

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie

# **Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných fenolických kyselin a flavonoidů v Tokajských vínech**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Pavlína Moravcová  
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D

Hradec Králové 2019

# ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne .....

.....

# PODĚKOVÁNÍ

Děkuji především vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za trpělivost, odborné rady a pomoc poskytnutou při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Katedry analytické chemie za podporu a pomoc při vypracování podkladů pro praktickou část mé diplomové práce.

# **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**

Kandidát: **Bc. Pavlína Moravcová**

Školitel: **Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.**

Název diplomové práce: **Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných fenolických kyselin a flavonoidů v Tokajských vínech**

Cílem této diplomové práce byl vývoj a optimalizace HPLC metody pro současné stanovení celkem 15 fenolických látek, kyseliny protokatechové, fertarové, kávové, p-hydroxybenzoové, syringové, gallové, p-kumarové, ferulové, chlorogenové, kaftarové, 2-hydroxy-4-methoxybenzoové, polydatinu, resveratralu, katechin hydrátu a epikatechinu v Tokajských vínech.

Množství a zastoupení vybraných fenolických sloučenin bylo analyzováno ve 25 vzorcích Tokajských vín, které pocházejí z vinic ze slovenské části Tokajské vinohradnické a vinařské oblasti. Práce se mimo jiné zaměřuje na popis specifických charakteristik této unikátní oblasti, jedinečného způsobu výroby Tokajského vína a jeho chemického složení, konkrétně spektra fenolických látek v něm obsažených.

Analýza vybraných fenolických látek byla provedena za pomoci kolony Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm; 5 µm) s použitím mobilní fáze složené z 0,1% kyseliny fosforečné a acetonitrilu v gradientové eluci. Látky byly analyzovány při teplotě 30 °C a průtoku 1 ml/min a detekovány při vlnové délce 280 a 320 nm pomocí DAD detektor.

*Klíčová slova: HPLC, Tokajské víno, Tokajská oblast, fenolické sloučeniny*

## **ABSTRACT**

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Analytical chemistry**

Candidate: **Bc. Pavlína Moravcová**

Supervisor: **Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.**

Title of the diploma thesis: **Development of HPLC method for determination of selected phenolic acids and flavonoids in Tokaj wines**

The aim of this diploma thesis was to develop and optimize HPLC method for simultaneous determination of 15 phenolic compounds, protocatechic acid, fertaric, coffee, p-hydroxybenzoic, syringic, gallic, p-coumaric, ferulic, chlorogenic, caftaric, 2-hydroxy-4-methoxybenzoic, polydatin, resveratrol, catechin hydrate and epicatechin in Tokaj wines.

The quantity and content of selected phenolic compounds was analyzed in 25 samples of Tokaj wines, which come from vineyards from the Slovak part of Tokaj wine region. The work was also focused on the description of the specific characteristics of this unique area, the unique method of Tokaj wine production, its chemical composition, and namely the spectrum of phenolic substances.

Analysis of selected phenolic compounds was performed using an Ascentis® Express F5 column (150 x 4.6 mm; 5 µm) using a mobile phase consisting of 0.1% phosphoric acid and acetonitrile in gradient elution. The substances were analyzed at 30 °C and flow rate of 1 ml/min and detected at 280 and 320 nm using a DAD detector.

*Keywords: HPLC; Tokaj wine; the Tokaj region; phenolic compounds*

# OBSAH

ÚVOD.....	9
CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE .....	11
1 TOKAJSKÉ VÍNO.....	12
1.1 Úvod.....	12
1.2 Klasifikace Tokajských vín .....	12
1.2.1 Tokajské esence .....	12
1.2.2 Tokajské výběry.....	13
1.2.3 Tokajské samorodné .....	14
1.2.4 Tokajské stolní.....	14
2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA TOKAJSKÉ VINAŘSKÉ OBLASTI.....	15
2.1 Geografické a právní parametry Tokajské oblasti.....	15
2.2 Půdní a klimatické podmínky .....	15
2.3 Ušlechtilá plíseň.....	15
2.4 Plíseň šedá.....	17
2.5 Tokajské sklepy .....	18
3 POLYFENOLICKÉ SLOUČENINY .....	19
3.1 Úvod.....	19
3.2 Fenolické sloučeniny a vliv na lidské zdraví .....	19
3.3 Fenolické látky a víno .....	20
3.4 Klasifikace.....	20
3.5 Flavonoidní fenolické sloučeniny .....	21
3.5.1 Flavonoly.....	22
3.5.2 Flavan-3-oly .....	22
3.5.3 Antokyany .....	23
3.6 Neflavonoidní fenolické sloučeniny.....	24
3.6.1 Hydroxybenzoové kyseliny .....	24
3.6.2 Hydroxyskořicové kyseliny.....	25
3.6.3 Stilbeny .....	26
3.7 Vybrané fenolické sloučeniny.....	26
3.7.1 Protokatechová kyselina.....	26
3.7.2 Syringová kyselina.....	26
3.7.3 Gallová kyselina .....	27
3.7.4 Kávová kyselina.....	27
3.7.5 Ferulová kyselina.....	27
3.7.6 P-kumarová kyselina.....	28
3.7.7 Chlorogenová kyselina.....	28
3.7.8 Kaftarová kyselina .....	28
3.7.9 Epikatechin a katechin .....	28
3.7.10 Resveratrol .....	29

4	ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK.....	30
4.1	Úvod.....	30
4.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	30
4.2.1	Popis chromatografického procesu .....	31
4.3	Separace a kvantifikace fenolických látek pomocí HPLC .....	32
4.3.1	Příklady stanovení fenolických sloučenin ve víně .....	33
4.4	Validace chromatografické metody.....	39
4.4.1	Správnost.....	39
4.4.2	Přesnost .....	39
4.4.3	Test způsobilosti chromatografického systému .....	40
4.4.4	Linearita .....	40
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
5.1	Použité přístroje a pomůcky .....	41
5.2	Chemikálie a materiál.....	41
5.2.1	Chemikálie .....	41
5.2.2	Materiál .....	42
5.2.3	Příprava roztoků.....	43
6	OPTIMALIZACE METODY .....	46
6.1	Volba vlnové délky detektoru.....	46
6.1.1	Absorpční spektrum kyseliny syringové a fertarové .....	46
6.1.2	Absorpční spektrum kyseliny kávové a p-hydroxybenzoové.....	47
6.1.3	Absorpční spektrum kyseliny protocatechové a gallové .....	47
6.1.4	Absorpční spektrum kyseliny p-kumarové a ferulové.....	48
6.1.5	Absorpční spektrum katechin hydrátu a epikatechinu.....	48
6.1.6	Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové a kaftarové .....	49
6.1.7	Absorpční spektrum resveratrolu a polydatinu .....	49
6.1.8	Absorpční spektrum kyseliny 2-hydroxy-4methoxybenzoové.....	50
6.2	Výběr kolony .....	51
6.3	Volba gradientu.....	51
6.4	Reprezentativní výsledky testování optimálního gradientu a různých kolon .....	52
6.4.1	Gradient 03 .....	52
6.4.2	Gradient 05 .....	53
6.4.3	Gradient 09 .....	54
6.4.4	Hodnocení vybraných gradientů a kolon .....	55
6.5	Optimální podmínky stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC .....	56
7	VALIDACE ANALYTICKÉ METODY .....	57
7.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	57
7.2	Linearita .....	59
7.2.1	Kalibrační křivky vybraných fenolických sloučenin .....	61
7.3	Správnost a přesnost.....	66
7.3.1	Opakovatelnost .....	66

7.3.2	Výtěžnost.....	67
8	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	68
8.1	Kyselina gallová.....	68
8.2	Kyselina protokatechová .....	69
8.3	Epikatechin .....	70
8.4	Kyselina syringová.....	71
8.5	Kyselina m-kumarová .....	72
8.6	Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová.....	73
8.7	Kyselina kaftarová .....	74
8.8	Kyselina kávová.....	75
8.9	Kyselina p-kumarová .....	76
8.10	Polydatin.....	77
8.11	Kyselina ferulová .....	78
8.12	Resveratrol.....	79
8.13	Kyselina 4-hydroxybenzoová .....	80
8.14	Katechin hydrát.....	80
8.15	Kyselina chlorogenová .....	80
8.16	Chromatogramy reprezentativních analýz vybraných vzorků Tokajských vín .....	81
8.16.1	Chromatogram vzorku č. 7 – Tokajský výběr 6-putnový z roku 1983.....	82
8.16.2	Chromatogram vzorku č. 15 – Tokajský výběr 6-putnový z roku 1997 z vinařství Zlatý Strapec 83	
8.16.3	Chromatogram vzorku č. 24 – Tokajský výběr 5-putnový z roku 2003 z vinařství Ostrožovič..	84
8.17	Celkové množství vybraných fenolických sloučenin .....	85
9	ZÁVĚR.....	87
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	89



## ÚVOD

Plody révy vinné jsou důležitým zdrojem látek prospěšných pro lidský organismus, tyto látky během zpracování révy vinné přestupují do moštu a dále do vína. Víno se tak stává bohaté na obsahové látky, jako jsou například sacharidy, minerály, organické kyseliny, fenolické, aromatické a dusíkaté látky.

