však může způsobit dysfunkci buněk a buněčnou smrt<sup>23</sup>.

Mezi exogenní faktory, které způsobují nadprodukcí volných radikálů, patří průmyslové znečištění životního prostředí, ozon, ale i například příjem řady léčiv (zejména celková anestetika, barbituráty apod.). Je nutné zmínit, že pasivní i aktivní kouření je spojováno se zvýšenou produkcí volných radikálů a úbytkem antioxidantů v organismu (jeden obálček cigaretového kouře totiž obsahuje až 1014 volných radikálů)<sup>24</sup>.

Volné radikály hrají důležitou roli i v toxicitě pesticidů či jiných chemických látek vůči životnímu prostředí. Pesticidy totiž mohou způsobit oxidační stres vedoucí ke generaci volných radikálů a změnám v enzymatickém systému, sloužícím prostřednictvím antioxidantů k záchytu (či vychytávání) volných radikálů kyslíku<sup>25</sup>.

## 2.2 Antioxidanty

Negativní působení volných radikálů v organismu je vyváženo existencí řady obranných mechanismů, kterých se zúčastňují látky s antioxidačními účinky – tzv. antioxidanty. Podle klasické definice jsou antioxidanty molekuly, které buď jsou přítomny v nižší koncentraci ve srovnání s látkami, které mají chránit, mohou zabraňovat či omezovat oxidační destrukci těchto látek<sup>26</sup>. Tyto látky pak mohou být buď přímo syntetizovány v těle, anebo jsou přijímány potravou.

Antioxidantům přijímaným potravou se v současné době věnuje velká pozornost a to hlavně z hlediska jejich biologické účinnosti a snadné dostupnosti. Tyto látky jsou totiž považovány za faktory eliminace nebo redukce oxidačních agens, a to látkových i enzymatických. Cílem této aktivity je ochrana struktur a funkcí mnohých biomolekul (inhibují např. oxidaci polynenasycených mastných kyselin PUFAs v biomembránách), udržování fyziologické rovnováhy mezi iniciátory oxidací, tedy RONS, a systémem antioxidační ochrany organismu v průběhu oxidačního stresu, či stimulace tvorby a aktivity endogenních antioxidantů<sup>27</sup>.

V potravinářské chemii je pojem antioxidant vykládán jako látka, která prodlužuje trvanlivost potravin tím, že ji chrání před znehodnocením oxidací, jejímž projevem je žluknutí tuků a snadno se oxidujících látek. Oxidace je pak považována za obecně nejčastěji se vyskytující formu degradace tuků, která vede k rozvoji nežádoucího aróma, znehodnocení barvy, chuti a snížení trvanlivosti a výživové hodnoty potraviny<sup>28</sup>.

### 2.2.1 Dělení antioxidantů

Obecně se antioxidanty dělí dle jejich účinku působení do několika základních skupin:

1. Preventivní antioxidanty – zabraňují vzniku řetězových radikálových reakcí. Do této skupiny lze zařadit chelátory přechodných kovů (metalotionein, neuromelanin, transferin aj.) a další proteiny uplatňující se v metabolismu a transportu přechodných kovů. Patří zde i některé syntetické chelátory jako je např. EDTA, DETAPAC či Desferal (desferoxamin)<sup>7</sup>. Chelátory přechodných kovů převádějí kovové prooxidanty, především deriváty železa a mědi, na stabilní produkty. Pokud k chelataci nedochází,

těžké kovy se pak přímo podílejí na rozkladu lipidových hydroperoxidů na volné radikály. Mezi účinné chelátory patří například i quercetin a taniny. Dále se do skupiny preventivních antioxidantů řadí antioxidační enzymy jako je kataláza, superoxid dismutáza, glutathion reductáza a další<sup>6, 29</sup>.

2. „Chain breaking“ antioxidanty – přerušují již běžící proces řetězové radikálové reakce. Do této skupiny lze zařadit antioxidanty sloužící jako tzv. vychytávače volných radikálů (tzv. „radical scavengers“). Ty jsou schopny zhášet volné radikály a zastavit tak propagační řetězovou reakci. K těmto látkám lze zařadit např. koenzym Q či jiné endogenní nízkomolekulární antioxidanty<sup>30</sup>, ale i například tokoferoly<sup>31</sup>.
3. „Zhášeče“ singletového kyslíku – slouží k převedení singletového kyslíku na tripletový. Patří sem například karoteny konkrétně lykopen, ale i histidin či kyselina askorbová<sup>32</sup>.
4. Synergisté – zvyšují aktivitu například „chain breaking“ antioxidantů<sup>33</sup>. K takovýmto antioxidantům patří například citrónová kyselina, která hraje významnou roli v oxidačních procesech jako antioxidant a synergent tím, že brání spolu s askorbovou kyselinou enzymatickému hnědnutí některých druhů ovoce a zeleniny<sup>34</sup>.
5. Stabilizátory hydroperoxidů a látky redukující hydroperoxydy – jejich úkolem je prevence rozkladu hydroperoxidů na volné radikály (př. fenolické sloučeniny), anebo redukce hydroperoxidů neradikálovou cestou na stabilní sloučeniny (př. thioly, sulfidy, thiolétery, bílkoviny, aminokyseliny)<sup>33,35</sup>.

Další neméně významná je klasifikace antioxidantů na přírodní, přírodně identické a syntetické, které jsou do potravin přidávány záměrně. Přírodní antioxidanty jsou syntetizovány nejčastěji rostlinami (ale i mikroorganismy, houbami aj.) a do našeho těla se dostávají potravou. Syntetické antioxidanty jsou syntetizovány uměle a přidávány do potravin za účelem prodloužení trvanlivosti, zabránění vzniku nežádoucí chuti a vůně či pro dosažení vyšší nutriční hodnoty potravin obsahujících snadno oxidovatelné složky, což jsou zejména lipidy s vyšším podílem nenasycených mastných kyselin. Třetí skupinou jsou látky identické s přírodními antioxidanty nacházejícími se v potravinách, které jsou však syntetizovány průmyslově. Tyto látky se nazývají přírodně identické antioxidanty a lze mezi ně zařadit např. některé syntetické tokoferoly či askorbovou kyselinu. V současnosti se však díky možným zdravotním rizikům souvisejícím s příjmem syntetických antioxidantů a také díky tomu, že přírodní antioxidanty jsou veřejností považovány za přijatelnější, zaměřuje výzkumné úsilí na

možnost náhrady syntetických přídatných antioxidantů látkami přírodními. Takovýmto konkrétním případem může být například omezení přísadků oxidu siřičitého jako přídatného syntetického antioxidantu ve vínech, které samo o sobě celou řadu přírodních látek s antioxidačními účinky obsahuje. Je totiž známo, že 15 – 20 % dospělé populace totiž trpí k tomuto nutně přidávanému přídatnému antioxidantu alergií, i když jeho koncentrace nedosahuje ani povoleného dávkování<sup>36</sup>.

### 2.2.2 Přírodní antioxidanty

Přírodní antioxidanty jsou syntetizovány v rostlinách a zastávají v nich celou řadu nezastupitelných funkcí, ať už se jedná o obranu před jinými živočichy (některé antioxidanty jsou zodpovědné za hořkou chuť rostlin), či naopak o schopnost přilákat opylovače (v tomto ohledu hraje roli pestrobarevnost některých antioxidantů) nebo ochranu před infekcí viry a bakteriemi (antimikrobiální a antivirové vlastnosti).

Mnoho látek rostlinného původu má antioxidační vlastnosti, z nichž nejznámější je účinek flavanoidů, silymarinu či třeba Ginkgo biloba. U taninů například, byl popsán protinádorový, antihypertenzní, antikonvulzivní a hypocholesterový účinek, u flavonoidů pak účinek protizánětlivý, antibakteriální, protisklerotický, protinádorový a antialergenní<sup>12,37</sup>. Právě pro tyto jejich vlastnosti, jsou přírodní antioxidanty v dnešní době intenzivně zkoumány.

Přírodní antioxidanty lidský organismus získává potravou hlavně z ovoce, zeleniny, obilovin, aromatických či léčivých rostlin a alkoholických či nealkoholických nápojů. Nejvýznamnějšími přírodními antioxidanty jsou tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E), askorbová kyselina (vitamin C), karotenoidy, fenolové látky (především flavonoidy, fenolické kyseliny, jednoduché fenoly, stilbeny) a mnoho dalších, přičemž nejvíce zastoupenými přírodními antioxidanty v potravě jsou flavonoidy a fenolické látky<sup>38</sup>.

V současnosti se do popředí zájmu mnoha odborníků, právě díky možné antioxidační terapii, dostávají hlavně rostlinné polyfenoly. Z výsledků řady epidemiologických studií zabývajících se studiem antioxidačních účinků přírodních látek přijímaných potravou totiž vyplývá, že právě antioxidační aktivita mnoha rostlinných polyfenolů je vyšší, než účinek antioxidačních vitamínů. Řada autorů však ve svých pracích popisuje, že biologická využitelnost antioxidantů přijímaných potravou se liší nejen podle typu sloučeniny, ale i podle

jejího zdroje a celé řady dalších aspektů, což s sebou přináší i ovlivnění antioxidačního účinku těchto látek *in vivo*<sup>39, 40, 41, 42</sup>.

### 2.2.3 Přírodní polyfenolické sloučeniny

V rostlinách bylo doposud identifikováno několik tisíc látek fenolické povahy s ohromnou rozmanitostí struktur. Jedná se o nejrozšířenější třídu metabolitů v přírodě a jejich distribuce je tedy všudypřítomná. Tyto polyfenolické sloučeniny jsou v rostlině syntetizovány a dále modifikovány v jedné z větví fenyylpropanoidové dráhy, která je klíčovou metabolickou drahou vedoucí k mnoha, pro rostlinu důležitým metabolitům, jako jsou například flavonoidy, stilbeny, kumariny aj<sup>43</sup>. Jejich klíčovou rolí je ochrana rostliny například před ultrafialovým zářením či atakem agresivních patogenů.

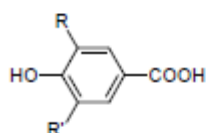
Přírodní polyfenolické sloučeniny se řadí mezi nejhojnější látky vykazující antioxidační aktivitu v naší stravě. Jejich denní příjem byl odhadnut až na 1 g a považuje se za vyšší než je denní příjem řady antioxidačních vitamínů<sup>30</sup>. Jedná se o redukční agens, která spolu s dalšími redukčními činidly v naší stravě jako je vitamin C, vitamin E a karotenoidy, působí jako antioxidanty, chráníci naše tělo před oxidačním stresem. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou přírodních polyfenolů přijímaných potravou a prevencí některých chorob, jako jsou neurodegenerativní poruchy, kardiovaskulární onemocnění, karcinogeneze, ateroskleróza a další.

#### 2.2.3.1 Základní strukturní typy přírodních polyfenolických sloučenin

Biologické vlastnosti, biodostupnost, antioxidační aktivita, schopnost specificky interagovat s buněčnými receptory a enzymy a mnohé jiné funkce a vlastnosti polyfenolů se vztahují k jejich chemické struktuře<sup>44</sup>. Polyfenolické sloučeniny, které jsou součástí naší stravy, lze rozdělit do několika základních skupin. Těmito skupinami jsou: fenolické kyseliny, taniny, flavonoidy, lignany, ligniny, stilbeny a kumariny. Základní struktury přírodních polyfenolů jsou zobrazeny na Obr. 2.

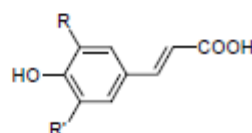
## Fenolické kyseliny

### Deriváty kyseliny benzoové



R = R' = H; kyseliny p-hydroxybenzoová  
 R = OH, R' = H; protocatechová kyselina  
 R = OCH<sub>3</sub>, R' = H; vanilová kyselina  
 R = R' = OH; gallová kyselina  
 R = R' = OCH<sub>3</sub>; syringová kyselina

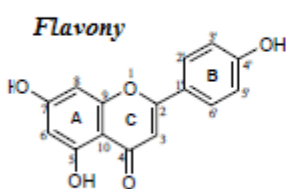
### Deriváty kyseliny skořicové



R = R' = H; kyselina p-kumarová  
 R = OH, R' = H; kyselina kávová  
 R = OCH<sub>3</sub>, R' = H; kyselina ferulová  
 R = R' = OCH<sub>3</sub>; kyselina sinapová

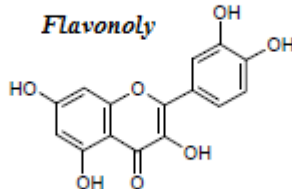
## Flavonoidy

### Flavony



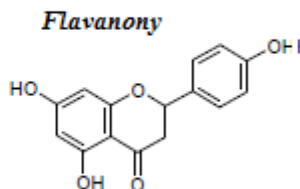
Apigenin

### Flavonoly



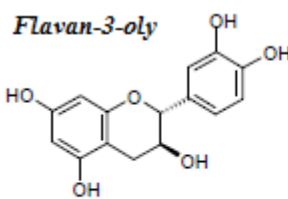
Quercetin

### Flavanony



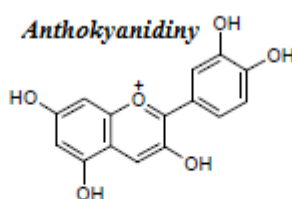
Naringenin

### Flavan-3-oly



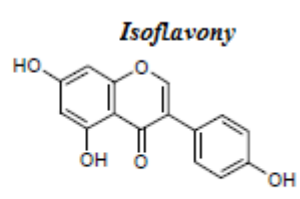
(+) catechin

### Anthokyanidiny



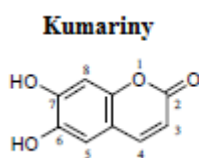
Kyanidin

### Isoflavony



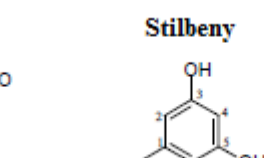
Genistein

### Kumariny



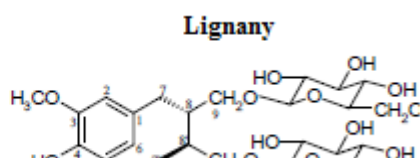
Esculetin

### Stilbeny



Resveratrol

### Lignany



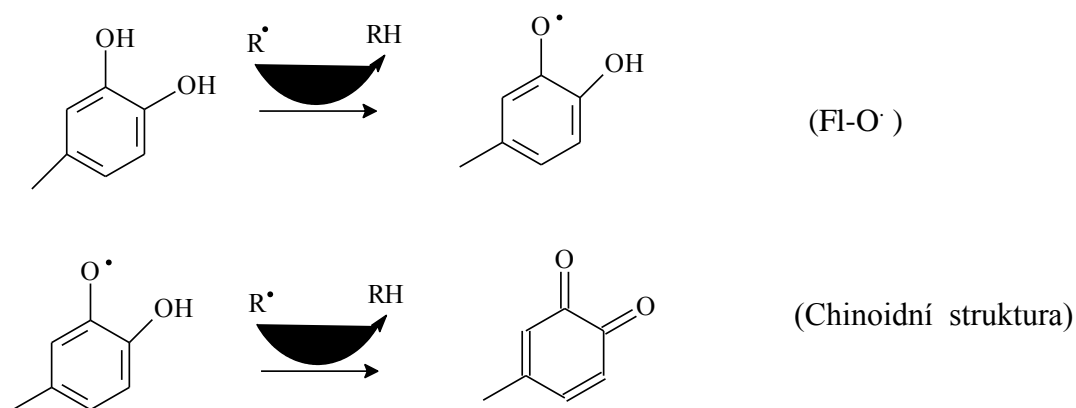
Diglykosid  
secoisolariciresinolu

Obrázek 2. Základní strukturální typy přírodních polyfenolických sloučenin<sup>45</sup>

### 2.2.3.2 Antioxidační účinky přírodních polyfenolických sloučenin

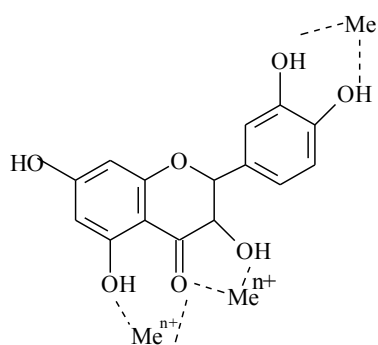
Rostoucí zájem o studium přírodních polyfenolů přijímaných potravou nastal hlavně díky jejich roli antioxidantů, antimutagenů a vychytávačů volných radikálů a jejich implikaci v prevenci patologických stavů typu rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění<sup>46</sup>. Antioxidační účinek přírodních polyfenolických sloučenin bývá zpravidla komplexní a lze k němu přiřadit několik základních mechanismů:

1. Hydroxylové skupiny polyfenolů jsou dobrými donory atomů vodíku. Takovýto typ antioxidantů může reagovat s RONS v terminální fázi reakce, která přeruší cyklus generování dalších volných radikálů<sup>45</sup>. Vzniká tak relativně dost stabilní fenoxylový radikál (FI-O<sup>•</sup>), či neradikálová chinoidní struktura (vizte Obr. 3). Tato vlastnost řady polyfenolů je tedy dána jejich snadnou oxidovatelností. Význam této reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve, než mohou reagovat s dalšími buněčnými komponentami<sup>47</sup>.