Mezi nejvíce zastoupené sacharidy v hroznech patří glukóza a fruktóza, celkový obsah sacharidů má klíčový význam pro určení potenciálního množství alkoholu ve víně, jelikož vysoký obsah sacharidů, v tom případě i vysoká koncentrace alkoholu se mohou negativně odrážet na kvalitě bílých vín. Minerální látky ve víně ovlivňují zejména sensorické vlastnosti vína. Mezi obsažené minerální látky patří především draslík, jehož koncentrace pozitivně koreluje s množstvím obsažených sacharidů, dále se na chuťových a aromatických charakteristikách vína podílejí vápník a hořčík. Organické kyseliny nejvíce zastoupené v hroznech jsou kyselina vinná a jablečná, které jsou pro víno významné jak z hlediska sensorického projevu, tak z důvodu jejich konzervačního účinku, zejména u bílých vín je jejich vyšší množství prospěšné. Z aromatických látek jsou důležité, zejména pro charakteristické odrudové aroma a celkový aromatický projev vína, sloučeniny jako například monoterpeny, norisoprenoidy, methoxypyraziny a těkavé fenoly. Pro tokajská vína jsou z aromatických látek významné především těkavé fenoly, produkty enzymatické přeměny hydroxyskořicových kyselin, které znehodnocují víno svým „plastovým“ a „lékárnickým“ aroma.

Fenolické látky jsou přírodní sloučeniny přítomné v hroznech a víně, které dělíme na dvě základní skupiny, flavonoidní a neflavonoidní sloučeniny: Do skupiny flavonoidních látek významných ve vinařství patří antokyany, flavan-3-oly a flavonoly, do skupiny neflavonoidních látek důležitých pro vinohradnictví se řadí hydroxyskořicové a hydroxybenzoové kyseliny a stilbeny. Celkový obsah i zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin se v červených a bílých vínech se obvykle velmi liší, rozdíl ve složení je patrný i v rámci jednotlivých ročníků. Příčinou rozdílu mezi obsahem fenolických látek v bílých a červených vínech je odlišný způsob zpracování hroznů, vyšší obsah fenolických látek, zejména antokyanů, detekujeme u vín červených. Fenolické látky svou důležitost pro vinohradnictví zakládají na jejich antimikrobiálních účincích a na jejich podílu na sensorických vlastnostech vína, jako je barva červených vín a tříslovité a hořké chuťové tóny.

Fenolické látky ve vínech se v poslední době staly předmětem studií z důvodů jejich pozitivního účinku na lidské zdraví, hlavně v oblasti prevence kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění či z důvodu jejich silného antioxidačního účinku, kdy se fenolické látky podílejí při obraně proti oxidačnímu stresu, jelikož vychytávají volné radikály. Nezanedbatelné jsou i jejich antimikrobiální vlastnosti, které brání tvorbě mikroorganického biofilmu a škodlivému vlivu mikrobiálních toxinů. Na podkladě těchto poznatků se neustále vytvářejí a zdokonalují metody stanovení a zjišťují se nové a verifikují se již známé účinky fenolických sloučenin na lidský organismus.

## **CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE**

Tato diplomová práce si klade za cíl analyzovat množství a zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin v Tokajském víně. Za tímto účelem byla v experimentální části vyvinuta, optimalizována a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro separaci vybraných fenolických látek obsažených v Tokajských vínech původem ze slovenské části Tokajské vinohradnické a vinařské oblasti, konkrétně z vinařství na území vesnic Malá Trňa a Viničky.

# 1 TOKAJSKÉ VÍNO

## 1.1 Úvod

Tokajské víno je věhlasné víno vyrobené z hroznů vinic rozprostírajících se na území severovýchodního Maďarska a na jihovýchodě Slovenska ve striktně ohraničených oblastech. Svým charakterem patří tokajská vína mezi vína speciální typově takzvaná žlutá vína, mezi která se také řadí Madeira či Sherry. Od ostatních speciálních vín, šumivých a dezertních, se liší především svou přirozeností, přestože svou barvou především starší vína s vyšším obsahem alkoholu připomínají právě dezertní vína [1] [2].

## 1.2 Klasifikace Tokajských vín

### 1.2.1 Tokajské esence

Tokajská esence se připravuje výhradně z cibéb, hroznů napadených ušlechtilou plísní *Botrytis cinerea*, které bývají sbírány průběžně a zpracovávány postupně a jediné v ročnících, které byly pro vznik těchto cibéb velice příznivé. Při výrobě Tokajské esence a Tokajských výběrů probíhá před samotným zpracováním hroznů selekce vhodných hroznů, které se poté uskladní v dřevěných sběrných kádích, jejichž dno bývá perforováno. Tyto hrozny se po naplnění do kádí důkladně pomačkají, abychom zaručili minimální množství vzduchoprázdného prostoru a zabránili tak případnému zoctování, po naplnění se nakonec ještě povrch sudů mírně zasíří [1] [3] [4].

Ze zmačkaných cibéb zatížených vlastní vahou, které se ponechají takto uležet, se po několika dnech začne postupně uvolňovat mošt, který vytéká ze sudů perforovaným dnem nebo čepovým otvorem. Uvolněný mošt se barví do hnědé až tmavohnědé barvy a konzistence bývá velice hustá připomínající sirup, obvyklá cukernatost moštu dosahuje 40 - 60 %. Ze zhruba 100 kilogramů cibéb je možné získat 4 až 6 litrů esence. Koncentrovaný mošt přirozeně kvasí velice pomalu kvůli vysoké koncentraci cukru, jeho zrání probíhá nejméně po dobu 3 let, z čehož minimálně dva roky by esence měla zrát v dřevěných sudech. Po kvašení objem alkoholu ve vyzrálé esenci tvoří maximálně 5 - 8 % a minimální hranice obsahu zbytkového cukru je u Tokajských esencí nastavena na koncentrační hodnotu 450 g/l a 40 g/l u bezcukerných extraktů. Výsledná tokajská esence má velice silnou sladkou chuť s vyváženou kyselinkou, esence bývá zvláštní raritou Tokajských vinařství a v praxi se obvykle přidává do Tokajských výběrových vín s cílem vylepšení jejich kvality [1] [3] [4].

### 1.2.2 Tokajské výběry

Tokajské výběry byly původně dle historické receptury označovány jako 3-6-putnové, do jedné z kategorií byly zařazeny na základě způsobu výroby. Základními měřicími jednotkami byly při výrobě dle tradičních postupů používány putny o objemu 25 až 30 litrů, které byly schopny obsáhnout až 25 kilogramů cibéb, a dále takzvané göncské sudy o objemu 130 a 140 litrů. Přičemž dle počtů puten s cibébami, které byly přidány do jednoho göncského sudu, byl určován i kolika putnový bude označen výsledný tokajský výběr a počet přidávaných puten cibéb také determinoval, do jaké kategorie bude víno zařazeno z hlediska své cukernatosti. Tento tradiční dělicí systém byl ale postupem času nahrazen systémem novějším s ohledem na rozvoj laboratorních technik schopných přesně stanovit obsah cukru v Tokajských výběrech. Dle obsahu zbytkového cukru byla nověji vína rozřazena do 4 skupin, přičemž každá skupina má určenou hladinu minimálního obsahu zbytkového cukru na 60, 90, 120 a 150 g/l, tyto skupiny však nadále odpovídají rozdělení Tokajských výběrů na 3, 4, 5 a 6-putnové výběry [1] [3] [4].

Tradiční výrobní postupy uvádějí, že na počátku byl vytvořen takzvaný rmut, který byl představován pomačkanými až rozdrčenými cibébami, které byly dle daného výběrového vína přidávány v množství 2-6 puten. Rmut byl po důkladném pomačkání zalit 136 litry buď kvalitního samorodného vína s vysokým obsahem alkoholu anebo již plně vykvašeným vínem novým. Rozdrčené cibéby zalité vínem byly ponechány v procesu macerace a nakvašení po dobu 18 až 36 hodin, přičemž byla celá směs pravidelně promíchávána, po uplynutí této doby byl rmut scezen a lisován ať už šlapáním či později pomocí hydraulického lisu. Takto získané víno bylo plněno do göncských sudů, kde víno bylo ponecháno ke zrání po dobu 3 až 5 let [1] [3] [4].

V současnosti byl celý výrobní proces výrazně zjednodušen a ochuzen o tradiční techniky, jako například bylo vyloučeno lisování šlapáním či vylisovaný podíl vína je až po samotném lisování nalit do sudů, jelikož předchozí výrobní procesy probíhají spíše ve velkých nerezových tancích. I doba, kterou víno zraje v göncských sudech, byla razantně zkrácena z původních 3-5 let na pouhých 18 měsíců a vína poté dále dozrávají v samotných lahvích [1] [3] [4].