Obrázek 3. Eliminace volných radikálů prostřednictvím polyfenolů<sup>47</sup>

2. Antioxidační aktivita polyfenolů vyplývá i z jejich schopnosti vytvářet chelátové vazby s některými bivalentními kovy jako je např. měď či dvojmocné železo (vizte Obr. 4.). Inhibují tak Fentovu či Haber – Weissovu reakci, kterých se volné ionty těchto kovů zúčastňují, a které vedou k produkci RONS<sup>46</sup>.



(Me - vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů)

Obrázek 4. Schopnost chelatace některých kovů jako možnost antioxidačního působení polyfenolů<sup>47</sup>

- Mezi poslední mechanismus antioxidačních účinků polyfenolů patří schopnost inhibovat některé enzymy, které jsou zahrnuty v generaci volných radikálů. Mezi tyto enzymy patří kupříkladu různé isoformy cytochromu P450, lipoxygenasy, cyklooxygenasy a xantinoxidasy<sup>45</sup>.

## 2.3 Víno jako zdroj přírodních polyfenolických sloučenin

Přírodní polyfenolické sloučeniny jsou sekundárními metabolity rostlin, které vznikají biogeneticky prostřednictvím dvou primárních syntetických drah: shikimátové a acetátové. Jejich reaktivita je spojena s kyselým charakterem fenolických funkčních skupin a nukleofilním charakterem benzenového jádra<sup>48</sup>.

Polyfenolické sloučeniny hrají důležitou roli v celém oboru vinařství. Mají totiž zásadní vliv na charakter, jakost, chuť a barvu červených vín a jsou současně hlavními komponentami odlišujícími červená vína od vín bílých. U bílých vín je totiž obsah těchto sloučenin mnohem nižší. Konkrétně například Li a spol.<sup>49</sup> udává, že obsah celkových polyfenolických sloučenin klesá v pořadí: červená > růžová > bílá vína, jehož tesy potvrdila i řada dalších autorů. Celkový obsah polyfenolů přítomných ve víně však nezávisí pouze na tom, zdali se jedná o červené, růžové či bílé víno, ale také na celé řadě dalších aspektů.

Hlavním zdrojem polyfenolických sloučenin ve víně jsou samy bobule. Polyfenoly jsou v nich obsaženy hlavně ve slupce, dužnině, peckách a šťávě. Bobule však nejsou jediným zdrojem těchto látek. Do vína se totiž tyto látky dostávají i z dubových sudů, ve kterých vína zrají<sup>50</sup> a v malé míře jsou rovněž produkovány některými druhy kvasinek a vnášejí tak do vína atypické chuťové tóny<sup>51</sup>. Konečné složení polyfenolických sloučenin ve víně závisí jak na jejich obsahu v hroznech, který závisí mimo jiné například na klimatických podmínkách, tak na výtěžku extrakce, vinařské technologii a chemických reakcích doprovázejících zrání vína jako je kondenzace, enzymatická a chemická oxidace apod<sup>52</sup>.

Burns a spol. se například ve své práci zabývala čtyřmi různými typy vinifikace dvou různých odrůd červeného vína (Cabernet Sauvignon a Merlot), které se vyznačovaly rozdílnou kvalitou hroznů, a tím spojenou extrakcí polyfenolických sloučenin a jejím vlivem na celkový obsah těchto látek. Potvrdila tak předpoklad, že na výtěžku extrakce fenolických sloučenin a jejich konečném obsahu ve víně, se významnou měrou podílí nejen způsob vinifikace, ale i vliv odrůdy a kvality hroznů<sup>53</sup>.

### 2.3.1 Polyfenolické sloučeniny vína

Většina autorů dělí polyfenolické sloučeniny obsažené ve víně a hroznech révy viné do dvou základních skupin na: flavonoidy a ne-flavonoidy. Nejběžnějšími flavonoidy ve víně jsou flavonoly (quercetin, kaempferol a myricetin), flavan-3-oly (katechin, epikatechin a

taniny) a anthokyany (kyanin), které hrají významnou roli hlavně z hlediska barvy vín. Mezi neflavonodinní sloučeniny přítomné ve víně se řadí stilbeny a fenolické kyseliny, jejichž zástupci jsou kyseliny hydroxyskořicové a benzoové<sup>49</sup>. Hrozny obsahují ne-flavonodinní sloučeniny především v dužnině, zatímco flavonoidní sloučeniny se nacházejí hlavně ve slupce, semenech a třapinách<sup>48</sup>.

### 2.3.1.1 Ne-flavonoidní sloučeniny vína

Hrozny révy vinné i samotné víno obsahují *benzoové a skořicové kyseliny*. V červeném víně se koncentrace těchto látek pohybuje v rozmezí 100 – 200 mg/l, kdežto v bílých vínech je jejich koncentrace podstatně nižší 10 – 20 mg/l. Jednotlivé kyseliny se mezi sebou liší různými substituenty na benzenovém jádře. Ve víně či hroznech jsou prezentovány jak ve své volné formě, tak ve formě glykosidů, ze kterých jsou uvolňovány především kyselou hydrolýzou, či ve formě esterů (nejčastěji s gallovou, elegallovou, tartarovou kyselinou aj.), ze kterých jsou uvolňovány hydrolýzou alkalickou<sup>54,55</sup>.

Z hlediska organoleptických vlastností tyto látky nemají žádnou zvláštní chuť či vůni. Hrají však důležitou roli jako prekurzory těkavých fenolů, které jsou z nich syntetizovány prostřednictvím působení některých mikroorganismů (např. kvasnic rodu *Brettanomyces*). Konkrétně v červeném víně jsou přítomny například ethylfenoly, které podle profesionálních degustátorů způsobují tzv. „animální“ aroma vína, které ne vždy pozitivně ovlivňuje kvalitu vína. V bílém víně jsou ve vyšších koncentracích přítomny mimo jiné vinylfenoly<sup>56</sup>. Prekurzory těchto sloučenin jsou skořicové kyseliny, trans-ferulová a trans-*p*-kumarová kyselina, které podléhají dekarboxylaci na vinylfenoly. Ty jsou následně redukovány na odpovídající ethylfenoly<sup>57</sup>.

*Kumariny* mohou být považovány za deriváty skořicové kyseliny. Tyto látky vznikají intramolekulární esterifikací fenolových OH skupin a do vína se uvolňují z dubového dřeva. Ačkoliv se kumariny nacházejí ve víně v poměrně velmi nízkých koncentracích (několik µg/l), mají vliv na organoleptické vlastnosti vína. Po dosažení meze detekce, která odpovídá 3 mg/l, totiž mají v podobě glykosidů hořkou chuť a v podobě aglykonů naopak kyselou<sup>55</sup>.

*Stilbeny* patří do skupiny složitějších polyfenolů, které jsou přítomny ve víně, hroznech ale i v dubovém dřevě<sup>55</sup>. Jedním z nejznámějších zástupců je monomer resveratrol, tedy 3,4',5-trihydroxystilben a jeho deriváty (dimery, trimery, tetramery a jejich glykosidy),

jehož bohatým a rozšířeným zdrojem jsou právě hrozny révy vinné i samotné víno. Resveratrol se vyskytuje převážně ve slupkách bobulí a do vína se extrahuje během kvašení. V červeném víně se jeho obsah pohybuje od 2 – 6 mg/l, ve vínech bílých je jeho obsah však nižší 0,2 – 0,8 mg/l. V révě vinné resveratrol zastává funkci fytoalexinu, což jsou sekundární metabolity rostlin, které se začnou tvořit *de novo*, či ve zvýšené míře jako odezva na stres (mechanické poškození, UV záření, ozon) nebo napadení rostliny bakteriemi, houbami či plísněmi<sup>58</sup>.

### 2.3.1.2 Flavonoidní sloučeniny vína

Nejrozšířenějšími sloučeninami z řad flavonoidů jsou *flavonoly*, žluté pigmenty nacházející se ve slupce jak bílých tak červených vín. V menší míře se ve slupkách nacházejí i flavanonoly, které mají mnohem světlejší odstín. V hroznech révy vinné se tyto sloučeniny nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů. Během fermentace jsou glykosidy těchto sloučenin převedeny hydrolytickým štěpením na formy aglykonů. Mezi známé zástupce patří kaempferol, quercetin a myricetin, které jsou přítomny ve vínech červených, bílá vína však obsahují pouze první dva. Obsah těchto látek v červeném víně se pohybuje kolem 100 mg/l, kdežto v bílých vínech, u nichž kvašení probíhá za nepřítomnosti pevných částí hroznu, je jejich obsah pouze 1 – 3 mg/l v závislosti typu odrůdy<sup>55</sup>.

Velkým procentem flavonoidů, které převládají v hroznech a ve víně jsou *flavan-3-oly* z nichž nejznámější jsou (+)-katechin, (-)-epikatechin a jejich dimery, oligomery a polymery. Tyto látky se nacházejí hlavně ve slupce, semenech a třapínách a mají významný vliv na celkové organoleptické vlastnosti vína. Jsou totiž zodpovědné za hořkost a adstringentní vlastnosti vína. Do vína respektive do moštu se extrahují během kontaktu moštu se slupkami, přičemž delší doba trvání extrakce, vyšší teplota a vyšší obsah alkoholu vedou ke zvýšení koncentrace těchto monomerů ve víně<sup>59</sup>.

Oligomery flava-3-olů neboli katechinů jsou jinak označovány jako kondenzované taniny, které jsou spolu s flavan-3,4-dioly a leukoanthokyanidiny řazeny mezi tzv. proanthokyanidiny<sup>59</sup>. Zdrojem těchto látek, označovaných též jako révové třísloviny jsou hlavně slupky a semena. Vína bílá obsahují relativně nízký obsah těchto látek, kdežto vína červená, u nichž při procesu výroby dochází ke kontaktu moštu se slupkami, je jejich obsah až 32x vyšší<sup>60</sup>.

Mezi hydrolyzovatelné taniny se obvykle řadí gallotaniny a ellegotaniny, které po kyselé hydrolyze uvolňují příslušné kyseliny. Značné množství těchto látek se do vína vyluhuje v průběhu jeho zrání v dubových sudech, kde hrají významnou roli díky svým antioxidačním vlastnostem i v procesu stárnutí vína<sup>55</sup>.

*Anthokyany* jsou hlavními pigmenty červených ale i růžových vín, nacházející se především ve slupkách hroznů (na rozdíl od odrůdy tzv. „barvířek“, které mají zabarvenou i dužninu), přičemž jejich koncentrace směrem k povrchu bobule narůstá. Velké množství těchto látek se nachází také v listech a to převážně na konci vegetačního období. Jejich struktura je odvozena od substituovaného 2'-fenyl-benzopyrilyového jádra<sup>55</sup>. Jedná se o ve vodě rozpustné pigmenty, jejichž barevnost se pohybuje ve škále červených odstínů od karmínové až k modrofialové a purpurové (v závislosti na pH prostředí). Do vína se tyto látky dostávají klasickými postupy založenými na pomletí bobulí hroznů a tím daným narušením slupek a jejich následným nakvášením, tedy vyluhováním v moštu, čímž dojde k maceraci barviv<sup>61</sup>.

### 2.3.2 Metody stanovení obsahu celkových fenolických sloučenin

Ke stanovení obsahu celkových fenolů (TPC) se nejčastěji používá metoda využívající činidla Folin–Ciocalteu (FC) poprvé blíže popsaná Singletonem a Rossim<sup>62</sup>. Singleton pak přizpůsobil tuto metodu pro stanovení celkových fenolů ve víně a o několik let později publikoval další podrobnější práce o možnosti jejího využití v oboru vinařství<sup>63</sup>. Principem dané metody je redukce FC činidla, složeného ze směsi kyseliny fosfowolframové a kyseliny fosfomolybdenové, na směs modrých oxidů wolframu a molybdenu, prostřednictvím oxidace fenolů obsažených ve vzorku. Vytvořené modré zbarvení vykazuje maximální absorpci světla v oblasti vlnové délky od 750 - 760 nm, přičemž intenzita této absorpce je přímo úměrná celkovému množství původně přítomných fenolických sloučenin, které se nejčastěji vyjadřuje v ekvivalentech standardu gallové kyseliny (mg/l GAE). V roce 1990 byla FC metoda přijata Mezinárodní organizací pro révu a víno (OIV – International Organisation of Vine and Wine) jako standardní metoda pro stanovení obsahu celkových fenolů ve víně<sup>63</sup>.

Fenolické sloučeniny obsažené ve víně a moštu se vyznačují charakteristickou absorpcí záření v UV oblasti světla. Tohoto faktu může být využito ke stanovení jejich obsahu velmi jednoduchou kolorimetrickou metodou založenou na měření absorbance vzorků vín či moštů při konstantní vlnové délce 280 nm, která je spojována právě s obsahem celkových fenolů<sup>55</sup>. Jediným problémem této metody je to, že jednotlivé skupiny fenolických sloučenin mají při vlnové délce 280 nm rozdílnou absorptivitu (molární absorpční koeficient) a z tohoto důvodu nemohou být výsledky získané danou metodou vyjádřeny pomocí specifického standardu, ale vyjadřují se nejčastěji v jednotkách absorbancí (AU = absorbance unit). Díky své jednoduchosti a rychlosti je však tato metoda hojně využívána pro monitoring obsahu celkových fenolů v průběhu zpracování vína<sup>63</sup>.

Modifikaci této metody použila ve své práci Fragoso a kol<sup>64</sup>. Umožnila tak kvantifikovat naměřené výsledky prostřednictvím metody externího standardu s využitím kalibrační křivky gallové kyseliny. Získané hodnoty obsahu celkových fenolů pak byly vyjádřeny v ekvivalentech této kyseliny (mg/l GAE – gallic acid equivalents) a staly se tak snadno porovnatelnými i s jinými metodami.

## 2.4 Antioxidační aktivita a její stanovení

Pro možnost vzájemného porovnání antioxidačních účinků různých směsí, byl v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity – TAA). Tento parametr obecně kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat volné radikály<sup>65</sup>.

V oblasti hodnocení nutriční kvality potravin jak z hlediska chemické analýzy, tak z hlediska biologické aktivity byly v posledních několika letech popsány početné metody umožňující stanovit antioxidační aktivitu potravinových vzorků jako celku. Řada těchto metod je principiálně odlišných a postupně se vyvíjejí jejich modifikace s cílem co nejvíce jejich postup zjednodušit a umožnit tím jejich zavedení do praxe. Jejich společným rysem je charakterizovat v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí antioxidační resp. redukční schopnost jako souhrnnou vlastnost potravinového preparátu.

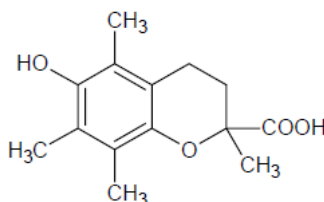
V literatuře lze nalézt rozsáhlý počet prací věnující se metodám používaným pro stanovení antioxidační aktivity *in vivo*, či *in vitro*. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy (viz kap. 2.2.3.2). Z tohoto faktu vyplývá, že antioxidanty mohou eliminovat radikály například donací protonu (tzv. Hydrogen Atom Transfer – HAT) či jednoelektronovou redukcí (tzv. Single Electron Transfer – SET). Konečný výsledek je bez ohledu na mechanismus stejný, ale kinetika a potenciál pro dané reakce se liší<sup>66</sup>. Často je však složité jednoznačně určit, zdali daný mechanismus probíhá na základě předání vodíkového atomu, či jako reakce redukční a v mnohých případech dokonce oba mechanismy probíhají současně<sup>39</sup>.

### 2.4.1 Metody stanovení antioxidační aktivity

Obecně mohou být tyto metody rozděleny do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály (nejčastěji donací protonu) a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek. Následující podkapitoly budou věnovány pouze několika vybraným metodám, které již našly uplatnění v charakterizaci antioxidační aktivity vína.

### 2.4.1.1 Metody hodnotící eliminaci radikálů

**Metoda ABTS** je jednou z běžně používaných spektrofotometrických metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Jedná se o metodu testující schopnost vzorku či látek vněm obsažených zhaset syntetický radikál  $ABTS^+$  (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)), která byla poprvé popsána Millerem a kol<sup>67</sup>. Tato metoda je též označována jako *metoda TEAC* (Trolox equivalent antioxidant capacity), jelikož výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou standardní látky Trolox<sup>30</sup>. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) je rozpustný syntetický analog vitamínu E (vizte Obr. 5).



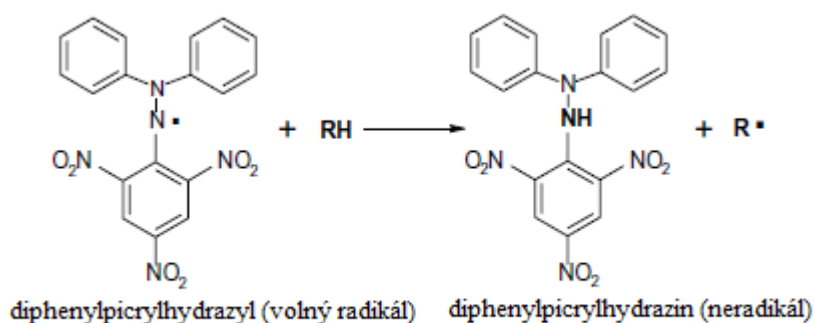
Obrázek 5. Standardní látka Trolox

Využití této metody je široké díky jejím četným modifikacím a může být aplikována na stanovení antioxidační aktivity jak čistých látek, tak potravinových vzorků a nápojů<sup>68</sup>. Radikál  $ABTS^+$  má charakteristické absorpční spektrum s maximy při 414, 645, 734 a 815 nm a může být generován z ABTS několika různými způsoby: enzymaticky s využitím myoglobinu či křenové peroxidázy, chemicky pomocí  $MnO_2$ , peroxidisíranu draselného či peroxidového radikálu a dokonce elektrochemicky. Ke stanovení antioxidační aktivity sherry a červených vín byla jedna z modifikací této metody využita Villaňem a kol. Jejich cílem byla optimalizace metody a nalezení vhodných podmínek měření tak, aby získané výsledky byly snadno porovnatelné<sup>69</sup>.

Další velmi jednoduchou a rychlou metodou používanou běžně v praxi pro stanovení celkové antioxidační aktivity je *metoda DPPH* využívající volný stabilní dusíkový radikál difenylpicrylhydrazid<sup>70</sup>. Prvním autorem, který tuto metodiku přibližně před 50 lety popsal, byl Marsden Blois, působící toho času na Stanfordově univerzitě v Kalifornii<sup>71</sup>.

Principem této metody je reakce testované látky se stabilním syntetickým radikálem difenylpicrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), při které

dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpicrylhydrazinu) (vizte Obr. 6). Díky intenzivnímu zbarvení tohoto radikálu je daná reakce sledována spektrofotometricky nejčastěji při vlnové délce 515 nm, která odpovídá maximu absorpance daného radikálu. Přestože se jedná o metodu velmi jednoduchou, může mít i svá omezení. Jedním z nich může být fakt, že mnohé antioxidanty, které reagují rychle např. s peroxylovými radikály mohou být inertní vůči DPPH, nebo s ním mohou reagovat velmi pomalu<sup>48</sup>. Přesto je tato metoda v různých modifikacích hojně využívána k hodnocení antioxidační aktivity nejen v oboru vinařství (např. cit.<sup>48,49</sup>), ale i v pivovarnictví a jiných odvětvích.



Obrázek 6. Struktura DPPH a jeho redukce antioxidantem RH<sup>48</sup>

Jednou ze spektrofotometrických metod založených na principu HAT mechanismu je i **metoda DMPD** popsaná Foglianem a kol<sup>72</sup>. Principem této metody je produkce stabilního červenofialového radikálu  $DMPD^{\cdot+}$  vykazujícího maximum absorpance při vlnové délce 505 nm, generovaného z bezbarvého DMPD (N,N'-dimethyl-p-fenylendiamindihydrochlorid) v silně kyselém prostředí za přítomnosti vhodného oxidačního činidla (např.  $Fe^{3+}$ ). Antioxidanty, které jsou schopny donace protonu (např. atomu vodíku) jej poskytují radikálu  $DMPD^{\cdot+}$  a tím dochází k jeho odbarvení. Změna intenzity zbarvení tohoto radikálu, spojená se změnou absorpance je pak úměrná zhášecí schopnosti antioxidantů přítomných ve vzorku.

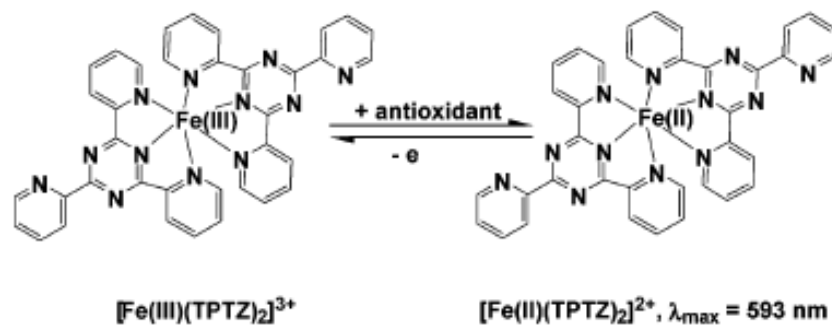
Při použití **metody ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity) popsané autorem Cao a kol.<sup>73</sup>, se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testovaného vzorku zpomalit či zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence  $\beta$  – fykoeritrinu (indikační protein) po ataku radikály. Jako generátor peroxylových radikálů se používá nejčastěji AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-

dihydrochlorid) a jako kontrolní látka standard Trolox. Při stanovení antioxidační aktivity polyfenolů, však byla popsána některá omezení týkající se využití  $\beta$  – fykoeritru jako fluorescenční sondy (omezená fotostabilita). Proto autor Ou s kolektivem zavedly inovaci této metody v podobě využití fluoresceinu (FL) jako fluorescenční sondy, čímž se metoda  $ORAC_{FL}$  stala exaktnější a to v důsledku přesnějšího reakčního mechanismu založeného pouze na předání vodíkového atomu (HAT)<sup>30</sup>.

#### 2.4.1.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

**Metoda FRAP** (Ferric Reducing Ability of Plasma) patří mezi velmi jednoduché metody založené na hodnocení redukčních účinků antioxidantů. Na rozdíl od řady jiných metod zde není využit žádný radikál, jelikož je zde pouze měřena redukční síla antioxidantů a nikoliv jejich schopnost zhaset volné radikály. Poprvé byla tato metodika popsána v roce 1996 autory Benziem a Strainem<sup>74</sup>. Několik let na to autoři Benzie a Szeto tuto metodu použili na stanovení celkové antioxidační kapacity čaje a pozměnili její název na „Ferric Reducing/Antioxidant Power assay“<sup>75</sup>. Původní autoři publikovali také modifikaci této metody v podobě FRASC („Ferric Reducing/Antioxidant power and ascorbic acid concentration“). Pomocí tohoto testu tak stanovili 3 indexy antioxidačního statusu – celkovou redukční sílu, absolutní koncentraci askorbové kyseliny a relativní příspěvek askorbové kyseliny na antioxidační aktivitu<sup>76</sup>.

Metoda FRAP kvantifikuje schopnost antioxidantů redukovat bezbarvý železitý komplex Fe(III)-TPTZ na modrý Fe(II)-TPTZ (TPTZ = 2,4,6-tris(2-pyridyl-1,3,5-triazin), vizte Obr. 7). Nárůst absorbance měřený při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe(II)-TPTZ je pak mírou antioxidační aktivity vzorku. Metoda má však své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6) a nemusí tak být zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly<sup>30</sup>.



Obrázek 7. Redukce bezbarvého komplexu Fe(III)-TPTZ na modrý Fe(II)-TPTZ<sup>77</sup>

SET mechanismu podobně jako metoda FRAP, využívá i metoda **CUPRAC** (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) publikovaná autorem Apak a kol<sup>78</sup>, v níž je využito neocuproinu (Nc = 2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin) jako chelatačního činidla. Tato metoda je založena na měření absorbance CUPRAC chromoforu (Cu(I)-Nc chelátu), který vzniká jako výsledek redoxní reakce antioxidantů s CUPRAC činidlem (Cu(II)-Nc), při vlnové délce 490 nm odpovídající maximu absorbance tohoto chromoforu. Metoda byla úspěšně aplikována na stanovení antioxidační aktivity přírodních polyfenolů ve víně<sup>49</sup>, ale i ke stanovení antioxidační aktivity v lidské plazmě<sup>79</sup>.

#### 2.4.2 Konkrétní případy stanovení TAA a TPC ve vínech

Víno je důležitou součástí lidské stravy, jelikož je bohatým zdrojem přírodních antioxidantů, jejichž pozitivní efekt na lidské zdraví je znám hlavně skrz jejich biologickou aktivitu. Obsah polyfenolických sloučenin a jejich antioxidační aktivita ve vínech však může být ovlivněna mnoha vnějšími i vnitřními faktory zahrnujícími vliv odrůdy a kvality hroznu, vliv klimatických podmínek, vliv technologických procesů použitých při výrobě vína, ale i vlivem podmínek zrání a skladování vína, při kterých se obsah těchto sloučenin do jisté míry také mění. Z těchto důvodů se stanovením antioxidační aktivity a obsahu celkových polyfenolů zabývá řada autorů a toto téma se tak stává často diskutovaným nejen v oboru vinařství.

Cílem výzkumu Villaña a kol.<sup>80</sup>, bylo zhodnotit vliv různých enologických postupů na antioxidační aktivitu vín spojenou s obsahem polyfenolických sloučenin. Za tímto účelem studovali techniky běžně používané v praxi, jako je vliv macerace červených vín, stupeň

lisování bílých vín, vliv klarifikace (čiření) a vliv membránové filtrace. Ke stanovení antioxidační aktivity zde bylo použito metody ABTS, DPPH a ORAC, ke stanovení celkových polyfenolů pak metody využívající Folin-Ciocalteuovo činidlo.

V případě vlivu stupně lisování bílých vín bylo zjištěno, že se zvyšujícím se tlakem a prodlužující se dobou kontaktu moštu s pevnými částmi hroznu při lisování bílých vín významně roste obsah celkových fenolů i antioxidační aktivita stanovovaných vzorků. K tomuto závěru autor dospěl po porovnání hodnot TAA a TPC u čtyř vzorků téhož bílého vína (odrůda Palomino). Poslední ze čtyř stanovovaných vzorků, který podlehl lisování při nejvyšších tlacích, totiž vykazoval až 14x vyšší hodnoty TPC, 55x vyšší hodnoty TAA stanovené metodou ABTS a 35x vyšší hodnoty TAA stanovené metodou DPPH než první vzorek, který podlehl tzv. pneumatickému horizontálnímu lisování vyznačujícím se minimálním kontaktem rmutu s pevnými částmi hroznu a velmi nízkým tlakem.

Vliv délky trvání macerace červených vín (odrůd Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Syrah) na hodnoty TPC a TAA byl sledován po dobu 14 dní. Během tohoto procesu docházelo k pozvolnému nárůstu hodnot TPC i TAA, což autoři připisují postupné extrakci polyfenolů do vína. Zajímavým byl v tomto případě fakt, že přestože byla všechna tato vína pěstována ve stejné oblasti, byly u odrůdy Cabernet Sauvignon maximální hodnoty TPC a TAA naměřeny již mezi čtvrtým a šestým dnem od začátku macerace, kdežto u odrůdy Syrah například až ve dni čtrnáctém. Současně s tímto autoři popisují, že nárůsty hodnot TAA naměřené u těchto vín mají rozdílné průběhy v závislosti na použité metodě.

Dalším krokem studie Villaña a kol., bylo zhodnotit vliv klarifikace a filtrace vín na hodnoty TAA a TPC. Odzkoušena byla tři v praxi běžně používaná čiridla: gelatin, albumin a bentonit, který byl přidáván do všech vín v posledním kroku. Po dvoudenní klarifikaci byla vína zfiltrována skrz membránový filtr s hydrofilní membránou z polyvinylidenfluoridu o průměru pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a podrobena stanovení TAA a TPC. Získané hodnoty TAA naměřené příslušnými metodami a hodnoty TPC u všech vín vykazovaly mírný pokles, což autoři připisovali právě jejich čiření a zfiltrování.

O široké využitelnosti metody využívající činidla Folin-Ciocalteu svědčí řada prací, z nichž zajímavou je například publikace již zmiňovaného autora Li a spol.<sup>49</sup>, který se ve své práci zabýval stanovením obsahu celkových fenolů a celkové antioxidační aktivity v červených, bílých a růžových vínech z různých geografických oblastí Číny. Pomocí metody

využívající FC činidlo stanovil obsah celkových fenolů, jejichž průměrné hodnoty se u červených vín pohybovaly kolem 2082 mg/l GAE, u vín růžových kolem 913,5 mg/l GAE a u vín bílých kolem 302 mg/l GAE. Li ve své práci vysvětluje, že vysoký obsah celkových polyfenolů u červených vín je zapříčiněn zejména delší macerací semen a slupek bobulí a vyšší teplotou během fermentace, při které se do vína extrahují hlavně taniny a antokyanová barviva.

Srovnáním hodnot celkové antioxidační aktivity a obsahu celkových fenolů pomocí spektrofotometrických metod u 29 vzorků převážně českých vín (8 bílých, 21 červených) se ve své práci zabývali Stratil s kolektivem<sup>81</sup>. Ke stanovení TPC použili klasickou metodu využívající FC činidlo a jako srovnávací pak metodu podle Prince a Butlera (tzv. PB metoda), která byla svými autory primárně popsána pro stanovení celkových taninů<sup>82</sup>. Průměrný obsah celkových fenolů určený těmito metodami se pro bílá vína pohyboval v rozmezí 90 – 119 mg/l GAE (FC metoda) a 90 – 129 mg/l GAE (PB metoda), v případě červených vín pak 874 – 2262 mg/l GAE (FC metoda) a 306 – 816 mg/l GAE (PB metoda). Důvodem rozdílu mezi hodnotami stanovenými metodou FC a metodou PB, je podle autorů rozdílná reaktivita standardu gallové kyseliny s reakčními činidly použitými u příslušné metody.

Stanovení TAA bylo provedeno následujícími třemi metodami: TEAC (metoda ABTS), DPPH, FRAP. Průměrné hodnoty naměřené těmito metodami jsou shrnuty v Tab. 2. Z naměřených dat vyplývá, že hodnoty naměřené metodou TEAC vykazují několika násobně vyšší TAA než jak je tomu v případě metody DPPH a FRAP. Autoři tento jev připisují reaktivitě samotného radikálu ABTS<sup>+</sup>, který dokáže reagovat s největším počtem hydroxylových skupin náležícím polyfenolům přítomným ve víně.

Tabulka 2. Průměrné hodnoty TAA naměřené metodou TEAC, DPPH a FRAP

	<b>TEAC<sup>a)</sup></b>	<b>DPPH<sup>a)</sup></b>	<b>FRAP<sup>a)</sup></b>
<b>Bílá vína</b>	5,14	0,71	1,43
<b>Červená vína</b>	26,44	5,52	9,43

<sup>a)</sup> TAA vyjádřená v mmol/l Troloxu

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Analyzované vzorky, použité chemikálie a přístrojová vybavení

##### 3.1.1 Analyzované vzorky

Tato práce byla zaměřena na sledování změn antioxidační aktivity a hodnoty obsahu celkových fenolů během jednotlivých technologických procesů výroby u tří různých druhů vín (červené víno Frankovka, rosé víno Frankovka, cuveé víno odrůd Rulandské bílé, Tramín červený a Sauvignon). Pro přehlednost jsou jednotlivě odebírané šarže těchto vín, jejich charakteristika a technologické operace, kterým podlehly sepsány níže (vizte Tab. 3, 4, 5). Tato vína byla pěstována na vinicích ve vinařské obci Němčičky, okres Břeclav, Česká republika.

Tabulka 3. Seznam analyzovaných vzorků a jejich charakteristika – červené víno Frankovka

Červené víno Frankovka, cukernatost 23,4 °NM		
Označení vzorku	Datum odběru	Technologická operace
C1	15. 10. 2011	Čerstvý pomletý rmut, bez macerace slupek
C2	16. 10. 2011	Rmut zahříván na teplotu 25 °C, 1-denní macerace slupek
	16. 10. 2011	Zakvášeno čistou kulturou kvasinek <i>Rothweinhaefe</i> , přidána výživa 40 g/hl
C3	21. 10. 2011	Vylisování moštu (téměř hotového vína), poslední fáze kvašení
C4	1. 11. 2011	Stále probíhající kvašení – bez slupek
	4. 11. 2011	Stočení z kvasnic do jiné nádoby
	5. 11. 2011	Zahřívání na 20 °C Přídavek bakterií mléčného kvašení
C5	15. 11. 2011	Stočení do sudů a ukončení procesu jablečno-mléčného kvašení
	24. 1. 2012	Přídavek oxidu siřičitého 10 mg/l
C6	11. 3. 2012	Zrající víno

Tabulka 4. Seznam analyzovaných vzorků a jejich charakteristika – rosé víno Frankovka

<b>Rosé víno Frankovka, cukernatost 23,4°NM</b>		
<b>Označení vzorku</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Technologická operace</b>
<b>R1</b>	15. 10. 2011	Čerstvý pomletý rmut, bez macerace slupek
<b>R2</b>	15. 10. 2011	Mošt po 8 hodinové maceraci při teplotě cca. 12 °C a následné vylisování
<b>R3</b>	16. 10. 2011	Mošt po odkalení a po přidavku bentonitu 150 g/hl
	18. 10. 2011	Cross flow filtrace
	18. 10. 2011	Zakvášeno čistou kulturou kvasinek <i>ANAFERm44</i> a <i>Weissweinhaefe</i> , přidána výživa 60 g/hl
<b>R4</b>	1. 11. 2011	Dokvášení rosé vína, zchlazování pro podporu zastavení kvašení k teplotám 5 °C, stočení z kvasnic
<b>R5</b>	15. 11. 2011	Víno bez filtrace
<b>R6</b>	15. 11. 2011	Cross flow filtrace - membránová filtrace přes síto s průměrem ok 0,2 µm
<b>R7</b>	15. 11. 2011	Desková filtrace pomocí filtračních vložek S30 a ST5
	17. 11. 2011	Přídavek oxidu siřičitého 20 mg/l
	24. 1. 2012	Přídavek oxidu siřičitého 16 mg/l
	12. 2. 2012	Přídavek oxidu siřičitého 13 mg/l
<b>R8</b>	11. 3. 2012	Víno nachystané na lahvování

Tabulka 5. Seznam analyzovaných vzorků a jejich charakteristika – Cuveé víno (odrůd Rulandské bílé, Tramín červený a Sauvignon)

Cuveé víno, cukernatost 25°NM		
Označení vzorku	Datum odběru	Technologická operace
<b>B1</b>	15. 10. 2011	Čerstvý pomletý rmut, bez macerace slupek
<b>B2</b>	15. 10. 2011	Mošt po 12 hodinové maceraci při teplotě cca. 9 °C
<b>B3</b>	16. 10. 2011	Mošt po vylisování, odkalení a po přidavku bentonitu 150 g/hl
	18. 10. 2011	Zakvášeno čistou kulturou kvasinek <i>Weissweihefe</i> , přidána výživa 70 g/hl
	27. 10. 2011	Přídavek oxidu siřičitého 20 mg/l
<b>B4</b>	1. 11. 2011	Přídavek oxidu siřičitého 20 mg/l
<b>B5</b>	15. 11. 2011	Víno bez filtrace
<b>B6</b>	15. 11. 2011	Cross flow filtrace - membránová filtrace přes síto s průměrem ok 0,2 μm
<b>B7</b>	15. 11. 2011	Desková filtrace pomocí filtračních vložek S30 a ST5
	20. 2. 2012	Aplikace bentonitu 40 g/hl
	24. 2. 2012	Přídavek oxidu siřičitého 16 mg/l
<b>B8</b>	11. 3. 2012	Víno nachystané na lahvování

Při optimalizaci doby inkubace v případě metody DPPH byla pro měření použita následující vína: Frankovka (jakostní víno suché, vinařská oblast Kobylí) a Veltlínské zelené (jakostní víno suché, vinařská oblast Velké Bílovice), která byla zakoupena ve velkoobchodní síti Kaufland v Bohumíně. Částečně zkvášený mošt (vinařská oblast Velké Pavlovice), který byl použit na sledování vlivu centrifugace na hodnoty TAA, byl zakoupen ve vinotéce v Olomouci.