### 1.2.3 Tokajské samorodné

Základem výrobního postupu Tokajského vína samorodného je absence třídění hroznů zdravých a hroznů napadených ušlechtilou plísní *Botrytis cinerea*, ciběby se z úrody hroznů nevybírají, nýbrž se všechny hrozny, napadené i zdravé, zpracovávají společně. V příznivých letech kdy úroda je kvalitní, čili vykazuje vysoký stupeň napadení hroznů ušlechtilou plísní, vysokou cukernatost a je také přítomen příznivý poměr mezi množstvím ciběb a vyzrálých bobulí, se vyrábí víno samorodné sladké. Samorodné sladké lze vyrobit i s úplnou absencí ciběb v případech, kdy je úroda bohatá na hrozny s vyšší cukernatostí a po vykvašení tvoří objem alkoholu ve víně více než 13 objemových procent a obsah nakvašeného cukru překračuje hranici 25 gramů. V méně příznivých letech, kdy je cukernatost hroznů nižší a je výrazně nižší i napadení hroznů ušlechtilou plísní, a tedy se snižuje i množství ciběb, se vyrábí víno samorodné suché. Samorodné suché a sladké se odlišují jak v cukernatosti moštu, tak i v minimálním obsahu alkoholu, vína samorodná sladká charakterizuje minimální obsah alkoholu 9 % a cukernatost je stanovena na 24° NM, naopak pro víno samorodné suché je typický vyšší obsah alkoholu, minimálně 12 %, a cukernatost je stanovena na 21°NM. Tokajské víno samorodné sladké a suché vykazují rozdíly i ve způsobu uskladnění, víno samorodné sladké podléhá zrání a kvasným procesům v malých dřevěných sudech s maximálním objemem do 300 litrů po dobu 2 až 3 let, kdežto víno samorodné suché kvasí a zraje v dřevěných sudech, jejichž objem se pohybuje v rozmezí od 300 do 750 litrů, po dobu 2 let, jelikož zrání je urychleno oxidačními procesy probíhajícími v prvních 3 měsících, kdy sudy nejsou zcela plné [1] [3] [4].

### 1.2.4 Tokajské stolní

K výrobě Tokajského stolního vína se přistupuje v letech, která nejsou příznivá pro výrobu samorodných ani výběrových vín, jelikož hrozny nejsou dostatečně vyzrálé. Technologický proces zpracování hroznů určených k výrobě stolních vín se nijak neodlišuje od postupu zpracování hroznů v ostatních vinohradnických oblastech. Jediný rozdíl tkví ve způsobu uskladnění, jelikož Tokajské stolní víno zraje v menších sudech, jejichž objem se pohybuje v rozmezí od 300 do 750 litrů, samotné zrání trvá 1,5 až 2 roky [1] [3] [4].

## 2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA TOKAJSKÉ VINAŘSKÉ OBLASTI

### 2.1 Geografické a právní parametry Tokajské oblasti

Mezi nejznámější oblasti s produkcí vín z hroznů napadených ušlechtilou plísní je oblast na jihu Francie konkrétně v okolí vesnice Sauternes, nacházející se nedaleko města Bordeaux. Neméně proslulé jsou i vinařské kraje v Německu, například oblast Mosela či maďarský a slovenský region Tokaj. Tokajská oblast se rozkládá ve striktně vymezeném pásmu na hranicích mezi Maďarskem a Slovenskem. Dle zákona z roku 1908 do tohoto regionu bylo zařazeno 33 obcí, z toho na území pozdější Československé republiky patřily tři, Malá Třňa, Viničky a Slovenské Nové Mesto. Na základě zákona se od 1959 k těmto třem obcím přidaly další čtyři obce na slovenské straně hranice, Velká Třňa, Čerhov, Bara a Černochovo [1].

### 2.2 Půdní a klimatické podmínky

Z fyzikálního hlediska ve složení převažují v Tokajské oblasti lehké až střední půdy s intenzivní mikrobiální činností, z chemického složení jsou tyto půdy bohaté na fosfor a draslík a řadu dalších stopkových prvků. Esenciální význam v této oblasti mají klimaticko-povětrnostní podmínky. V Tokajském regionu se vinice nacházejí na jižních svazích, na kterých jsou hrozny ideálně chráněny proti severovýchodním větrům pohořím Karpat. V rámci ročních období obvykle převažují chladné a poměrně dlouhé zimy, proměnlivá jara a velice teplá léta. Na podzim je pro tuto oblast typické období takzvaného babího léta, kdy dny jsou teplé a slunečné, což příznivě ovlivňuje vyzrávání hroznů. V případě kombinace těchto ideálních klimatických podmínek s povětrnostními dosahují kultivary v této oblasti vysoké koncentrace sacharidů, tyto podmínky také podporují vznik a rozvoj ušlechtilé plísně *Botrytis cinerea*. *Botrytis cinerea* příznivě ovlivňuje přezrávání hroznů a přirozený zahušťovací proces. Od dosažené koncentrace sacharidů se poté odvíjí i technologie zpracování hroznů, ta obvykle bývá takzvaně přechodná, což znamená z části oxidativní a mírně reduktivní [5].

### 2.3 Ušlechtilá plíseň

Napadení hroznů ušlechtilou plísní je jeden ze způsobů zajištění hroznů s dostatečnou koncentrací sacharidů, této koncentrace však není možné docílit přirozeným způsobem, ale je nezbytné přistoupit k postupům, jako je zahušťování moštů. Mezi způsoby zahušťování moštů patří metody jako například přezrávání, vymrznutí na keři či zmíněné napadení bobulí ušlechtilou plísní. Docílit dostatečné koncentrace cukrů pomocí přezrávání lze dvěma

různými způsoby, jedním z nich je přirozená cesta, kdy hrozný zůstávající na keři vystaveny slunečnímu záření. V případě druhého způsobu přezrávání se jedná o umělé vysušování, které sice způsobí nerovnoměrné zahuštění hroznů, kdy zahušťování sacharidů probíhá ve vyšší míře než zahušťování kyselin. K zahušťování způsobem vymrzávání se přistupuje v severních vinařských oblastech, které jsou například v Německu, Rakousku, Česku či Slovensku. Bobule se ponechají na keři až do doby, kdy teploty klesnou až k  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , při této teplotě nastává situace, kdy nejméně zralé hrozny částečně zmrznou [5].

Z hroznů napadených ušlechtilou plísní *Botrytis cinerea* je možné získat sladká vína o velmi vysoké kvalitě. Předpokladem napadení hroznů ušlechtilou plísní je jejich dokonalá zralost, další podmínkou rozvoje *Botrytis cinerea* je, aby hrozny dosáhly přibližně 12 % potenciálního obsahu alkoholu a pH se pohybovalo v rozmezí do hodnoty 3,2. Hrozny takto vyzrálé získávají nazlátlou barvu a vytváří se bobule s tlustými slupkami a pigmentem barvy okru. Jako ideální pro navození tohoto procesu bylo shledáno střídání období vlhka se slunečnými dny, což je typické pro podzimní dny. Spóry přečkávající v zemině na vinici jsou aktivovány až právě relativně dlouhým obdobím nejméně dvou až čtyř týdnů během teplého podzimu. V tuto dobu je pro vznik botrytidy ideální vlhkost i teplo, jelikož po vlhkých ranních mlhách působících blahodárně na růst houby následuje slunečné a teplé odpoledne, které způsobí zakoncentrování bobulí. Při narušení rovnováhy ve prospěch deštivých a vlhkých dnů je vysoké riziko vzniku zhoubné plísně šedé [5].

Při napadení hroznů botrytidou nejprve přes slupku pronikají do hroznů hyfy houby, které zajišťují rozklad slupky. Slupka tak už není schopna plnit svou základní vlastnost, ochranu před vnějšími vlivy, a tím začne docházet k postupnému odpařování vody, a tak vlastně k zakoncentrování obsažených sacharidů, ke zvýšení acidity a hustoty hroznů. V důsledku zahuštění obsahu bobule se zvýší osmotických tlak, a ten pak vyvolá smrt houby. Při tomto procesu si sice bobule prakticky zachovává svůj tvar, ale také prochází proměnou do stádia takzvaného upražení, v tomto stádiu pak se postupně provádí takzvaný botrytický sběr [5].

Jelikož ušlechtilá plíseň se vyvíjí velice odlišným tempem na různých hroznech, tak i v rámci jednoho hroznů nemusí být všechny bobule napadeny ve stejný čas. Důsledkem tohoto progresivního rozvoje je nutnost sklízet hrozny jen za podmínky, že dosáhnou dokonalé zralosti. Sběr není prováděn systematicky, nýbrž prakticky tento sběr probíhá probírkou, kdy sběrači procházejí meziřadím a sbírají pouze hrozny nebo jednotlivé části hroznů, jejichž bobule jsou již dostatečně zakoncentrované a získaly vzhled již takzvané



upražené bobule. Počet takovýchto probírek se odvíjí dle klimatických podmínek, obvykle je možné očekávat tři nebo čtyři průchody. Na klimatických změnách nezávisí jen počet probírek, ale je jimi ovlivněna i kvalita sklizených hroznů. Jelikož napadení plísní nebývá jednorázové a samotný rozvoj plísně prochází několika etapami, je vhodné oddělovat jednotlivé mošty a zpracovávat je separátně dle data sběru [5] [6].