### 3.1.2 Použité chemikálie

Při měřeních byly použity následující chemikálie:

- Syntetický radikál DPPH - 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl, (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>, Steinheim, Německo)

- Trolox - 6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, (FLUKA, Buchs, Švýcarsko)
- Methanol - CH<sub>3</sub>OH, (čistota p.a., PENTA, Chrudim, ČR)
- TPTZ – 2,4,6-tris-(2-pyridyl)-s-triazin (SIGMA–ALDRICH<sup>®</sup>, Steinheim, Německo)
- Chlorid železitý – FeCl<sub>3</sub> (čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- Askorbová kyselina – C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, (čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- Gallová kyselina – C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>, (čistota p.a., FLUKA, Buchs, Švýcarsko)
- Kyselina fosforečná (85%) – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, (čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný – NaOH, (čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- Octová kyselina (99%) a octan sodný – CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, (čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (36%) – HCl (čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)

### 3.1.3 Přístrojová vybavení a laboratorní pomůcky

Stanovení antioxidační aktivity a obsahu celkových polyfenolů u jednotlivých vzorků vín bylo prováděno spektrofotometricky pomocí UV/VIS spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) v křemenných kyvetách s optickou drahou o tloušťce 1 cm. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí software UV WinLab a následně graficky a matematicky zpracována programem MS Excel popř. QC Expert 2.5. (Trilobyte s. r. o., Česká republika).

Pro přípravu tlumivých roztoků bylo využito pH–metru InoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 21 (WTW, Německo).

Chemikálie byly váženy na elektronických analytických vahách značky KERN 770/GS/GJ, Max 220 g, d = 0,0001 g (Kern & Sohn, GmbH, Německo).

Vzorky vín byly odstředěny na centrifuze MR23i s výkonným systémem chlazení TF, navržené a zkonstruované firmou JOUAN (JOUAN, TRIGON PLUS s. r. o., Praha ČR).

Pro dosažení úplného rozpuštění daných komponent při přípravě jednotlivých roztoků, byla použita ultrazvuková lázeň značky Polsonic 6 (POLSONIC, Varšava, Polsko).

## 3.2 Přípravy roztoků a úprava vzorků

### 3.2.1 Příprava roztoků

#### 3.2.1.1 Přípravy roztoků pro metodu DPPH

##### *Pracovní roztok volného radikálu DPPH*

Pracovní roztok volného radikálu DPPH o koncentraci  $2,32 \cdot 10^{-4}$  mol/l byl připraven rozpuštěním navážky pevného DPPH v metanolu. Pro dosažení úplného rozpuštění látky byla použita ultrazvuková lázeň.

##### *Kalibrační řada standardu Troloxu*

Zásobní roztok standardu Troloxu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním navážky pevného standardu v destilované vodě (příp. 100% či 25% metanolu). Pro dosažení úplného rozpuštění látky byl roztok na 5 minut ponořen do ultrazvukové lázně. Roztoky o koncentraci  $7,5 \cdot 10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-4}$ ;  $1 \cdot 10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l byly získány postupným ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou (příp. 100% či 25 % metanolem).

##### *Příprava fosfátového tlumivého roztoku*

Fosfátový tlumivý roztok o pH = 7,00 byl připraven titrací roztoku 0,1 mol/l kyseliny fosforečné předem připraveným 50% roztokem hydroxidu sodného s použitím pH metru.

#### 3.2.1.2 Přípravy roztoků pro metodu FRAP

##### *Příprava pracovního roztoku FRAP*

Pracovní roztok FRAP byl připraven smícháním 10 dílů acetátového pufru o pH = 3,6, 1 dílu 10 mmol/l roztoku TPTZ rozpuštěného v 40 mmol/l HCl a 1 dílu 20 mmol/l vodného roztoku FeCl<sub>3</sub>. K dokonalejšímu rozpuštění komponent byla jak v případě přípravy roztoku TPTZ, tak v případě přípravy roztoku FeCl<sub>3</sub> opět použita ultrazvuková lázeň.

##### *Příprava acetátového tlumivého roztoku*

Acetátový tlumivý roztok (300 mmol/l) o pH = 3,6 byl připraven navážením vypočteného množství octanu sodného (m = 1,55 g) a jeho rozpuštěním v destilované vodě.

Následně bylo přidáno 8 ml octové kyseliny a roztok byl v 500 ml odměrné baňce doplněn po rysku destilovanou vodou.

#### ***Kalibrační řada standardu Troloxu***

Zásobní roztok standardu Troloxu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním navážky pevného standardu v destilované vodě. Pro dosažení úplného rozpuštění látky byl roztok na 5 minut ponořen do ultrazvukové lázně. Roztoky o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-4}$ ;  $1 \cdot 10^{-4}$ ;  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l byly získány postupným ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou.

#### ***Kalibrační řada askorbové kyseliny***

Zásobní roztok standardu askorbové kyseliny o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním navážky pevného standardu v destilované vodě. Roztoky o koncentraci  $7,5 \cdot 10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-4}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l byly získány postupným ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou.

### **3.2.1.3 Přípravy roztoků pro stanovení celkových fenolů (TPC)**

#### ***Kalibrační řada standardu gallové kyseliny***

Zásobní roztok standardu gallové kyseliny o koncentraci 20 mg/l byl připraven rozpuštěním navážky pevného standardu v destilované vodě. Roztoky o koncentraci 14; 10; 6; 4; 2 mg/l byly získány postupným ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou.

## **3.2.2 Úprava vzorků**

Jednotlivé vzorky vín (C1 – C6, R1 – R8, B1 – B8) byly ihned po odebrání do plastových nádobek zamrazeny a uchovávány v mrazničce. Před každou analýzou byly jednotlivé vzorky rozmrazeny, podrobeny jednotlivým krokům úpravy a následně ihned analyzovány.

Prvním krokem úpravy vzorků byla centrifugace. Po rozmražení byly vzorky promíchány, odebrány do polypropylenových mikrozkmavek typu eppendorf a podrobeny odstředění na centrifuze značky JOUAN (nastavené parametry: 10000 rpm, 10 min., 4°C).

Následně bylo provedeno ředění předem připravenými tlumivými roztoky. Reálné vzorky vín po centrifugaci byly ředěny v objemových poměrech 1:5, 1:10 a v případě červených vín 1:20 (víno:tlumivý roztok) vždy před samotným měřením příslušnými tlumivými roztoky. Pro metodu DPPH byl k ředění použit fosfátový tlumivý roztok (pH = 7,00), pro metodu FRAP pak acetátový tlumivý roztok (pH = 3,6). Stejný postup ředění byl u obou metod použit i pro vzorky necentrifugované.

V případě stanovení celkových fenolů (TPC) bylo ředění analyzovaných vzorků vín prováděno destilovanou vodou a to následovně: červená vína byla ředěna 100x, růžová vína 50x a bílá vína 25x. V případě červených vín bylo do 10 ml odměrné baňky napipetováno 100  $\mu$ l vzorku vína, v případě růžových vín 200  $\mu$ l vzorku vína a v případě vín bílých 400  $\mu$ l vzorku vína. Odměrné baňky byly následně doplněny destilovanou vodou po rysku.

### **3.3 Pracovní postupy**

#### **3.3.1 Optimalizace kalibračních závislostí**

##### **3.3.1.1 Kalibrační závislosti použité při metodě DPPH**

Jako kalibrační standard, ze kterého byla při metodě DPPH sestavována kalibrační závislost, byl použit syntetický derivát vitamínu E Trolox v jehož ekvivalentech je TAA nejčastěji vyjadřována. Kalibrační závislost byla měřena po rozpuštění tohoto standardu ve třech různých prostředích (destilovaná voda, 25% metanol a 100% metanol). Studovány byly také rozdílné koncentrační rozsahy kalibrací. K samotnému měření bylo v 10 ml odměrných baňkách smícháno 6,5 ml metanolickeho roztoku DPPH, 2,5 ml fosfátového tlumivého roztoku o pH = 7,00 a 1 ml standardu Troloxu o příslušné koncentraci. Po 30 minutové době inkubace byl měřen pokles absorbance při konstantní vlnové délce 519 nm vůči slepému pokusu (srovnávací květa obsahovala 2 ml metanolu a 1 ml fosfátového tlumivého roztoku) Naměřená data byla zpracována jako závislost absorbance na koncentraci Troloxu.

### **3.3.1.2 Kalibrační závislosti použité při metodě FRAP**

V první fázi měření byl pro metodu FRAP stejně jako u metody DPPH vybrán jako kalibrační standard Trolox. V druhé fázi byl odzkoušen a úspěšně použit standard askorbové kyseliny. V případě této metody byly také studovány rozdílné koncentrační rozsahy kalibrací. K samotnému měření bylo v 10 ml odměrných baňkách smícháno 6 ml pracovního roztoku FRAP a 200  $\mu$ l příslušného standardu. Odměrné baňky byly promíchány a temperovány po dobu 30 minut při 37 °C. Následně byl měřen nárůst absorbance při konstantní vlnové délce 593 nm vůči slepému pokusu (srovnávací kyveta obsahovala acetátový tlumivý roztok). Naměřená data byla zpracována jako závislost absorbance na koncentraci příslušného standardu.

### **3.3.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity (TAA) reálných vzorků vín**

Při stanovení celkové antioxidační aktivity analyzovaných vzorků vín (centrifugovaných i necentrifugovaných) byly použity dvě rozdílné metody. Principem první použité metody, a to metody DPPH, je hodnocení inaktivace volných radikálů prostřednictvím antioxidantů přítomných ve víně. Principem metody FRAP je pak hodnocení redukční schopnosti antioxidantů obsažených ve víně.

#### **3.3.2.1 Pracovní postup metody DPPH**

Ke stanovení schopnosti antioxidantů přítomných ve víně zhášet volné radikály, byla použita metoda využívající syntetický stabilní volný radikál DPPH (viz. citace<sup>70</sup>).

Do 10 ml odměrných baněk bylo napipetováno vždy 6,5 ml metanolickeho roztoku volného radikálu DPPH, 2,5 ml fosfátového tlumivého roztoku o pH = 7,00 a 1 ml adekvátně naředěného vzorku vína (v případě kalibrační řady pak 1 ml standardu Troloxu o příslušné koncentraci). Odměrné baňky byly promíchány a inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí požadované doby inkubace byly jednotlivé vzorky spolu s kalibrační řadou Troloxu (kalibrační rozsah  $1 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) proměřeny v křemenných kyvetách při konstantní vlnové délce 519 nm proti slepému pokusu (srovnávací kyveta obsahovala 2 ml metanolu a 1 ml fosfátového tlumivého roztoku).

S využitím naměřených hodnot absorbancí a vypočtené rovnice lineární regrese pak byla vypočtena antioxidační aktivita jednotlivých vzorků vín vyjádřená v jednotkách standardu Troloxu (v mmol/l Troloxu) a přepočtená na neředěné víno.

### **3.3.2.2 Pracovní postup metody FRAP**

Při metodě FRAP (upravené podle citace<sup>74</sup>) byla měřena změna absorbance při konstantní vlnové délce 593 nm způsobená jednoelektronovou redukcí původně žlutooranžového komplexu Fe(III)-TPTZ na modrý Fe(II)-TPTZ.

V 10 ml odměrných baňkách bylo vždy smícháno 6 ml pracovního roztoku FRAP a 200 µl adekvátně naředěného vzorku vína (v případě kalibrační řady pak 200 µl standardu askorbové kyseliny o příslušné koncentraci). Odměrné baňky byly promíchány a temperovány po dobu 30 minut při 37 °C. Následně byly jednotlivé vzorky spolu s kalibrační řadou standardu askorbové kyseliny (kalibrační rozsah  $1 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) proměřeny v křemenných kyvetách při konstantní vlnové délce 593 nm vůči slepému pokusu (srovnávací kyveta obsahovala acetátový tlumivý roztok).

S využitím naměřených hodnot absorbancí a vypočtené rovnice lineární regrese pak byla vypočtena antioxidační aktivita jednotlivých vzorků vín vyjádřená v jednotkách standardu askorbové kyseliny (v mmol/l askorbové kyseliny) a přepočtená na neředěné víno.

### **3.3.3 Stanovení obsahu celkových fenolů (TPC)**

Celkový obsah fenolů byl stanoven velmi jednoduchou metodou (upravenou podle citace<sup>64</sup>). Tato metoda je založena na měření absorbance vzorků vín při konstantní vlnové délce 280 nm, která je právě spojována s celkovým obsahem fenolů. Vzorky vín byly adekvátně naředěny v 10 ml odměrných baňkách. Následně byla u těchto vzorků proměřena absorbance při konstantní vlnové délce 280 nm spolu s kalibrační řadou standardu gallové kyseliny (kalibrační rozsah 2 – 14 mg/l). Naměřené hodnoty absorbancí byly přepočteny prostřednictvím kalibrační křivky a rovnice lineární regrese a konečné hodnoty obsahu celkových fenolů přepočtené na neředěné víno byly vyjádřeny v ekvivalentech standardu gallové kyseliny (v mg/l gallové kyseliny). Stanovení jednotlivých vzorků byla prováděna v tripletech.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Optimalizace podmínek měření

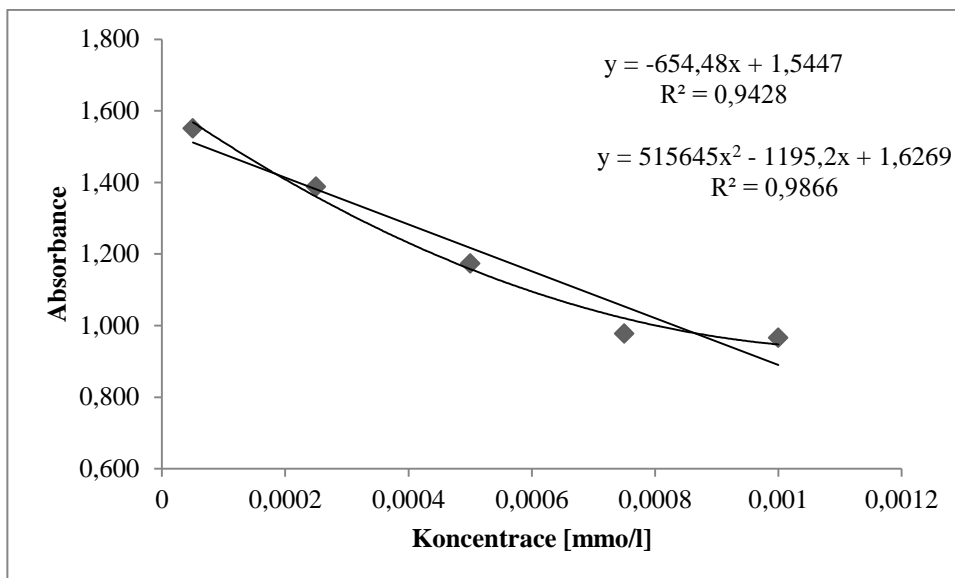
#### 4.1.1 Kalibrační závislosti

Kalibrační standard Trolox byl vybrán jako standardní antioxidační látka pro metodu DPPH. Jelikož však tento syntetický derivát vykazoval při koncentracích vyšších než  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l omezenou rozpustnost ve vodném prostředí, byla odzkoušena jeho rozpustnost také ve 100%-ním a posléze 25%-ním metanolu, který byl shledán jako rozpouštědlo nejvhodnější pro přípravu kalibračních roztoků pro tuto metodu. Z výše uvedených důvodů bylo také nutno upravit koncentrační rozsah kalibrace na konečných  $1 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l.

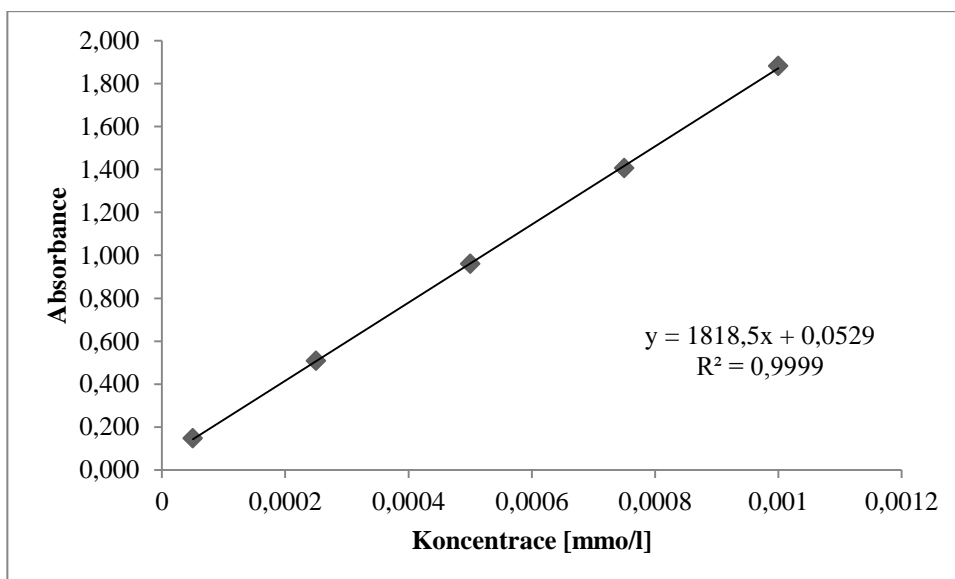
V případě metody FRAP byl standard Trolox také odzkoušen. Vzhledem k tomu, že se ale při této metodě pracuje převážně ve vodném prostředí, byl tento standard nahrazen askorbovou kyselinou, která je velmi dobře rozpustná ve vodě a její kalibrační závislost vykazuje mnohem vyšší linearitu (koeficient determinace  $R^2 = 0,9999$ ), než-li tomu bylo v případě Troloxu (koeficient determinace  $R^2 = 0,9176$ ). Kalibrační rozsah askorbové kyseliny byl upraven na konečných  $1 \cdot 10^{-3}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l.

Hodnoty obsahu celkových fenolů byly vztaženy na standard gallové kyseliny podle citace<sup>64</sup>.

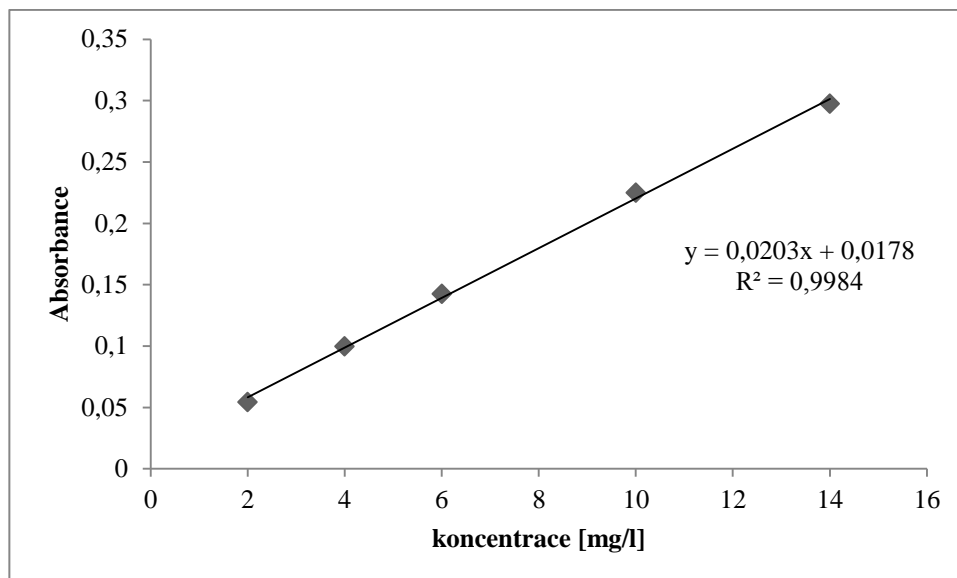
Kalibrační křivka, rovnice lineární regrese a koeficient determinace  $R^2$  standardu Troloxu používaná při metodě DPPH, standardu askorbové kyseliny používaná při metodě FRAP a standardu gallové kyseliny používané při stanovení obsahu celkových fenolů jsou zobrazeny na Obr. 8, 9 a 10.



Obrázek 8. Kalibrační křivka standardu Troloxu – metoda DPPH



Obrázek 9. Kalibrační křivka standardu askorbové kyseliny – metoda FRAP



Obrázek 10. Kalibrační křivka standardu gallové kyseliny – metoda stanovení TPC

#### 4.1.2 Optimalizace doby inkubace pro metodu DPPH

Byl sledován vliv doby inkubace ( $t = 10 - 60$  min) na hodnotu TAA dvou vybraných modelových vzorků vín: Frankovka (jakostní víno suché, vinařská oblast Kobylí), Veltlínské zelené (jakostní víno suché, vinařská oblast Velké Bílovice). Vína byla naředěna v poměru 1:5 fosfátovým tlumivým roztokem a následně proměřena po odpovídající době inkubace na UV/Vis spektrofotometru postupem metody DPPH. Hodnoty TAA vybraných vzorků vín byly vypočteny z rovnice lineární regrese standardu Troloxu a přepočteny na víno neředěné (vizte Tab. 6). Z naměřených výsledků vyplývá, že antioxidační aktivita je nejvyšší při době inkubace  $t = 10$  min a postupně klesá. Pro další měření byla vybrána doba inkubace 30 min vzhledem k citaci<sup>81</sup>.

Tabulka 6. Vliv doby inkubace na hodnoty TAA vína Frankovka a Veltlínské zelené

Doba inkubace	Frankovka TAA [mmol/l Troloxu]	Veltlínské zelené TAA [mmol/l Troloxu]
10 min	4,81	2,17
20 min	4,68	1,98
30 min	4,57	1,87
40 min	4,52	1,50
50 min	4,50	1,31
60 min	4,32	- <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> mimo rozsah kalibrace

#### 4.1.3 Vliv centrifugace na hodnotu TAA

Byl studován vliv centrifugace na hodnotu TAA u vzorku částečně zkvašeného moštu révy vinné („burčák“, vinařská oblast Velké Pavlovice), zakoupeného v olomoucké vinotéce. Důvodem této studie byl předpoklad, že vzorky (C1-C3, R1-R3 a B1-B3) odebrané v první fázi výroby vína mohou být zakalené vlivem přítomnosti pevných částic rozptýlených v roztoku. Při tomto měření bylo využito metody DPPH a FRAP (postup dle: vizte kapitolu 3.3.2) a výsledné hodnoty byly vyjádřeny u obou metod v ekvivalentech standardu Troloxu (mmol/l Troloxu). Z naměřených hodnot vyplývá (vizte Tab. 7), že TAA vzorků centrifugovaných vykazuje u obou metod vyšší hodnoty než u vzorků necentrifugovaných. Tento jev je zřejmě způsobem přítomností pevných částic v moštu. Rozptyl světla na těchto částicích totiž způsobí, že na detektor dopadá světlo s nižší intenzitou, což odpovídá vyšší absorpci záření a rozdílné naměřené absorbanci mezi vzorky centrifugovanými a necentrifugovanými. Vzorky byly stanovovány ve dvou paralelních měřeních po jejich nařazení v poměru 1:5 příslušnými pufry.

Tabulka 7. Vliv centrifugace na hodnoty TAA burčáku určené metodou DPPH a FRAP

DPPH TAA [mmol/l Troloxu]		FRAP TAA [mmol/l Troloxu]	
Před centrifugací	Po centrifugaci	Před centrifugací	Po centrifugaci
2,024	2,41	1,39	1,40
2,147	2,45	1,51	1,55

#### 4.1.4 Opakovatelnost metody DPPH, FRAP a metody stanovení TPC

Z naměřených hodnot absorbancí pro jednotlivá ředění vybraných modelových vzorků vín byla vypočtena relativní směrodatná odchylka (RSD), odrážející preciznost (dříve přesnost) metody za podmínek opakovatelnosti (vizte Tab. 8, 9, 10). RSD byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (11)$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr ze sedmi opakování pro metody DPPH a FRAP popř. deseti opakování pro metodu stanovení TPC.

Tabulka 8. Opakovatelnost metody DPPH vyjádřená formou výpočtu RSD

Vzorek vína	Počet opakování	Ředění vína [v/v]	Relativní směrodatná odchylka [%]
<b>B6</b>	7	1:5	1,51
		1:10	0,40
<b>R8</b>	7	1:5	0,93
		1:10	0,34
<b>C6</b>	7	1:5	0,45
		1:10	0,74

Tabulka 9. Opakovatelnost metody FRAP vyjádřená formou výpočtu RSD

Vzorek vína	Počet opakování	Ředění vína [v/v]	Relativní směrodatná odchylka [%]
<b>B6</b>	7	1:5	1,06
		1:10	3,77
<b>R8</b>	7	1:5	2,42
		1:10	1,76
<b>C6</b>	7	1:5	0,28
		1:10	1,41

Tabulka 10. Opakovatelnost metody stanovení TPC vyjádřená formou výpočtu RSD

Vzorek vína	Počet opakování	Ředění vína	Relativní směrodatná odchylka [%]
<b>B8</b>	10	25x	4,88
<b>R8</b>	10	50x	3,36
<b>C6</b>	10	100x	3,02

## 4.2 Souhrn naměřených výsledků

### 4.2.1 Stanovení antioxidační aktivity a obsahu celkových fenolů

U 22 vybraných vzorků vín (C1 – C6, R1 – R8, B1 – B8) odebraných při různých fázích výroby červeného, růžového a bílého vína byla pomocí metody DPPH a metody FRAP stanovena celková antioxidační aktivita vyjádřená v ekvivalentech příslušného standardu. TAA těchto vzorků vín byla stanovována před i po jejich centrifugaci a to vždy pro dvě různá ředění (1:5 a 1:10). Výsledné hodnoty z provedených měření jsou shrnuty v tabulkách pod textem (vizte Tab. 11, 12, 13). Grafická znázornění změn TAA v průběhu výroby jednotlivých vín jsou součástí přílohy 1.

Současně byl pro tyto vzorky stanoven obsah celkových fenolů. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako průměr ze tří měření, doplněny vypočtenou relativní směrodatnou odchylkou RSD a vyjádřeny v jednotkách standardu gallové kyseliny. Konečné hodnoty z provedených měření jsou shrnuty v Tab. 14. Grafická znázornění změn TPC v průběhu výroby jednotlivých vín jsou součástí přílohy 2.

Tabulka 11. Hodnoty TAA určené metodou DPPH a FRAP pro červené víno Frankovka

TAA								
Vzorek	Před centrifugací				Po centrifugaci			
	Ředění 1:5		Ředění 1:10		Ředění 1:5		Ředění 1:10	
	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>
C1	4,53	4,90	8,87	7,79	4,44	4,84	8,51	5,13
C2	4,37	7,97	8,43	10,19	4,39	7,62	8,63	9,74
C3	4,35	8,95	8,67	11,55	4,29	8,46	8,63	10,63
C4	4,01	7,46	8,45	9,87	4,02	7,28	8,71	9,72
C5	3,77	7,42	8,24	9,43	3,78	7,39	8,27	9,07
C6	4,38	6,44	8,97	7,96	4,26	6,42	8,60	7,87

<sup>a)</sup> TAA vyjádřená v mmol/l Troloxu

<sup>b)</sup> TAA vyjádřená v mmol/l askorbové kyseliny

Tabulka 12. Hodnoty TAA určené metodou DPPH a FRAP pro rosé víno Frankovka

TAA								
Vzorek	Před centrifugací				Po centrifugaci			
	Ředění 1:5		Ředění 1:10		Ředění 1:5		Ředění 1:10	
	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>
<b>R1</b>	4,20	2,96	3,04	3,57	3,49	2,44	2,74	2,98
<b>R2</b>	4,54	2,68	4,83	2,85	4,42	2,51	3,74	2,79
<b>R3</b>	3,67	2,19	4,24	2,43	3,57	1,97	3,58	2,10
<b>R4</b>	5,06	2,10	2,78	2,56	5,02	2,06	2,76	2,50
<b>R5</b>	4,00	1,67	3,95	2,04	3,55	1,49	3,71	1,99
<b>R6</b>	2,99	2,38	3,00	2,64	2,95	2,21	2,94	2,57
<b>R7</b>	2,92	1,81	1,40	2,01	2,92	1,79	1,00	2,01
<b>R8</b>	4,48	4,89	4,70	4,60	4,34	4,94	4,57	5,78

<sup>a)</sup> TAA vyjádřená v mmol/l Troloxu

<sup>b)</sup> TAA vyjádřená v mmol/l askorbové kyseliny

Tabulka 13. Hodnoty TAA určené metodou DPPH a FRAP pro bílé víno cuvéé

TAA								
Vzorek	Před centrifugací				Po centrifugaci			
	Ředění 1:5		Ředění 1:10		Ředění 1:5		Ředění 1:10	
	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>	DPPH <sup>a)</sup>	FRAP <sup>b)</sup>
<b>B1</b>	4,29	3,23	7,32	3,53	4,08	2,03	6,82	2,67
<b>B2</b>	3,70	2,04	5,05	2,66	3,49	1,98	4,31	2,59
<b>B3</b>	3,21	2,11	3,47	2,70	2,87	1,78	3,35	2,64
<b>B4</b>	3,14	1,87	2,79	1,90	3,01	1,77	3,05	1,89
<b>B5</b>	3,32	1,71	2,81	2,25	2,93	1,55	2,10	2,06
<b>B6</b>	2,77	1,60	2,71	1,39	2,30	1,59	2,24	1,27
<b>B7</b>	2,87	1,67	2,96	1,86	2,64	1,53	2,97	1,66
<b>B8</b>	3,65	1,86	4,02	1,56	3,36	1,45	3,86	1,48

<sup>a)</sup> TAA vyjádřená v mmol/l Troloxu

<sup>b)</sup> TAA vyjádřená v mmol/l askorbové kyseliny

Tabulka 14. Hodnoty TPC pro červené víno Frankovka, rosé víno Frankovka a bílé víno cuveé

TPC <sup>a)</sup>					
Vzorek	Červené víno Frankovka	Vzorek	Rosé víno Frankovka	Vzorek	Bílé víno cuveé
<b>C1</b>	665,02 ± 10,34	<b>R1</b>	277,67 ± 3,82	<b>B1</b>	205,09 ± 6,94
<b>C2</b>	943,84 ± 6,65	<b>R2</b>	265,19 ± 4,89	<b>B2</b>	154,39 ± 3,05
<b>C3</b>	1067,49 ± 0,30	<b>R3</b>	210,34 ± 6,65	<b>B3</b>	128,08 ± 5,28
<b>C4</b>	1052,71 ± 0,21	<b>R4</b>	222,74 ± 1,23	<b>B4</b>	141,34 ± 2,57
<b>C5</b>	1065,35 ± 1,69	<b>R5</b>	278,24 ± 4,88	<b>B5</b>	134,20 ± 1,82
<b>C6</b>	865,52 ± 2,49	<b>R6</b>	245,32 ± 2,03	<b>B6</b>	136,17 ± 0,78
		<b>R7</b>	218,06 ± 1,65	<b>B7</b>	147,54 ± 1,46
		<b>R8</b>	241,46 ± 3,00	<b>B8</b>	143,72 ± 3,79

<sup>a)</sup> TPC vyjádřená v mg/l gallové kyseliny (x ± RSD)

Z naměřených výsledků vyplývá, že změny hodnot obsahu celkových fenolů TPC a změny hodnot TAA stanovené metodou FRAP (po centrifugaci, ředění 1:5) v případě **červeného vína** obecně odpovídají jednotlivým krokům výroby tohoto vína (vizte přílohu 1, 2). První nárůst hodnoty TPC a TAA mezi vzorky C1 a C2 se dá přisoudit zvýšené extrakci polyfenolických sloučenin, ke které dochází při maceraci rmutu. Druhý nárůst (mezi vzorky C2 a C3) pak odpovídá provedenému vylisování rmutu spojenému s dalším uvolňováním těchto sloučenin ze slupek, které také vede ke zvýšení jejich obsahu v moštu. První mírný pokles hodnot TPC a TAA u vzorků C4 a C5 by mohl být zapříčiněn prodělaným stáčením téměř hotového vína z kvasnic. Při tomto procesu se totiž mohou některé polyfenolické sloučeniny na těchto kvasnicích zachytit a způsobit tak zmíněný pokles hodnot. Druhý mírný pokles mezi vzorky C5 a C6 je přisuzován pravděpodobně samotnému zrání vína v sudech. Dřevo je totiž slabě pórovitý materiál, který umožňuje pomalý přechod malých dávek kyslíku do vína. Oxidační děje, které probíhají ve víně v průběhu zrání v sudu, pak mohou vést ke snížení obsahu fenolických sloučenin a s tím spojeným poklesem hodnoty TAA.

Hodnoty TAA stanovené v průběhu výroby červeného vína metodou DPPH však výše popsaným průběhům změn neodpovídají (vizte přílohu 1.). Naměřené hodnoty se totiž příliš nemění a nelze v nich tedy vystopovat žádný trend. Tento fakt může být dán samotným principem použité metody. Přestože vzorky červeného vína vykazovaly značné odbarvování červenofialového roztoku volného radikálu DPPH, přítomnost samotného zabarvení

červeného vína mohla způsobit, že naměřené hodnoty absorpance nevykazovaly přílišné změny, což se posléze odrazilo i na vypočtených hodnotách TAA.