## 2.4 Plíseň šedá

Škodlivá hnilobná plíseň se může objevit jako průvodní jev skutečné ušlechtilé plísně, objevuje se hlavně v případech, kdy sklizeň byla provedena za deštivého počasí. Šedá hniloba svými houbovými patogeny výrazně ovlivní některé sensorické vlastnosti vína, jako je barva, vůně či chuť. I další sekundární hniloby spojené s *Botrytis cinerea*, jsou schopny vytvářet sekundární metabolity, které jsou zdrojem organoleptických vad. U takto napadených hroznů se objevuje typická pachůť, ve víně se pak mohou projevit výrazné pachy houbovitého, zemitého a kafrového typu. Plíseň šedá je dokonce schopna poškodit a snížit vonné kvality vína, dále pak může způsobit nestabilitu fermentačních aromat a zapříčinit vznik vad vůní. Pro plíseň šedou je charakteristická její výrazná enzymatická aktivita. K enzymům produkovaných *Botrytis cinerea* v parazitovaných hroznech patří enzym kutináza, glukonáza, oroteináza, esteráza, lipáza a lakáza. Lakáza se podílí na rozkladu monoterpenů a sekundárního aroma vína. Lakáza kromě vlivu na vonnou složku vína zapříčiňuje i změnu barvy vína, tento enzymatický účinek lze pozorovat jako oxidázní zákal a bývá výraznější obvykle u vín červených a růžových. Esterázy jsou schopny rychle enzymaticky hydrolyzovat estery produkované kvasinkami během alkoholové fermentace. Koncentrace těchto esterů se účinkem esterázy může snížit až na desetinu původní koncentrace, čímž dochází k výraznému ovlivnění původního aroma, jelikož mezi hydrolyzované estery patří různé vonné sloučeniny, jako například etylhexanoát vytvářející květinové ovocné aroma či etyldekanoát mající aroma po medu či vosku. Při enzymatických procesech souvisejících s napadením hroznu šedou hnilobou či některými druhy rodu *Penicilium*, pak vzniká sekundární těkavý metabolit geosemin, který je sensoricky velice aktivní a jeho přítomnost ve víně se projevuje tóny vlhké půdy, zatuchliny a řepy. U bílých vín je prahová koncentrace pro vnímání geoseminu už 60 ng/l, naopak u vín červených je tato koncentrace vyšší, 80 ng/l [5] [7].

## 2.5 Tokajské sklepy

Mezi specifické zvláštnosti Tokajské oblasti patří mimo jiné i sklepy, které bývají situovány v hloubce od 8 do 18 metrů v pískovcovém nebo tufovém podloží. Tufové podloží je pro vinné sklepy ideální, jelikož je tato hornina sopečného původu a je tvořena ze sopečného prachu, popela či pemzy, které společně vytvoří jednotlivé vrstvy podloží, do kterých lze snadno hloubit vinné sklepy. Proto byl vyhledávaným stavebním materiálům oproti běžným horninám či zděným vinným sklepům, jelikož tato hornina není tvrdá, lze ji snadno opracovat a má výhodné tepelně izolační vlastnosti. Dostatečná hloubka a struktura podloží tokajských sklepů je schopna zaručit sklepům dostatečnou ochranu před vnějšími povětrnostními vlivy, dále pak zajišťuje relativně stabilní teplotu, která se během celého roku pohybuje v rozmezí od 10 do 12 °C. Kromě stabilní teploty a vlhkosti, ideálně se pohybující v rozmezí od 85 do 95 % vzdušné vlhkosti, se na kvalitě vína odráží i různorodá mikroflóra zahrnující kvasinky, bakterie i plísně vyskytující se na stěnách sklepů, na sudech a dokonce i na lahvích [1] [8] [9] [10].

S tokajskými sklepy jsou neodmyslitelně spojovány nadýchané chomáče a porosty šedé až antracitové černé sklepní plísně *Cladosporium cellarae*. Typickým místem výskytu *Cladosporium cellarae* jsou obecně prostory s vysokou vlhkostí, nižší teplotou a hlavně s těkavými alkoholovými výpary rozptýlenými v ovzduší, které jsou pro *Cladosporium cellarae* zdrojem „výživy“ tedy uhlíku. Kromě tokajských sklepů se proto plíseň *Cladosporium cellarae* hojně rozrůstá i po stěnách v okolí dubových či kaštanových sudů či přímo na jejich povrchu, kde vytváří souvislou pokrývku, čímž zamezí kolonizaci povrchu sudů jinými mikroorganismy a případné kontaminaci. V dřevěných sudech kromě vína mohou být skladovány pro zrání a stárnutí i jiné alkoholické nápoje jako je whisky či brandy, jelikož podíl těkavých látek jako zdroje uhlíku v ovzduší překračuje až 2 % ročně. *Cladosporium cellarae* v tokajských sklepech prakticky funguje jako přirozený biologický filtr čistoty, jelikož je schopna uvolněné těkavé sloučeniny zpracovávat, a tak pozitivně působit na vlhkost sklepního ovzduší a zajišťovat její stabilní hodnotu nad 85 %. Avšak s takto vysokou vzdušnou vlhkostí bývá spojena i vyšší koncentrace výtrusů jiných plísní ve vzduchu, která může být až dvojnásobná oproti místům bez přítomnosti *Cladosporium cellarae*. Mikrocondenzace alkoholů, esterů, vodních par a dalších komponent vína přímo napomáhá vytváření typického buketu a celkového charakteru Tokajských vín [1] [8] [9] [10].

## **3 POLYFENOLICKÉ SLOUČENINY**

### **3.1 Úvod**

Z chemického hlediska lze fenolické látky charakterizovat jako sloučeniny nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin přímo vázaných na jedno nebo více benzenových jader. Základní stavební jednotkou, na které je celá skupina fenolických látek postavena, je fenol. Struktura fenolických sloučenin se pohybuje v širokém rozmezí od jednoduchých fenolických molekul až po komplexní vysokomolekulární polymery. Většina fenolických sloučenin je častěji přítomna ve vázané formě jako estery či glykosidy než ve volné formě, některé z nich jako například taniny a lignany se nachází ve formě polymerů [11].

Fenolické sloučeniny reprezentují širokou skupinu molekul s rozličnými vlastnostmi a funkcemi důležitými například pro růst, rozvoj a obranu rostlin. Skupina fenolických látek zahrnuje signální molekuly, pigmenty a aroma, které mohou vábit, odpuzovat či chránit rostlinu před hmyzem, plísněmi, bakteriemi a viry [11].

### **3.2 Fenolické sloučeniny a vliv na lidské zdraví**

Jejich důležitost pro lidské zdraví je v posledních letech silně podporována v oblasti prevence degenerativních onemocnění, zejména rakoviny, kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění, ale také zánětu, infekce či alergie. Fenolické sloučeniny patří mezi látky se silným antioxidačním účinkem, které spolupracují spolu s vitamíny a enzymy při obraně proti oxidačnímu stresu způsobeného přebytkem reaktivních forem kyslíku. Kromě antioxidační vykazují fenolické látky i antimikrobiální aktivitu, jelikož jsou schopny utlumit tvorbu biofilmu mikroorganismů, dále také dokáží zneutralizovat mikrobiální toxiny. Velikost antimikrobiálního účinku předurčuje počet hydroxylových skupin a množství a poloha dvojných vazeb ve sloučenině, účinek může být ovlivněn i způsobem extrakce fenolických látek. Obecně jsou fenolické sloučeniny schopny vylučovat volné radikály a působit jako chelátory pro ionty kovů schopných katalýzy oxidace lipidů [12] [13] [14].