Naměřené hodnoty TAA (metodou DPPH a FRAP, po centrifugaci a ředění 1:5) a TPC v případě **ružového vína** také do jisté míry odpovídají technologii výroby tohoto vína (vizte přílohy 1, 2). První mírný nárůst hodnot TAA u obou použitých metod mezi vzorky R1 a R2 se dá přisoudit maceraci a následnému vylisování rmutu, při kterém se do vína polyfenolické látky extrahují. Zajímavým je pokles hodnot TAA a TPC mezi vzorky R2 a R3. Ten by mohl být zapříčiněn odkalením moštu a přidávkem bentonitu. Přestože se bentonit přidává do vína primárně za účelem snížení obsahu termolabilních bílkovin a nikoliv za účelem snížení obsahu polyfenolů, mohl způsobit navázání těchto sloučenin a tím snížení jejich obsahu, což se sekundárně projevilo i na hodnotách TAA a TPC. Hodnoty TPC a TAA naměřené metodou FRAP u vzorku R4 jsou nižší než v případě vzorku R2, což obecně odpovídá domněnce adsorpce fenolických sloučenin na kvasinky, které následně sedimentují. Hodnoty TPC vzorku R5 odpovídají dokvašenému vínu, u kterého nebyla provedena filtrace, proto jsou tyto hodnoty vyšší v porovnání se vzorky R6 a R7. Pokles hodnot TPC mezi vzorky R6 a R7 pak poukazuje na vliv filtrace vína. Při filtraci vína totiž může docházet ke strhávání a záchytu polyfenolů na membránách filtru, což může vést ke snížení celkového obsahu těchto látek ve víně. Poslední, skoro dvojnásobný nárůst hodnot TAA mezi vzorky R7 a R8 by mohl odpovídat vlivu přídavku oxidu siřičitého, který podle některých autorů (např. Fic a kolektiv<sup>36</sup>) určitým podílem přispívá k celkové antioxidační aktivitě. Do jaké míry však oxid siřičitý ovlivňuje reakční mechanismus u námi zvolených metod, však nebylo prozkoumáno a mohlo by to tedy být námětem pro další studie.

V případě **bílého vína** byla nejvyšší hodnota TAA a TPC naměřena u vzorku B1 (vizte přílohy 1, 2). Z hlediska technologického postupu výroby tohoto vína je však tento jev nejasný vzhledem k tomu, že vyšší hodnoty by měl spíše vykazovat vzorek B2, který byl odebrán po maceraci rmutu, která jak již bylo zmíněno, vede ke zvýšené extrakci polyfenolických sloučenin. Naměřené hodnoty tedy nutně nemusejí zcela přesně odrážet skutečnou situaci ve vzorku v době jeho odebrání, jelikož při samotné manipulaci se vzorkem (jeho zamrazování a rozmrazování) může dojít k oxidačním reakcím, které mohou mít vliv na výsledky měření. Následující vzorek B3 vykazuje jak v případě stanovení TAA, tak v případě

stanovení TPC mírný pokles hodnot, který by mohl být opět důvodem adsorpce polyfenolických sloučenin na přidaný bentonit. Mírný nárůst hodnot mezi vzorky B3 a B4 pak poukazuje na již zmíněný možný vliv přídavku oxidu siřičitého. Mírný pokles hodnot TPC mezi vzorky B4 a B6 je přisuzován zfiltrování vína. V dalším průběhu se však použité metody neshodují.

Li a kol.<sup>49</sup> uvádí průměrné hodnoty obsahů celkových fenolů u červených vín 2082 mg/l GAE, u vín růžových 913,5 mg/l GAE a u vín bílých 302 mg/l GAE. Z výsledků této předložené práce však vyplývá, že námi zkoumané vzorky vín se co do hodnot obsahu celkových fenolů pohybují pod průměrnou hodnotou pro tato vína ve srovnání s výsledky výše uvedeného autora. Námi použitou metodou byl průměrný obsah celkových fenolů stanoven na 943,35 mg/l GAE u vína červeného, 244,88 mg/l GAE u vína růžového a 148,83 mg/l GAE u vína bílého. Hodnotami pro červená a bílá vína se tedy spíše blížíme výsledkům autorů Stratil a kol.<sup>81</sup>, kteří metodou využívající FC činidlo stanovili obsah celkových fenolů u vín červených v rozsahu 874 – 2262 mg/l GAE a u vín bílých v rozsahu 90 – 119 mg/l GAE.

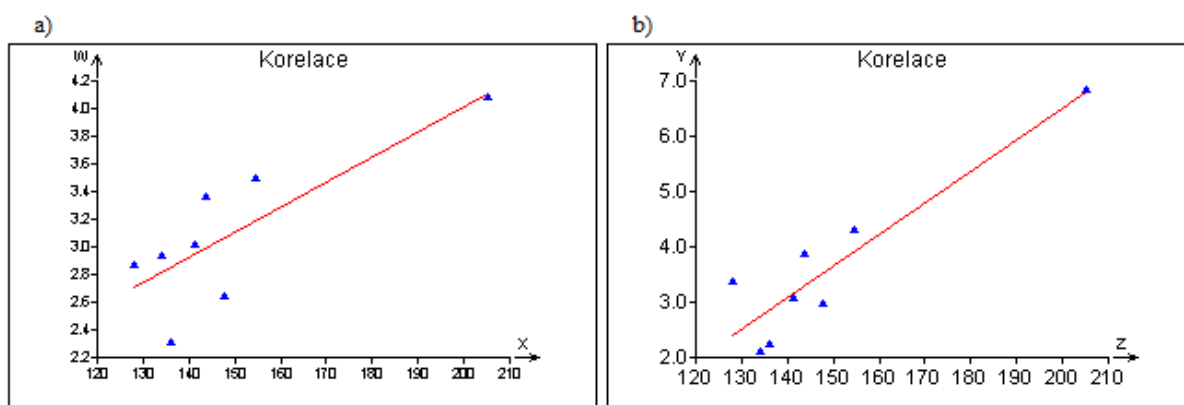
### 4.3 Porovnání metod

Korelační analýzou byl hodnocen vzájemný vztah mezi výsledky TAA získanými metodami DPPH a FRAP a výsledky stanovení TPC, které byly naměřeny v průběhu výroby jednotlivých vín. Porovnán byl také vzájemný vztah mezi výsledky TAA stanovenými oběma spektrálními metodami (DPPH, FRAP). Jednotlivé korelační závislosti byly hodnoceny prostřednictvím výpočtu Spearmanova a párového korelačního koeficientu (vizte Tab. 15, 16, 17) a testováním jejich významnosti v programu QC. Expert 2.5. Hodnoty korelačních koeficientů, které byly shledány jako statisticky významné, jsou v tabulkách označeny tučně. Grafické znázornění korelačních analýz bylo vyjádřeno formou korelačních grafů a to pouze pro ukázkou v několika vybraných případech, kde byla prokázána významnější korelace mezi sledovanými hodnotami.

Tabulka 15. Vypočtené korelačních koeficienty pro hodnoty TPC v porovnání s hodnotami TAA stanovenými metodou DPPH

	Úprava vína	Spearmanův korelační koeficient	Párový korelační koeficient
<b>Červené víno</b>	A	<b>-0,829</b>	-0,709
	B	-0,543	-0,698
	C	-0,543	-0,660
	D	0,314	0,004
<b>Rosé víno</b>	A	0,238	0,229
	B	0,262	0,320
	C	-0,048	-0,026
	D	0,238	0,321
<b>Bílé víno</b>	A	0,524	<b>0,788</b>
	B	0,643	<b>0,915</b>
	C	0,643	<b>0,802</b>
	D	0,667	<b>0,917</b>

A – necentrifugované, ředění 1:5; B - necentrifugované, ředění 1:10; C – centrifugované, ředění 1:5; D centrifugované, ředění 1:10

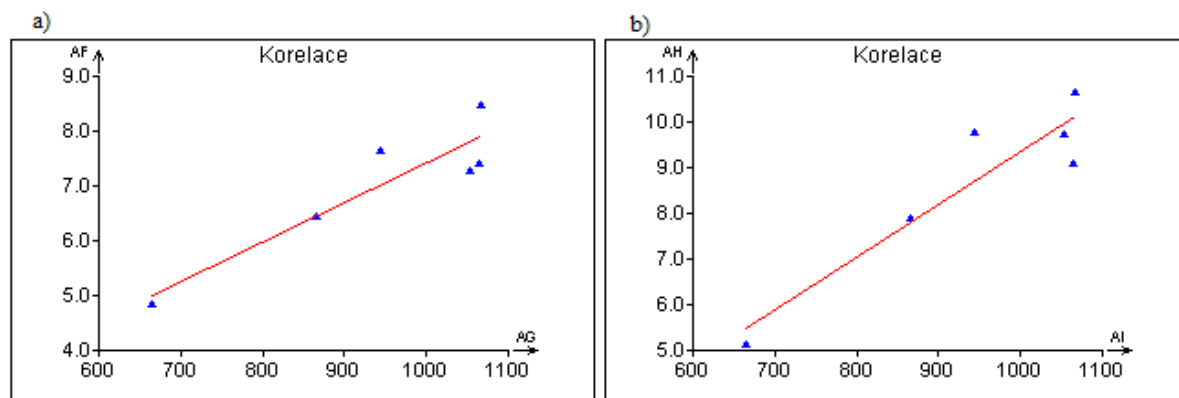


Obrázek 11. Korelační graf: a) Hodnoty TPC vs. hodnoty TAA stanovené metodou DPPH (bílé víno centrifugované, ředění 1:5); b) Hodnoty TPC vs. hodnoty TAA stanovené metodou DPPH (bílé víno centrifugované, ředění 1:10)

Tabulka 16. Vypočtené korelačních koeficienty pro hodnoty TPC v porovnání s hodnotami TAA stanovenými metodou FRAP

	Úprava vína	Spearmanův korelační koeficient	Párový korelační koeficient
<b>Červené víno</b>	A	0,771	<b>0,883</b>
	B	0,771	0,783
	C	<b>0,829</b>	<b>0,918</b>
	D	0,771	<b>0,931</b>
<b>Rosé víno</b>	A	0,119	0,109
	B	0,310	0,209
	C	0,143	0,016
	D	0,167	0,088
<b>Bílé víno</b>	A	0,286	<b>0,888</b>
	B	0,190	0,690
	C	0,286	0,633
	D	0,190	0,428

A – necentrifugované, ředění 1:5; B - necentrifugované, ředění 1:10; C – centrifugované, ředění 1:5; D centrifugované, ředění 1:10

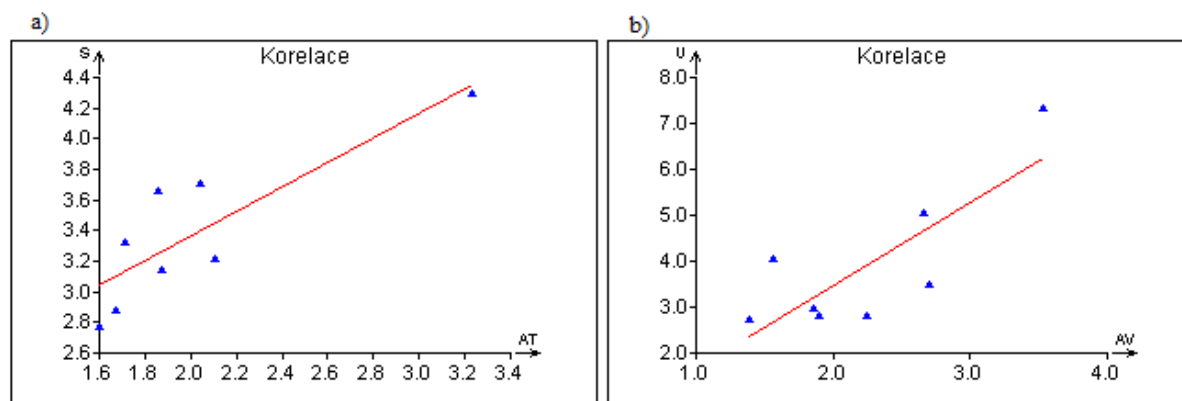


Obrázek 12. Korelační graf: a) Hodnoty TPC vs. hodnoty TAA stanovené metodou FRAP (červené víno centrifugované, ředění 1:5); b) Hodnoty TPC vs. hodnoty TAA stanovené metodou FRAP (červené víno centrifugované, ředění 1:10)

Tabulka 17. Vypočtené korelační koeficienty pro hodnoty TAA stanovené metodou DPPH v porovnání s hodnotami TAA stanovenými metodou FRAP

	Úprava vína	Spearmanův korelační koeficient	Párový korelační koeficient
Červené víno	A	-0,486	-0,326
	B	-0,429	-0,517
	C	-0,143	-0,332
	D	0,657	0,261
Rosé víno	A	0,357	0,350
	B	0,524	0,453
	C	0,381	0,367
	D	0,310	0,572
Bílé víno	A	<b>0,738</b>	<b>0,846</b>
	B	0,643	<b>0,802</b>
	C	0,476	0,647
	D	0,190	0,428

A – necentrifugované, ředění 1:5; B - necentrifugované, ředění 1:10; C – centrifugované, ředění 1:5; D centrifugované, ředění 1:10



Obrázek 13. Korelační graf: a) Hodnoty TAA stanovené metodou DPPH vs. hodnoty TAA stanovené metodou FRAP (bílé víno necentrifugované, ředění 1:5); b) Hodnoty TAA stanovené metodou DPPH vs. hodnoty TAA stanovené metodou FRAP (bílé víno necentrifugované, ředění 1:10)

Na základě provedené korelační analýzy byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace mezi hodnotami TPC a hodnotami TAA naměřenými metodou DPPH a to konkrétně v případě bílého vína centrifugovaného i necentrifugovaného při ředění 1:5 i 1:10 (vizte Obr. 11). Významná pozitivní korelace byla také nalezena při porovnání vzájemného vztahu mezi hodnotami TPC a hodnotami TAA naměřenými metodou FRAP pro červené víno centrifugované při ředění 1:5 i 1:10 (vizte Obr. 12).

Při vzájemném porovnání výsledků TAA v rámci obou metod, použitých v této studii k jejímu stanovení, tedy metody DPPH a FRAP, pak byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace pouze v případě vína bílého necentrifugovaného při ředění 1:5 a 1:10 (vizte Obr. 13).

## 5. ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce bylo stanovení celkové antioxidační aktivity (TAA) a stanovení celkového obsahu fenolů (TPC) u tří různých druhů vín (červené víno Frankovka, rosé víno Frankovka a bílé víno cuveé odrůd Rulandské bílé, Tramín červený a Sauvignon) v průběhu jejich výroby. Z výsledků této studie vyplývá, že v procesu výroby jednotlivých vín existují jak pozitivní kroky (např. macerace, lisování apod.), které vedou ke zvýšení obsahu fenolických sloučenin a do jisté míry i celkové antioxidační aktivity, a naopak i negativní kroky (např. čiření, filtrování, zrání v sudu v případě červeného vína), které vedou k poklesu obou zmíněných charakteristik.

K hodnocení celkové antioxidační aktivity jednotlivých vzorků vín byly vybrány dvě rozdílné spektrální metody, a to konkrétně metoda DPPH a metoda FRAP. První z nich charakterizuje antioxidační aktivitu z hlediska schopnosti antioxidantů přítomných ve víně zhaset syntetický radikál DPPH, druhá pak charakterizuje antioxidační aktivitu z hlediska redukčních vlastností antioxidantů. Ke stanovení obsahu celkových polyfenolů byla použita velmi jednoduchá spektrální metoda založená na měření absorbance adekvátně naředěných vzorků vín při vlnové délce 280 nm. Hodnoty TAA byly v případě metody DPPH vyjádřeny v ekvivalentech standardu Troloxu (mmol/l Troloxu) a v případě metody FRAP pak v ekvivalentech standardu askorbové kyseliny (mmol/l askorbové kyseliny). Hodnoty TPC byly vztaženy na standard gallové kyseliny a vyjádřeny v ekvivalentech této kyseliny (mg/l gallové kyseliny).

Z výsledků této studie bylo dále zjištěno, že obsah celkových fenolů je v červených vínech až 3,85x vyšší než ve vínech růžových a 6,34x vyšší než ve vínech bílých. Nejvyšší hodnoty celkové antioxidační aktivity byly naměřeny u vína červeného, naopak nejnižší pak v případě vína bílého. Z naměřených výsledků dále plyne, že s rostoucím ředěním vzorku vína (hlavně v případě vína červeného) se mění i jeho antioxidační aktivita. Tento jev však nebyl objasněn z důvodu nedostatku literárních pramenů, které by se tímto tématem zabývaly.

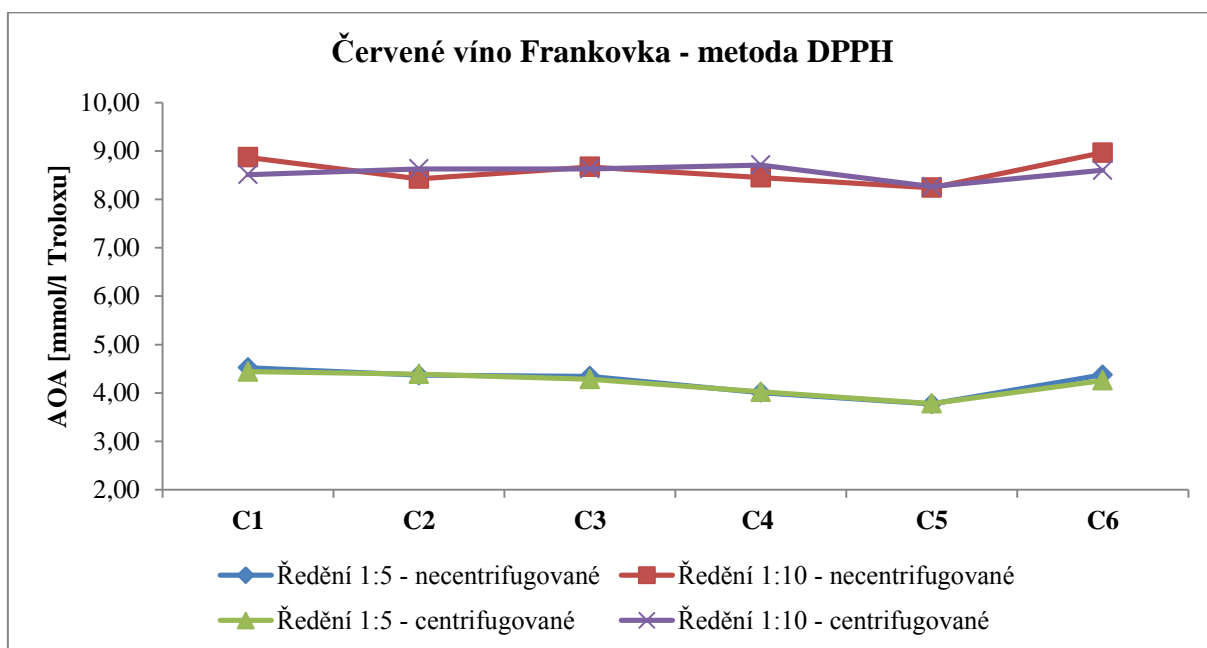
Získané výsledky byly podrobeny korelační analýze. Statisticky významná pozitivní korelace byla nalezena mezi hodnotami TPC a hodnotami TAA naměřenými metodou DPPH (bílého vína centrifugovaného i necentrifugovaného při ředění 1:5 i 1:10) a mezi hodnotami TPC a hodnotami TAA naměřenými metodou FRAP (červené víno centrifugované při ředění 1:5 i 1:10). Při vzájemném porovnání výsledků TAA stanovených metodou DPPH a FRAP

byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace pouze v případě vína bílého necentrifugovaného při ředění 1:5 a 1:10. Výsledky stanovení TPC a stanovení TAA naměřené u růžového vína v průběhu jeho výroby, stejně jako výsledky TAA naměřené metodou DPPH a FRAP u téhož vína, významně nekorelovaly v žádném z uvedených případů srovnání.

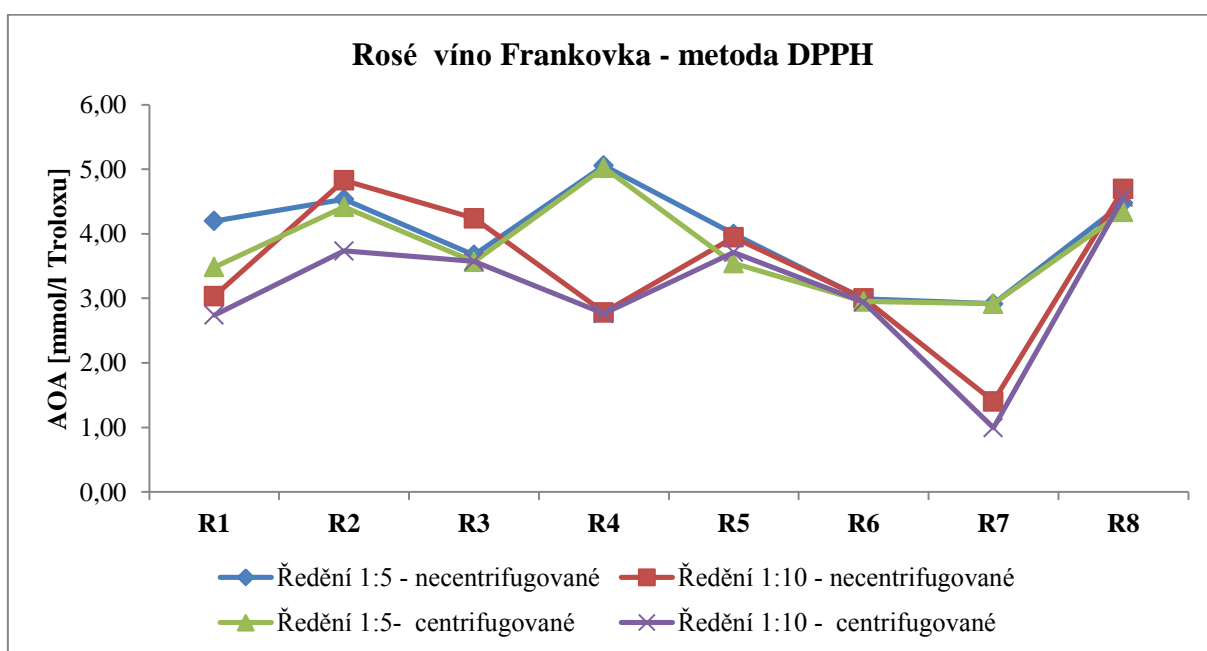
## 6. PŘÍLOHY

### Příloha 1.

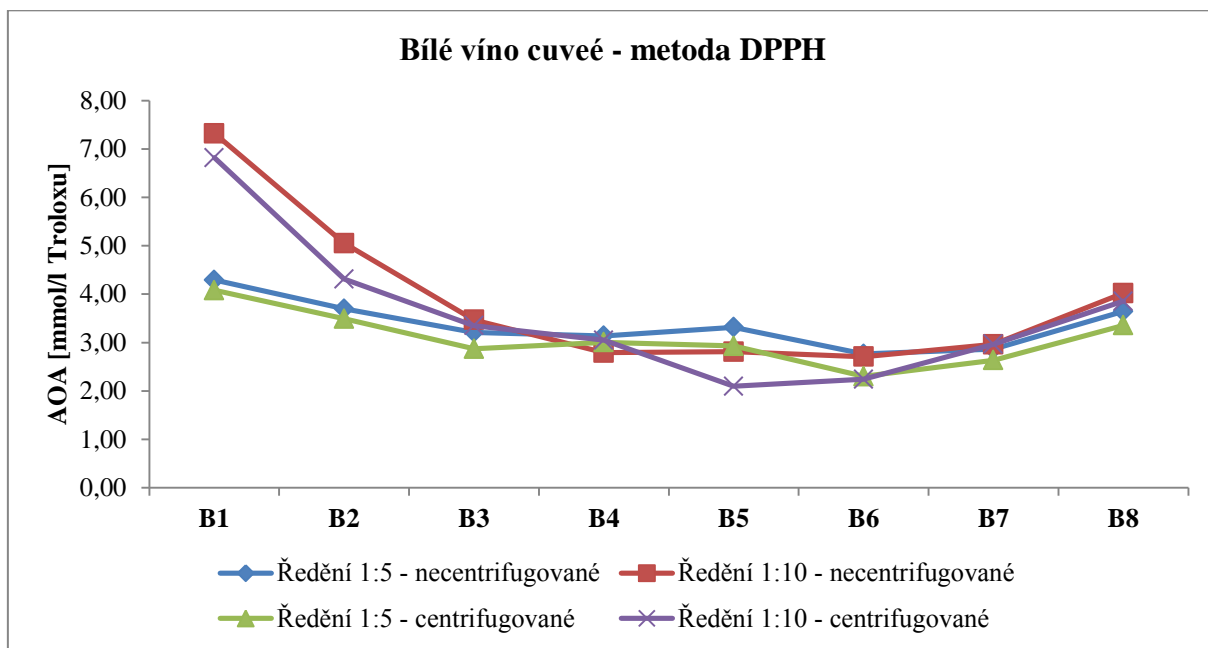
Graf 1. Grafická znázornění změn hodnot TAA v průběhu výroby červeného vína Frankovka stanovených metodou DPPH



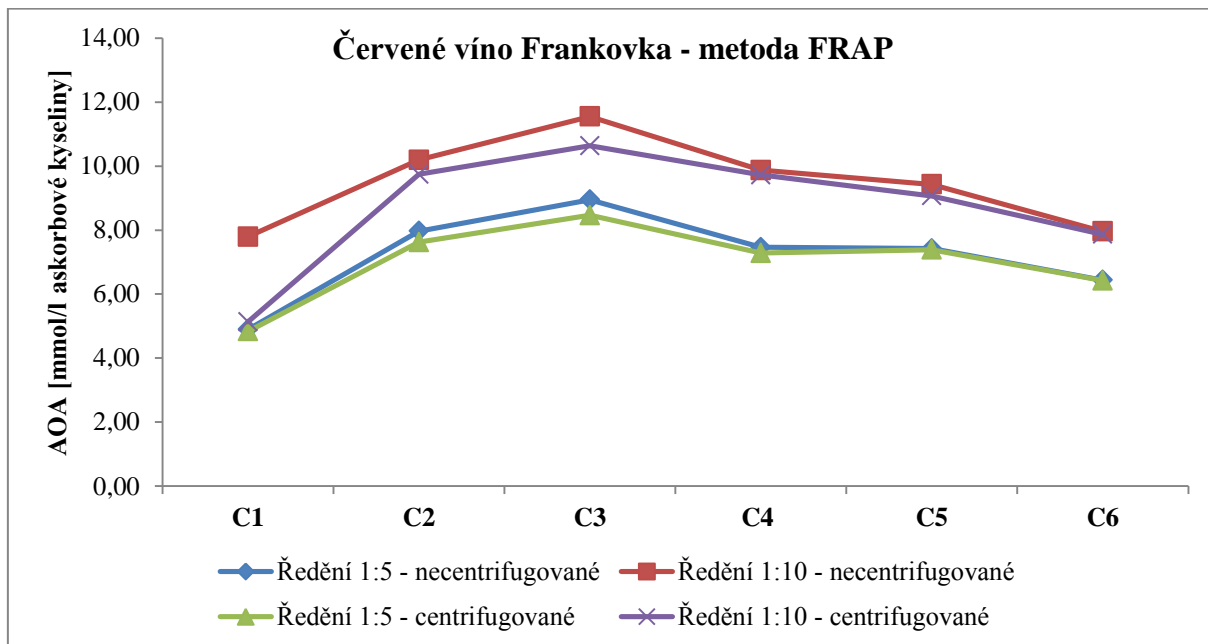
Graf 2. Grafická znázornění změn hodnot TAA v průběhu výroby rosé vína Frankovka stanovených metodou DPPH



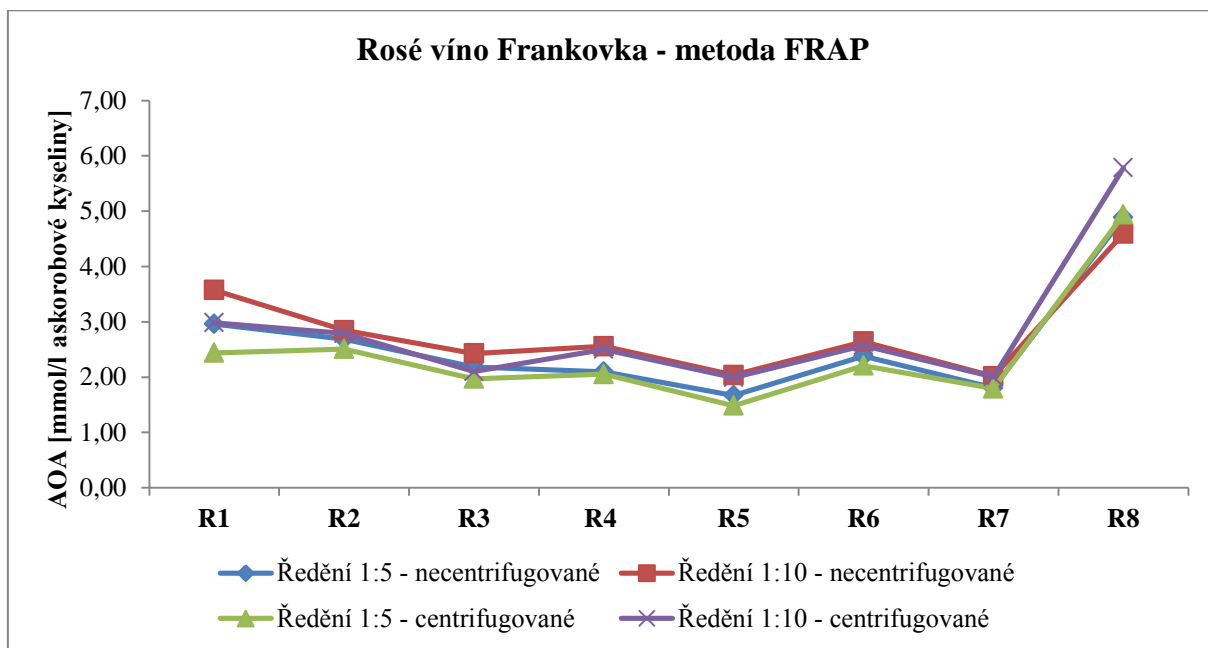
Graf 3. Grafická znázornění změn hodnot TAA v průběhu výroby bílého vína cuveé stanovených metodou DPPH



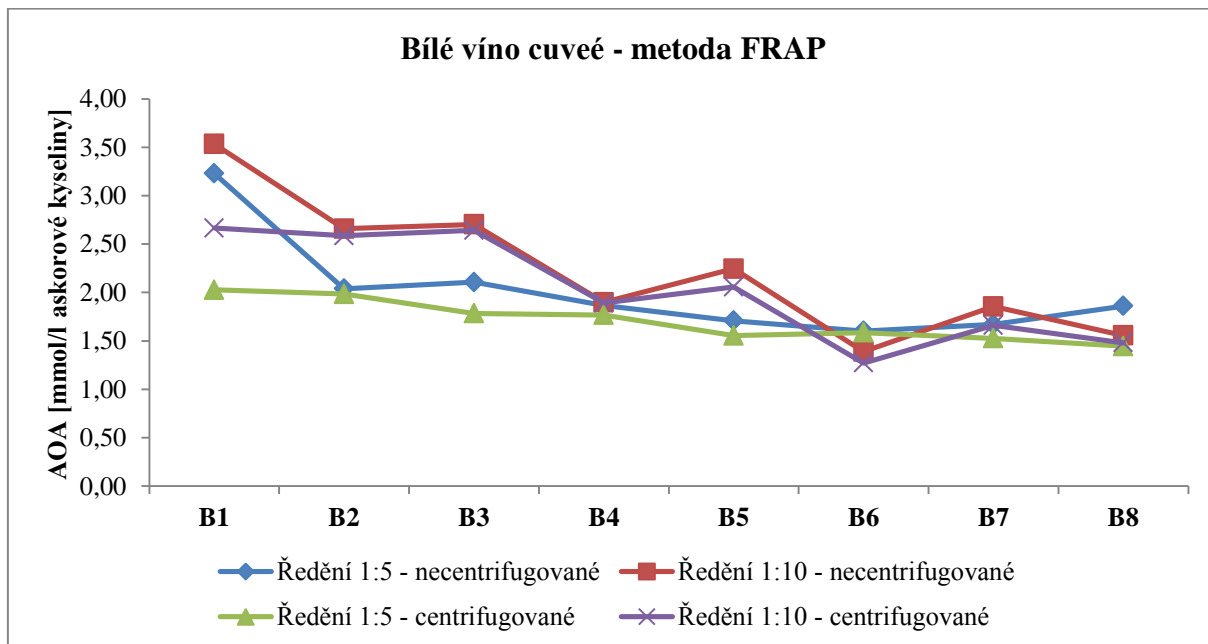
Graf 4. Grafická znázornění změn hodnot TAA v průběhu výroby červeného vína Frankovka stanovených metodou FRAP



Graf 5. Grafická znázornění změn hodnot TAA v průběhu výroby rosé vína Frankovka stanovených metodou FRAP