### 3.3 Fenolické látky a víno

Fenolické sloučeniny ve vinohradnictví a vinařství hrají velmi důležitou roli, jejich přítomnost ve víně má esenciální význam pro některé základní vlastnosti vína, jako je například barva či chuť, kdy fenolické látky zapříčiňují hořkost či typickou tříslovitost přítomnou ve víně. Množství fenolických látek se ale může mezi jednotlivými odrůdami určenými pro výrobu bílých a červených vín výrazně lišit. Jejich obsah bývá rozličný jak mezi bílými a červenými víny, tak rozdíly ve složení můžeme detekovat i mezi mladšími a staršími ročníky. Koncentrace fenolických látek může stoupat či klesat v závislosti na obsahu cukerných složek či úrovni vyzrállosti hroznů, jejichž množství je stěžejní hlavně pro odrůdy vín červených. Modré hrozny s vysokým obsahem sacharidů mají taktéž vyšší koncentraci fenolických látek, naopak dostatečná vyzrállost hroznů zajišťuje snadnou extrakci látek odpovědných za typické chuťové vlastnosti červených vín – taniny a antokyany. K uvolňování taninů z dostatečně vyzrálých semen dochází podstatně pomaleji než ze semen nevyzrálých, což pak vínům z dobře vyzrálých hroznů zajišťuje jemnější chuť. Na koncentraci fenolických látek mají kromě koncentrace sacharidů v hroznech, vyzrállosti či typu odrůdy vliv také klimatické a topografické podmínky stanoviště révy. Obsah fenolických látek je ovlivněn společným působením slunečního záření, teploty, vlhkosti, obsahu živin a vody. Některé fenolické látky jako například resveratrol dosahují vyšších koncentrací v chladnějších pěstitelských podmínkách než v horkém pěstitelském prostředí, proto z pohledu produkce fenolických sloučenin je pěstování révy vinné v České republice velice prospěšné. V oblastech chladného podnebí, jako je Česká republika, dochází k rozdílu mezi teplotami ve dne a v noci, což má pozitivní dopad na vyzrávání hroznů v době jejich zrání. Teplotní rozdíly kladně ovlivní harmonii mezi sacharidovými složkami a kyselinami a také obsah aromatických látek [15] [16] [17] [18].

### 3.4 Klasifikace

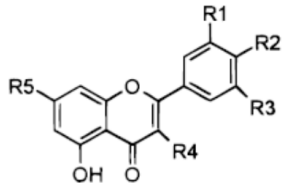
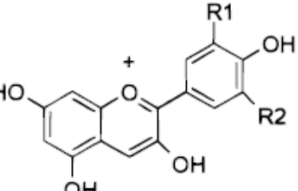
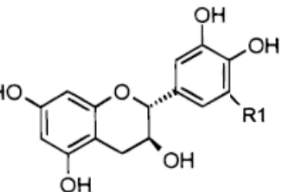
V současnosti neexistuje oficiální návod, jak by fenolické sloučeniny měly být rozdělovány do skupin, většina klasifikací se zakládá na rozřazení podle chemické struktury, podle čehož můžeme fenolické sloučeniny dělit čtyřmi způsoby. Jedním z nejjednodušších způsobů je rozdělení na flavonoidní a ne flavonoidní fenolické sloučeniny, dále je možné fenolické sloučeniny hodnotit podle počtu aromatických jader, za specifitější lze označit klasifikaci na základě charakteristiky uhlíkového řetězce, která jednoduše popisuje, jak jsou jednotlivé atomy uhlíku v molekule uspořádány. Nejvíce specifická a také široce užívaná

je klasifikace, která se vyjadřuje k zastoupení jednotlivých atomů prvků v molekule, funkčním skupinám či k saturaci a typu jednotlivých vazeb propojujících celou molekulu [19].

Užití daného typu klasifikace taktéž závisí na tom, jaké informace o struktuře či vlastnostech jsou pro danou studii důležité. Například rozdělení fenolických sloučenin na základě jejich rozpustnosti je esenciální hlavně z hlediska nutričního, kdy rozpustnost či nerozpustnost značně ovlivňuje jejich osud v trávicím traktu a následný fyziologický efekt. V tomto případě pro klasifikaci bylo zvoleno rozdělení na 2 základní skupiny na flavonoidy a neflavonoidy, a dále pak byly charakterizovány některé fenolické sloučeniny, které do těchto skupin můžeme zařadit, s ohledem na jejich výskyt, množství obsažené ve vínech a důraz byl kladen zejména na sloučeniny, které ovlivňují vlastnosti s esenciálním významem pro typické sensorické charakteristiky vína [19].

### **3.5 Flavonoidní fenolické sloučeniny**

Flavonoidní fenolické sloučeniny udávají charakter spíše vínům červeným než vínům bílým, jelikož v červených vínech množství flavonoidů prakticky tvoří většinové množství všech fenolických látek, více než 85 % celkového obsahu fenolických sloučenin tj. více než 1000 mg/l, naopak ve vínech bílých typicky představují menšinu, jelikož zastupují méně než 20 % celkového obsahu fenolických sloučenin tj. méně než 50 mg/l. Míra flavonoidů, které se během extrakce z hroznů během výroby vína uvolní, závisí na řadě faktorů. Extrahovatelné množství je omezeno samotným množstvím v daném ovoci, dále klimatickými podmínkami během zrání a vyzrálostí ovoce. Extrakci flavonoidů velmi výrazně ovlivňuje způsob macerace, pH, obsah alkoholů a také teplota a délka trvání fermentace. Nicméně, flavonoidy patří mezi látky obsažené ve víně, které podléhají největším změnám během zrání a stárnutí, co se týče jejich množství a struktury. V hroznech jsou flavonoidy syntetizovány především v slupce a semenech, malé množství je také produkováno ve stopkách, flavonoly a antokyany jsou primárně uloženy ve slupce, naproti tomu flavonoly a jejich polymery se především vytváří v semenech a stopkách, a ve slupce pouze z malé části [20].

Flavonoly, antokyanidiny, flavan-3-oly	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	
	Kvercetin	OH	OH	H	OH	OH
	Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH
	Kemferol	H	OH	H	OH	OH
	Luteolin	OH	OH	H	H	OH
	Rhamnetin	OH	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>
	Isorhamnetin	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH	OH
	Pelargonidin	H	H	-	-	-
	Kyanidin	OH	H	-	-	-
	Delfinidin	OH	OH	-	-	-
	Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	-	-	-
	Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	-	-	-
	Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-	-	-
	(+)-catechin	H	H	-	-	-
	(+)-gallocatechin	OH	H	-	-	-

Tabulka č. 1: Flavonoidní sloučeniny - vlastní zpracování dle zdroje č. 20

### 3.5.1 Flavonoly

Flavonoly produkované ve slupce jsou sbírány v buněčných vakuolách epidermis a vnější hypodermis, toto jejich uskladnění spolu s antokyany u červených vín umožňuje absorpci ultrafialového záření, a tím chrání vnitřní tkáň před poškozujícím efektem ultrafialového záření. Syntézu flavonolů aktivuje expozice hroznů ultrafialovému záření a modrému záření viditelného spektra. K základním flavonolům řadíme kvercetin, myricetin, kaempferol a luteolin, které se v hroznech nacházejí ve spojení se sacharidy ve formě glykosidů, galaktosidů či glukuronidů. Flavonoly ze všech flavonoidů přítomných hroznech zastupují nejmenší podíl na celkovém obsahu flavonoidů, konkrétně 1-10 % v závislosti na odrůdě a podmínkách zrání [20].

### 3.5.2 Flavan-3-oly

Jednoduché flavanoly, jako jsou katechin, epikatechin a epikatechin galát, se v bobulích nacházejí ve slupce, semenech a třapínách. V průběhu dozrávání hroznů se jednoduché flavanoly mění a vytváří polymery s různými stupni polymerizace, polymery s nižším stupněm obvykle spojují v průměru 10 jednotek, naopak polymery s vyšším stupněm polymerizace dosahují počtu až 30 jednotek. Ve vinařství mají flavanoly esenciální význam

pro kvalitu a chuťové vlastnosti vína, jelikož jejich polymery mimo jiné identifikujeme jako kondenzované taniny neboli třísloviny, které spolu s hydrolyzovatelnými taniny, kyselinou gallovou a elagovou, dodávají vínům jejich charakteristické sensorické vlastnosti. Přítomnost flavanolu a jejich polymerů lze chuťovými pohárky zaznamenat jako hořkou chuť, která je nejvíce vnímatelná v zadní části jazyka, či jako tříslovitost. Hořké chuťové vjemy se stupňují se zvyšujícím se množstvím monomerních flavanolů s nižší molekulovou hmotností, které se vyskytují zejména v semenech bobulí. Naopak tříslovitostí, která se projeví až po interakci taninů s látkami v ústech, označujeme chuťový vjem, pro který je charakteristický pocit vysušenosti až drsnosti. Za tříslovité tóny ve víně nesou odpovědnost vysokomolekulární flavanoly s vyšším stupněm polymerizace, které pocházejí především ze slupky. Taniny, které mají původ ve slupce, obvykle méně interagují s proteiny přítomnými ve slinách, díky čemuž dávají vzniknout vínům hladkým a jemným, bez významné hořké či trpké chuti [15] [18] [21] [22].