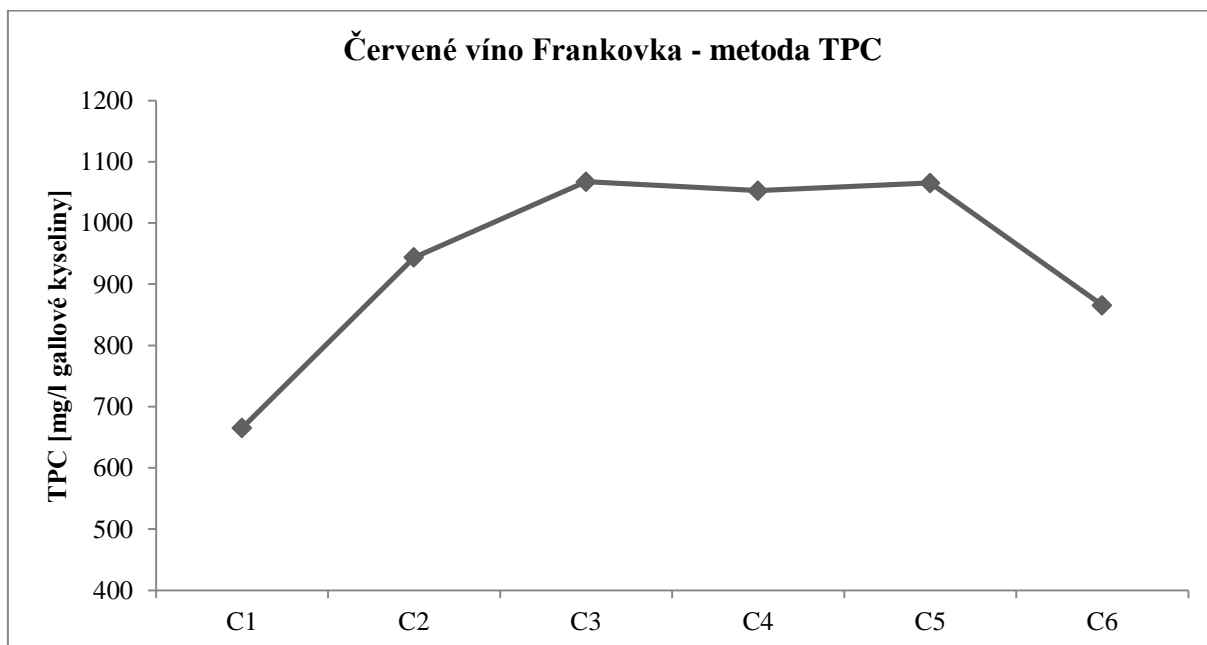


Graf 6. Grafická znázornění změn hodnot TAA v průběhu výroby bílého vína cuvéé stanovených metodou FRAP

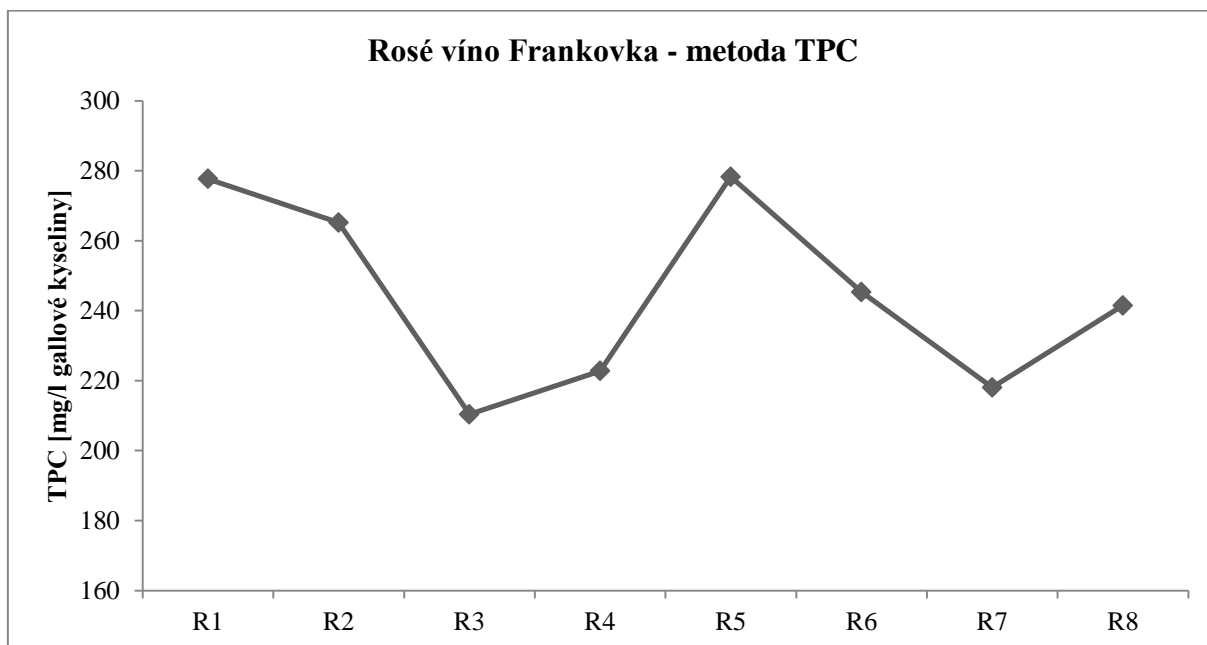


## Příloha 2.

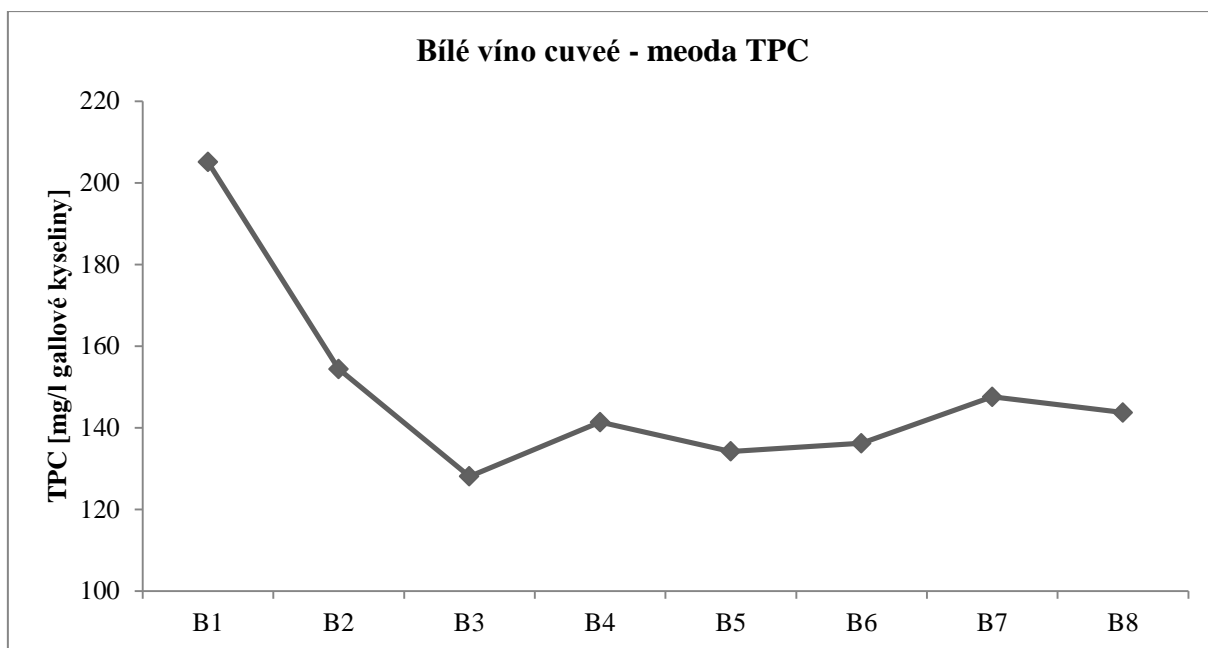
Graf 7. Grafické znázornění změn hodnot TPC v průběhu výroby červeného vína Frankovka



Graf 8. Grafická znázornění změn hodnot TPC v průběhu výroby rosé vína Frankovka



Graf 9. Grafická znázornění změn hodnot TPC v průběhu výroby bílého vína cuveé



## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	(2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát))
DETAPAC	Ethylentriaminpentaoctová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
eNOS	Endoteliální NOS
FC	Folin - Ciocalteu
FRAP	Ferric Reducting Ability of Plasma
FRASC	Ferric Reducting/Antioxidant power and ascorbic acid Concentration
GAE	gallic acid equivalents
HAT	Hydrogen atom transfer
iNOS	Induktivní NOS
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
nNOS	Neuronální NOS
NOS	NO-syntáza
OIV	International Organisation of Vine and Wine
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RNS	Reactive nitrogen specieses
RNOS	Reactive nitrogen/oxygen specieses
ROS	Reactive oxygen specieses
SET	Single electron transfer
SOD	Superoxid dismutáza
TAA	Total antioxidant activity
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TPC	Total phenol content
TPTZ	2,4,6-tris-(2-pyridyl)-s-triazin
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast spektra

## 8. LITERATURA

1. Halliwell B., Aeschbach E., Löliger J., Aruoma O. I.: Chem. Toxic. **33**, 601 – 617 (1995).
2. Echeverry C., Ferreira M., Reynes-Parada M., Abin-Carriquiry J. A., Blasina F., González-Neves G., Dajas F.: J. Food Eng. **69**, 147 – 154 (2005).
3. Renaud S., De Lorgelil M.: The Lancet **339**, 1523 – 1526 (1992).
4. Tarara J. M., Lee J., Spayd S. E, Scagel C. F.: Am. J. Enol. Vitic. **59**, 235 – 247 (2008).
5. Martínez – Cayuela M.: Biochimie **77**, 147 – 161 (1995).
6. Racek J., Holeček V.: Chem. Listy **93**, 774 – 780 (1999).
7. Hrbáč J.: *Aplikace elektrochemických metod pro stanovení fyziologicky zajímavých látek*. Habilitační práce, UP Olomouc, Olomouc (2007).
8. Lau Andy T. Y., Wang Y., Chiu Jen – Fu J.: Cell. Biochem. **104**, 657 – 667 (2008).
9. Atli T. et all.: Arch. Gerontol. Geriatr. **39**, 269 – 275 (2004).
10. Matés J. M., Sánchez – Jiméz F.: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **32**, (2000) 157 – 170.
11. Moini H., Packer L., Saris N. E. L.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **182**, 84 – 90 (2002).
12. Štípek a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada Publishing, Praha (2000).
13. Gutteridge J., M. C.: Clin. Chem. **41/12**, 1819 – 1828 (1995).
14. Piterková J., Tománková K., Luhová L, Petřivalský M., Peč P.: Chem. Listy **99**, 455 – 466 (2005).

15. Buonocore G., Perrone S., Tatarano M. L.: *Seminars in Fetal & Neonatal medicine* **15**, 186 – 190 (2010).
16. Rahman I., Biswas S. K., Kode A.: *Eur. J. Pharmacol.* **533**, 222 – 239 (2006).
17. Perrone G. G., Tan S. X., Dawes I. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1354 – 1368 (2008).
18. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J.: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44 – 84 (2007).
19. Patel R. P., McAndrew J., Sellak H., White C. R., Jo H., Freeman B. A., Darley – Usmar V. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 385 – 400 (1999).
20. Procházková D., Wilhelmová N.: *Nitric Oxide* **24**, 61 – 65 (2012).
21. Antošová M.: *Význam oxidu dusnatého pre manažment ošetrovateľskej starostlivosti u pacientov s ochoreniami respiračného a kardiovaskulárneho systému*. Diplomová práca, Univerzita Komenského v Bratislavě, Bratislava (2008).
22. Ďuračková Z.: *Volné radikály a antioxidanty v medicíne II*. Slovak Academic Press, Bratislava (1999).
23. Bargagli E., Olivieri C., Bennett D., Prasse A., Muller-Quernheim J., Rottoli P.: *Respiratory Medicine* **103**, 1245 – 1256 (2009).
24. Aycicek A., Erel O., Kocyigit A.: *Pediatr. Int.* **47**, 635 – 639 (2005).
25. Banerjee B. D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S. T., Chakraborty A. K.: *Toxicology Letters* **107**, 33 – 47 (1999).
26. Halliwell B.: *Free Radical Res. Commun.* **9**, 1 (1990).
27. Dostupné na: [www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf](http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf) (staženo dne 21. 3. 2012).
28. Velíšek J.: *Chemie potravin 3*. OSSIS, Tábor (1999).

29. Číž M., Čížová H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., Lojek A.: *Food Control* **21**, 518 – 523 (2010).
30. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Chem. Listy* **98**, 174 – 179 (2004).
31. Dostupné na: <http://www.sfrbm.org/frs/Buettner2002.ppt> (staženo dne: 21. 3. 2012).
32. Min D. B., Boff M.: *Compr. Res. Food Sci. Food Safety* **1**, 56 – 72 (2002).
33. Pokorný J.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 629 – 642 (2007).
34. Wichrowska D., Rogozińska I., Pawelzik E.: *Polish J. of Environ. Stud.* **18**, 487 – 491 (2009).
35. Tobolková B., Polovka M.: *Problémy spojené s vyjadřováním antioxidační aktivity potravin*. Interaktivna konferencia mladých vedcov. Zborník abstraktov, Občianske sdruženie PREVEDA, Banská Bystrica (2011).
36. Dostupné na: [www.cbks.cz/sbornik05b/Fic.pdf](http://www.cbks.cz/sbornik05b/Fic.pdf) (staženo dne: 22. 3. 2012).
37. Hodek P., Trefil P., Stiborová M.: *Chemico – Biological Interactions* **139**, 1 – 21 (2002).
38. Dostupné na: [www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P\\_30C.doc](http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_30C.doc) (staženo dne 22. 3. 2012).
39. Réblová Z.: *Chem. Listy* **105**, 667 – 673 (2011).
40. Frankel E. N., Huang S. W., Aesbach R., Prior E.: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 131 – 135 (1996).
41. Frankel E. N., Meyer A. S.: *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1925 (2000).
42. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.: *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572 – 584 (2002).
43. Pičmanová M.: *Isoflavonoidy v nebobovitých rostlinách: fytochemie, biologické funkce a molekulární biologie*. Bakalářská práce, UK v Praze, Praha (2008).

44. Tapiero H., Tew K. D., Nguyen Ba, Mathé G.: *Biomed. Pharmacother* **56**, 200 – 207 (2002).
45. Pereira D. M., Valentão P., Pereira J. A., Andrade P. B.: *Molecules* **14**, 2202 – 2211 (2009).
46. Bravo L.: *Nutr. Rev.* **56**, 317 – 333 (1998).
47. Dostupné na: [www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf](http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf) (staženo dne 24. 3. 2012).
48. Paixão N., Perestrelo R., Marques J. C., Câmara J. S.: *Food Chem.* **105**, 204 – 214 (2007).
49. Li H., Wang X., Li Y., Li P., Wang H.: *Food Chem.* **112**, 454 – 460 (2009).
50. Jackson R. S.: *Wine Science: Principles and Applications*. 3th. ed., Academic press, San Diego (2008).
51. Shinohara T., Kubodera S., Yanagida F.: *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 90 – 97 (2000).
52. Atanacković M., Petrović A., Jović S. et al.: *Food Chem.* **131**, 513 – 518 (2012).
53. Burns J. et al.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5797 – 5808 (2001).
54. Mudnic I. et al.: *Food Chem.* **119**, 1205 – 1210 (2010).
55. Ribéreau-Gayon et al.: *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatment*. 2nd ed., JohnWiley & Sons Ltd., Chichester (2006).
56. Domínguez C., Guillén A. D., Barroso C. G.: *Anal. Chim. Acta* **458**, 95 – 102 (2002).
57. Chatonnet P., Viala C., Dubourdieu D.: *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 443 – 448 (1997).
58. Šmidrkal J. a kol.: *Chem. Listy* **95**, 602 – 609 (2001).
59. Kennedy J. A., Saucier C., Glories Y.: *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 239 – 248 (2006).

60. Harbertson J. F., Parpinello G. P., Heymann H., Downey M. O.: Food Chem. **131**, 999 – 1008 (2012).
61. Dostupné na: <http://www.enolog.cz/antokyany-cervena-nebo-modrofialova> (staženo 28. 3. 2012).
62. Singleton V., Rossi J. A.: Am. J. Enol. Vitic. **16**, 144 – 158.
63. Dostupné na:  
<http://www.nshtvn.org/ebook/molbio/Current%20Protocols/CPFAC/fai0101.pdf>  
(staženo 29. 3. 2012).
64. Fragoso J., Aceña L., Guasch J., Busto O., Mestres M.: Agric Food Chem. **59**, 2175 – 2183 (2011).
65. Arnao M., Cano A., Acosta M.: Recent Res. Dev. Agric. Food Chem. **2**, 893 (1998).
66. Prior R. L., Wu X., Schaich K.: J. Agric. Food Chem. **53**, 4290 – 4302 (2005).
67. Miller et. al.: Clin. Sci. **84**, 407 – 412 (1993).
68. Re R. et. al.: Free Radical Biology & Medicine **26**, 1231 – 1237 (1999).
69. Villaño D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C.: Talanta **64**, 501 – 509 (2004).
70. Kubištová V.: *Spektrofotometrické studium antioxidační aktivity*. Bakalářská práce, UP v Olomouci, Olomouc (2010).
71. Blois M. S.: Nature **181**, 1199 – 1200 (1958).
72. Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A.: J. Agric. Food. Chem. **47**, 1035 – 1040 (1999).
73. Cao G., Prior R. L.: Methods Enzymol. **299**, 50 – 62 (1999).
74. Benzie I. F. F., Strain J. J.: Anal. Biochemistry **239**, 70 – 76 (1996).
75. Benzie I. F. F., Szeto Y. T.: J. Agric. Food Chem. **47**, 633 – 636.

76. Benzie I. F. F., Strain J. J.: *Methods in Enzymology* **299**, 15 – 27 (1999).
77. Huang D., Ou B., Prior R. L.: *J. Agric Food Chem.* **53**, 1841 – 1856 (2005).
78. Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S. E.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7970 – 7981 (2004).
79. Bener M., Özyürek M., Güçlü K., Apak R.: *Anal. Chem.* **82**, 4252 - 4258 (2010).
80. Villaño D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M., García-Parilla M. C.: *Food Chem.* **95**, 394 – 404 (2006).
81. Stratil P., Kubáň V., Fojtová J.: *Czech J. Food Sci.* **26**, 242 – 253 (2008).
82. Price M. L., Butler L. G.: *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1268 – 1273 (1977).