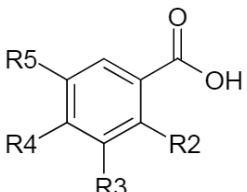
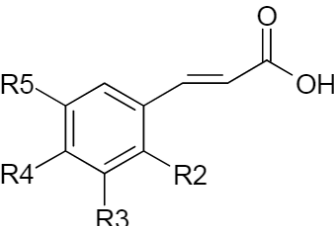
### 3.5.3 Antokyany

Klíčovým zdrojem zajišťujícím červeným vínům jejich barevnost jsou antokyany, nicméně volné antokyany nepatří mezi mimořádně stabilní látky, proto antokyany prochází komplexní sérií reakcí, které zajistí jejich stabilitu, jako je například kopigmentace či polymerizace. V případě kopigmentace se jedná o krátkodobé řešení nestálosti antokyanů, naopak polymerizace s flavanoly a procyanidiny patří mezi relativně dlouhodobé způsoby stabilizace antokyanů. Antokyany v hroznech existují také ve formě glykosidů, cukernou složku obvykle tvoří glukóza, glykosidická vazba zvyšuje jak chemickou stabilitu, tak rozpustnost antokyanů. Antokyanová barviva se tedy skládají ze dvou částí, cukerné složky a antokyanidinů, mezi které se řadí malvidin, kyanidin, delphinidin, petunidin a peonidin. Nejčastěji se u modrých odrůd vína vyskytuje malvidin-3-glukosid, dále cynidin-3-glukosid, delifidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid. Obvykle ve vínech lze nalézt monoglukosidická barviva, výjimečně u některých specifických odrůd se objevují i diglukosidická barviva. Rezervoárem antokyanů v hroznech bývají u většiny odrůd vakuoly buněk slupky, u vybraných odrůd, které se označují barvířky, je zdrojem antokyanů i dužnina. Složení antokyanů se během dozrávání hroznů mění a bývá ovlivněno klimatickými a pěstitelskými podmínkami, některými postupy během výroby vína či je ovlivněna již samotnou odrůdou. Množství antokyanů pozitivně koreluje se slupkovými taniny, a tak

bobule s vysokým obsahem taninů ze slupky obsahují i vyšší koncentraci antokyanů. Tvorba antokyanů úzce souvisí s ukládáním cukrů ve slupce, se zvyšující se koncentrací sacharidů postupně množství antokyanů narůstá, dokud hrozny nepřekročí hranici zralosti, u přezrálých hroznů obsah antokyanů naopak vykazuje klesající tendenci z důvodu narušení celistvosti slupky, například díky napadení hroznů hnilobami [15] [18] [20].

### 3.6 Neflavonoidní fenolické sloučeniny

Neflavonoidní fenolické látky řadíme mezi látky s jednodušším strukturním uspořádáním oproti flavanoidům, ale jejich původ ve víně je naopak velice různorodý. Ve vínech, která nedozrávala v dubových sudech, se primárně vyskytují deriváty kyseliny hydroxyskořicové nebo hydroxybenzoové. Tyto kyseliny jsou převážně uloženy v buněčných vakuolách v buňkách slupky a dužniny, ze kterých jsou snadno extrahovatelné. Za nejpočetnější a zároveň nejrozličnější skupinu neflavonoidních fenolických látek lze označit deriváty kyseliny hydroxyskořicové, jelikož se mohou vyskytovat jak ve formě esterů s kyselinou vinnou, tak mohou být spojovány s cukry, rozličnými alkoholy či organickými kyselinami [20].

Deriváty kyseliny hydroxybenzoové a skořicové		R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
	Kyselina gallová	H	OH	OH	OH
	Kyselina gentisová	OH	H	H	OH
	Kyselina p-hydroxybenzoová	H	H	OH	H
	Kyselina protokatechová	H	OH	OH	H
	Kyselina salicylová	OH	H	H	H
	Kyselina syringová	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
	Kyselina vanilová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
	Kyselina o-kumarová	OH	H	H	H
	Kyselina m-kumarová	H	OH	H	H
	Kyselina p-kumarová	H	H	OH	H
	Kyselina kávová	H	OH	OH	H
	Kyselina ferulová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
	Kyselina sinapová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Tabulka č. 2: Deriváty fenolických kyselin, vlastní zpracování dle zdroje č. 21

#### 3.6.1 Hydroxybenzoové kyseliny

Hydroxybenzoové kyseliny jsou charakterizovány přítomností karboxylové skupiny substituované na fenolu. Jejich obsah ve víně je oproti jiným fenolickým sloučeninám výrazně nižší a ovlivňuje jej i odrůda či podmínky, které panovaly během růstu. Spíše než ve volné



formě se hydroxybenzoové kyseliny vyskytují ve formě vázané, a to především ve formě glykosidů a esterů s kyselinou gallovou a elagovou. Mezi hydroxybenzoové kyseliny se řadí například kyselina syringová, dále pak p-hydroxybenzoová, protokatechová a především kyselina gallová, která patří mezi klíčové a nejvíce zastoupené hydroxybenzoové kyseliny v hroznech, konkrétně v pevných částech bobule [15] [21] [23].

### 3.6.2 Hydroxyskořicové kyseliny

Hydroxyskořicové kyseliny lze označit za převládající fenolické sloučeniny v bílých odrůdách. Hlavním zdrojem hydroxyskořicových kyselin bývá především slupka a dále pak dužnina bobule, díky přítomnosti v dužnině je vždy zaručena jejich přítomnost v moštu a jejich množství pak prakticky nelze ovlivnit způsobem zpracování hroznů. Mezi hydroxyskořicové kyseliny se řadí například kyselina kumarová, kávová, ferulová či kaftarová, které jsou hlavními výchozími látkami pro tvorbu těkavých fenolů, které vznikají během výroby především bílých vín. Ze sensorického hlediska nevykazují žádné zbarvení, dokud nedojde k jejich oxidaci, které podléhají snadno a která následně vede ke změně zbarvení na žlutou či hnědou barvu. U moštů a vín bílých odrůd dochází vlivem oxidace hydroxyskořicových kyselin ke hnědnutí, u moštů a vín červených odrůd hrají hydroxyskořicové kyseliny zásadní roli pro „kopigmentaci“. Hnědnutí zapříčiňuje vysoký obsah hydroxyskořicových kyselin, a tím i následně vysoký obsah těkavých fenolů, jelikož hydroxyskořicové kyseliny jsou enzymaticky činností hydroxycinamát dykarboxylázy převedeny do formy vinylfenolů, které se další enzymatickou reakcí přemění na ethylfenoly. Vyšší obsah ethylfenolů se vyskytuje častěji u červených vín a vín, jejichž zrání probíhalo v dřevěných sudech, jejich přítomnost se projeví jako pach kůže, potu koně či vůně laku. Naopak přítomnost některých vinylfenolů, lze sensoricky detekovat jako plastovou, lékárnickou a připálenou vůni. Vinylfenoly zpravidla vznikají u bílých odrůd, u kterých dochází k výraznému zahnědnutí slupky vlivem nadměrného vystavení hroznů slunečnímu záření, a tím zvýšení tvorby prekurzorů těkavých fenolů. Vyšší množství takových hroznů v úrodě může negativně působit na aromatické vlastnosti vína, projevuje se zejména hořkou a tríslovitou chutí, a ovocné aroma typické pro danou odrůdu výrazně snižuje svoji intenzitu vlivem těchto těkavých fenolů. Jakmile hodnota součtu obsahu obou těkavých fenolů ve víně přesáhne hranici 800 µg/l objevuje se plastové a lékárnické aroma, které je velice jasně smyslně vnímáno [15].

### 3.6.3 Stilbeny

Stilbeny patří mezi látky označované jako fytoalexiny, což jsou látky s nízkou molekulární hmotností a antimikrobiálním účinkem. Produkce stilbenů se vyvíjí v reakci rostliny na abiotický stres, déšť nebo ultrafialové záření, a z důvodu ochrany rostlin proti mikrobiálním agens. Oproti ostatním neflavonoidním fenolickým sloučeninám jsou stilbeny relativně málo zastoupená skupina, do nichž řadíme resveratrol, pterostilben a pinosylvin. Na základě jejich struktury stilbeny označujeme jako 1,2,-diaryletheny, jedná se o fenolické sloučeniny složené ze dvou benzenových jader propojených ethanovým můstkem, díky čemuž stilbeny mohou existovat ve formě dvou izomerů, cis a trans-stilbeny. Stilbeny se vyskytují u mnoha různých rostlin, ve víně, brusinkách či arašídech, valná část stilbenů v těchto rostlinách jsou deriváty trans-resveratrolu [14] [15] [19].

## 3.7 Vybrané fenolické sloučeniny

### 3.7.1 Protokatechová kyselina

Protokatechová kyselina se odvozuje od kyseliny benzoové, na kterou se do pozic 3 a 4 připojí dva hydroxylové substituenty. Kyselina prokatechová působí na lidské zdraví díky své antioxidační aktivitě, zahrnující inhibici tvorby volných radikálů a zároveň jejich vychytávání, je také známá pro své antibakteriální, protizánětlivé a protektivní účinky proti onemocněním kardiovaskulárního systému [24] [25].

### 3.7.2 Syringová kyselina

Kyselina syringová patří mezi hydroxybenzoové kyseliny, systematicky nazývána 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová kyselina. Syringová kyselina je jedna z fenolických látek, které se často nachází v různých alkoholických nápojích, vzniká také jako metabolický produkt mikrobiálního štěpení antokyanů a dalších fenolických látek ve střevě. Kyselina syringová vínům dodává jejich pozitivní vliv na zdraví, jelikož hraje důležitou roli v boji proti oxidaci lipoproteinu o nízké hustotě tzv. LDL cholesterolu, který podporuje rozvoj aterosklerózy [26].

### 3.7.3 Gallová kyselina

Gallová kyselina se řadí mezi organické kyseliny, systematickým názvem je označována jako 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina. V přírodě se nachází kyselina gallová například v lískových oříšcích, borůvkách, jahodách, mangu či hroznových semenech, významné množství obsahují některé čaje či káva. Ve víně se vyskytuje ve volné formě či vázaná jako součást hydrolyzovatelných taninů či bývá esterifikována kyselinou vinnou, ve starších ročnících i etanolem [27] [28].

### 3.7.4 Kávová kyselina

Kyselina kávová, 3,4-dihydroxyskořicová kyselina, je jedna z nejvíce zastoupených hydroxyskořicových kyselin v rostlinách. Jako zdroj kávové kyseliny lze považovat kávu, borůvky, jablka či přírodní léčivé přípravky na bázi propolisu. Kávová kyselina kromě svých antikancerogenních účinků vykazuje i antioxidační či antibakteriální aktivitu, což se pozitivně projevuje v prevenci aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění. V hroznech bílých vín se kávová kyselina působením enzymu lakkázy, exocelulární enzym produkovaný *B.Cinerea*, transformuje na chinony, které mají tendenci polymerizovat a vytvářet zlaté až hnědé produkty, které dodávají tokajským vínům jejich charakteristické zbarvení [6] [29].

### 3.7.5 Ferulová kyselina

Základní kámen kyseliny ferulové tvoří skořicová kyselina nesoucí methoxy a hydroxy substituenty vázané na pozici 3 a 4 na benzenovém jádře, systematicky se kyselina ferulová tedy nazývá 4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina. Ferulová kyselina je jedna z nejvíce zastoupených fenolických kyselin v rostlinách jako je pšenice, cukrová řepa, kukuřice či ječmen, konkrétně v buněčných stěnách buněk listů či semen. V rostlinách se zřídka vyskytuje ve volné formě, obvykle se objevuje vázaná na organické kyseliny či glykosidy [30] [31].

### 3.7.6 P-kumarová kyselina

4-hydroxyskořicová neboli p-kumarová kyselina patří mezi jeden z izomerů kyseliny kumarové, jejíž hydroxylový substituent se nachází na čtvrtém uhlíku benzenového jádra. Do skupiny izomerů kyseliny kumarové se kromě p-kumarové řadí i o-kumarová a m-kumarová, avšak p-kumarová je z nich v přírodě nejčastěji zastoupena, je přítomna například v rajčatech, mrkvi či česneku. Kyselina p-kumarová a její deriváty se staly důležitou součástí používanou ve farmaceutickém průmyslu či parfumerii [32] [33].

### 3.7.7 Chlorogenová kyselina

Za jednu z nejhojnějších a nejčastěji zkoumanou hydroxyskořicovou kyselinu můžeme označit kyselinu chlorogenovou a její případné deriváty. Z hlediska chemické struktury patří kyselina chlorogenová mezi estery kyseliny kávové s kyselinou chinovou. Mezi důležité nutriční zdroje kyseliny chlorogenové se řadí kromě hroznů i jablka, mrkev, hrušky či například brambory [19].

### 3.7.8 Kaftarová kyselina

Za nejběžnější ve víně vyskytující neflavonidní látku lze označit kaftarovou kyselinu, která má díky svým oxidačně-redukčním schopnostem klíčovou roli pro oxidační reakce v bílých a růžových vínech, naopak v červených vínech svou důležitost ztrácí kvůli výrazně vyššímu množství tříslovin, které vykazují podobné chemické vlastnosti. Z hlediska chemické struktury lze kyselinu kaftarovou označit za ortho-difenol, neboli katechol, který se relativně lehce oxiduje na příslušný chinon [34].

### 3.7.9 Epikatechin a katechin

Epikatechin spolu s katechinem tvoří základní strukturní jednotky pro vznik kondenzovaných tříslovin ve vinné révě, kromě révy se nachází v zeleném či bílém čaji. Katechin se snadno rozpouští ve vodě a snadno podléhá oxidaci, jelikož obsahuje ve své struktuře dvě fenolické skupiny vedle sebe. V mírně oxidativním prostředí snadno uvolňuje rudě zabarvenou látku kyanidin, proto se někdy katechiny nazývají prokyanidiny, kyanidin pak zapříčiní vznik vady bílých vín takzvané růžovění [22] [35].

### **3.7.10 Resveratrol**

Resveratrol, neboli 3,4,5-trihydroxystilben se v přírodě vyskytuje ve dvou geometrických uspořádáních, jako cis a trans izomer. Resveratrol se v rostlinách, jako například borůvkách, černém rybízu či v arašídech, syntetizuje v reakci na stresové situace, napadení rostliny mikroorganismy, vystavení UV záření či mechanickému poškození. V současnosti je resveratrol středem zájmu kvůli jeho značným benefitům pro lidské zdraví jako jsou antioxidační, chemoprotektivní, protizánětlivé účinky a podíl při prevenci kardiovaskulárních onemocnění [36] [37] [38].

## 4 ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK

### 4.1 Úvod

Analýza fenolických sloučenin zahrnuje širokou škálu různých analytických technik, využívají se metody relativně instrumentálně a chemicky nenáročné i techniky vysoce komplexní schopné detailně popisovat jednotlivé chemické sloučeniny. Relativně běžně se stanovuje obsah celkových fenolických látek pomocí přímé kolorimetrické techniky zjišťující absorpenci vzorku při 280 nm či stanovení absorbance vzorku po reakci s Folin-Ciocalteu činidlem. V praxi se dále stanovuje celková antioxidační aktivita všech obsažených fenolických sloučenin ve vzorku, která se hodnotí na základě schopnosti buď předávat atom vodíku, a tím eliminovat radikály, nebo na podkladě jejich redoxních vlastností. V současnosti se ke kvantifikaci a identifikaci fenolických sloučenin využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, zejména pak ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Analýza fenolických látek ve víně se provádí z důvodu jejich důležitosti pro základní organoleptické charakteristiky vína, dále kvůli zjištění vlivu stárnutí vína na jejich množství a složení ve víně. Obecně se v rozličných potravinách fenolické sloučeniny identifikují a kvantifikují kvůli jejich pozitivnímu vlivu na lidské zdraví vzhledem k jejich antioxidačním vlastnostem [40] [41] [42] [43].

### 4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se řadí mezi separační metody, jejichž princip dělení látek staví na základě odlišné distribuce různých sloučenin mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je v tomto případě kapalina, která zastává úlohu pohyblivé mobilní fáze, která prostupuje fází druhou označovanou jako stacionární. Role stacionární fáze pak je zastoupena buď tuhou látkou či kapalinou fixovanou na tuhý nosič, stacionární fáze je naplněna do kolony ve formě sorbentu. Mezi nejčastěji využívané uspořádání kapalinové chromatografie patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie, pro toto uspořádání je typické využití částic sorbentu o velikosti částic menší než 10  $\mu\text{m}$  a instrumentace, která se vyznačuje schopností odolávat i vyšším tlakům, jelikož je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za tlaku přesahujícím hodnotu desítek MPa. Nutnost použití odolné instrumentace a vysokotlakého čerpadla je z důvodu malé velikosti částic sorbentu, které vykazují velký odpor proti převodu hmoty mobilní fáze, proto se pak přistupuje k analýze za vysokého tlaku [42] [43]

### 4.2.1 Popis chromatografického procesu

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie staví zejména na principu adsorpce, dělení látek podle hodnoty molekulové hmotnosti či jejich velikosti, výměně iontů nebo stereochemickým interakcím, které se projeví rozdílnou distribucí látek mezi mobilní a stacionární fází. Při procesu dělení jednotlivých součástí směsi se opakovaně ustavuje rovnovážný stav dělených látek mezi stacionární a mobilní fází, k rozdílnému zastoupení koncentrací dělené látky v mobilní a v stacionární fázi se vyjadřuje distribuční konstanta, která se rovná podílu koncentrace složky ve stacionární fázi a koncentraci v mobilní fázi. Proto podmínkou separace látek pomocí kapalinové chromatografie je odlišná distribuční konstanta jednotlivých dělených komponent analyzované směsi [42] [43].

Zadržování látek na koloně a jejich následné vymývání z kolony je ovlivněno nejen vlastnostmi dělených látek, ale odvíjí se i od povahy jak stacionární, tak mobilní fáze, jejichž složení může být konstantní v případě izokratické eluce nebo naopak v případě gradientové eluce, při které se podíl jednotlivých složek v mobilní směsi mění ve prospěch látky s vyšší eluční silou. Při gradientové eluci je mobilní fáze přiváděna z více zásobníků a k mísení dochází na základě předem stanoveného programu, tento typ eluce se využívá v situacích, kdy se stanovuje komplexní směs složená ze součástí, které se výrazně liší ve svých fyzikálních či chemických vlastnostech. Významnou roli kromě proměnlivosti složení mobilní fáze hraje při separaci také použitý typ stacionární fáze. Typ stacionární fáze se liší dle použitého chromatografického módu. V minulosti patřil mezi nejdominantnější typ separace systém s normálními fázemi, pro který je typické využití polární stacionární fáze s vyšší polaritou, než kterou má fáze mobilní. Jako stacionární fáze se například používal oxid křemičitý, oxid hlinitý či porézní grafit a roli mobilní fáze zastupoval například hexan. V současnosti se k separaci na normální fázi přistupuje jen v určitých situacích, například při stanovení látek vitamínu K, lipidů či při separaci tokoferolu a retinolu. Většina chromatografických analýz staví na principu rozdělení molekul mezi mobilní a stacionární fází, což je typické pro reverzní chromatografický mód, pro který je typické použití nepolární stacionární fáze, například chemicky modifikovaný oxid křemičitý, a polárního rozpouštědla jako mobilní fáze (převážně methanolu, anebo acetonitrilu ve směsi s vodou) [42] [43].

### 4.3 Separace a kvantifikace fenolických látek pomocí HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je metodou volby v případě separace i kvantifikace fenolických sloučenin ve víně, jelikož se řadí mezi separační techniky, které úspěšně spojují vysokou separační účinnost s rychlou detekcí a s jednoduchou automatizací. K analýze fenolických sloučenin ve víně je možné použít kromě tradičních částicových sorbentů také monolitické kolony, které jsou tvořeny celistvým pórovitým materiálem vyplňujícím vnitřní prostor kolony. Monolitické kolony výrazně přispívají ke zkrácení doby analýzy, jelikož oproti klasickým kolonám jejich vnitřní stavba umožňuje použití vyšších průtokových rychlostí mobilní fáze bez rizika výrazného zvýšení zpětného tlaku a současně beze změny v separační účinnosti. Nahrazení tradičních kolon monolitickými při stanovení fenolických sloučenin bylo poprvé uskutečněno v roce 2002 skupinou vědců, která potvrdila výše zmíněné výhody monolitických kolon a mimo to dosáhli zlepšení v rozlišení signálu a šumu a dále zkrácení času promývacích a ustalovacích procesů. O 8 let později vytvořila a otestovala skupina vědců velice rychlou (8 minut), spolehlivou a reprodukovatelnou metodu pro stanovení 13 fenolických sloučenin pomocí monolitických kolon. V roce 2012 byly pro analýzu fenolických sloučenin ve víně testovány kolony se sorbentem tvořeným povrchově porézními částicemi. Použití povrchově porézních částic se dramaticky odrazilo na selektivitě, rozlišení a rychlosti separace, výsledkem bylo významné zlepšení účinnosti v porovnání s celkově porézními částicemi, snížení spotřeby mobilní fáze a zvýšení rychlosti analýzy bez nárůstu zpětného tlaku v systému. Při stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC dominují mezi mobilními fázemi acetonitril a metanol, pH mobilní fáze se pohybuje v rozmezí 2-4 s cílem zabránit ionizaci fenolických látek během identifikace. Oproti izokratické eluci se spíše při analýze fenolických látek dává přednost gradientové eluci a to zejména z důvodů rozdílných fyzikálně chemických vlastností látek a poměrně složité analyzované matrici [40] [43] [44] [45] [46].

Některé fenolické sloučeniny obsažené ve víně vykazují typickou absorpenci v určitých vlnových délkách ultrafialového či viditelného spektra. Široké spektrum fenolických látek má největší absorpenci při vlnové délce 280 nm, proto se tato vlnová délka jeví jako vhodnou pro detekci fenolických látek pomocí detektorů s diodovým polem nebo UV-Vis detektorů. Pro flavanoly jsou typické dvě absorpční maxima při vlnových délkách 210 a 278 nm, zatímco barevné antokyany vykazují dokonce tři absorpční maxima



kolem vlnové délky 270, 465 a 560 nm. Analýzu kondenzovaných taninů pomocí HPLC komplikuje velikost a stupeň polymerace těchto molekul. Absorpční spektra některých fenolických látek se velice podobají, čímž následnou jednoznačnou identifikaci znesnadňují, proto se jeví jako vhodné spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, která identifikuje jednotlivé fenolické látky na základě jejich struktury [40] [43] [47] [48].

### 4.3.1 Příklady stanovení fenolických sloučenin ve víně

#### 4.3.1.1 Příklad stanovení číslo 1 - Resveratrol-derivates and antioxidative capacity in wines made from botrytized grapes

Tato studie se zabývala antioxidační kapacitou vín vyrobených z hroznů napadených *Botrytis cinerea* a stanovením koncentrace resveratrolu a jeho derivátů v těchto vínech. V 18 Tokajských vínech pocházejících z maďarské části Tokajské oblasti oproti 15 botrytickým vínům „Prädikat“ vyrobených v Německu byla zjištěna vyšší koncentrace resveratrolu a polydatinu, tokajská vína obsahovaly v průměru 2,5 mg/l a koncentrace v německých vínech dosahovala v průměru 0,9 mg/l. Vzhledem k rozdílům ve výrobě obou vín, tokajská vína vykazují vyšší antioxidační kapacitu [49].

<b>Testovaný materiál</b>	Botrytické vína
<b>Stanovované látky</b>	cis-Polydatin, trans-Polydatin, trans-Resveratrol, cis-Resveratrol
<b>Kolona</b>	Fluofix® 120 E RP-column (NEOS Company Ltd.; 250 x 4,6 mm; 5µm)
<b>Detekce</b>	DAD detekce (310/286 nm)
<b>Mobilní fáze</b>	A - kyselina octová ve vodě (56,2 : 900); B - 80% acetonitril + 20% fáze A
<b>Gradientová eluce:</b>	
0. - 17. min.	82% A; 18% B
17. -21. min.	77% A; 23% B
21.- 27. min.	75% A ; 25% B
27 - 30. min.	68% A; 32% B
30. - 40,1. min.	0 % A; 100% B
40,1. - 55. min.	82% A; 18% B

Tabulka č. 3: Podmínky stanovení fenolických sloučenin v příkladu č. 1

#### 4.3.1.2 Příklad stanovení číslo 2 - Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries

Cílem této studie bylo za pomoci 39 standardů fenolických sloučenin vytvořit LC/UV a MS/MS knihovnu spekter, díky které by bylo možné identifikovat fenolické látky v různých vzorcích vína s co nejmenší pracovní náročností. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s DAD detektorem patří mezi nejčastěji využívané metody stanovení různých sloučenin ve víně, nicméně UV spektra některých fenolických látek jsou velice podobná, a tak se stále častěji využívá spojení LC-MS, jako nejlepší metodě pro studium fenolických látek v hroznech a víně [50].

<b>Testovaný materiál</b>	6 červených vín
<b>Stanovované látky</b>	39 fenolických sloučenin
<b>Kolona</b>	Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies; 250 x 4,6 mm; 5µm)
<b>Detekce</b>	DAD-ESI-MS/MS
<b>Mobilní fáze</b>	A - 1% kyselina octová ve vodě B - 1% kyselina octová v metanolu)
<b>Gradientová eluce:</b>	
0. - 25. min.	10 - 22% B
25. - 45. min.	22 - 50% B
45. - 55. min.	50 - 95% B
55 - 60. min.	95% B
60. - 63. min.	95 - 10% B
63. - 66. min.	10% B

Tabulka č. 4: Podmínky stanovení fenolických sloučenin v příkladu č. 2

#### 4.3.1.3 Příklad stanovení číslo 3 - Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands

V této studii byly podrobeny zkoumání 3 odrůdy bílých vín původem z kanárských ostrovů, cílem zkoumání bylo zjištění rozdílu ve složení spektra fenolických sloučenin mezi různými odrůdami, „Listán blanco“, „Verdello“ a „Gual“[51].

<b>Testovaný materiál</b>	3 bílá vína
<b>Stanovované látky</b>	19 fenolických sloučenin
<b>Kolona</b>	Nucleosil Tracer 120 C <sub>18</sub> (250 x 4 mm; 5μm)
<b>Detekce</b>	DAD 1050 M detektor
<b>Mobilní fáze</b>	A - 2,7% kyselina octová ve vodě, B - 20% roztok A, 80% acetonitril
<b>Gradientová eluce:</b>	
0. - 5. min.	100% A, 0% B
5. - 10. min.	98% A, 2% B
10. - 15. min.	96% A, 4% B
15 - 26. min.	90% A, 10% B
26. - 26,5. min.	81% A, 19% B
26,6. - 35. min.	79,5% A, 20,5% B
35. - 35,5. min.	70% A, 30% B
35,5. - 40. min.	67% A, 33% B
40 - 45. min.	0% A, 100% B
45. min.	100% A, 0% B

Tabulka č. 5: Podmínky stanovení fenolických sloučenin v příkladu č. 3

#### 4.3.1.4 Příklad stanovení číslo 4 - Browning of Cava (Sparkling Wine) During Aging in Contact with Lees Due to the Phenolic Composition

Studie se zabývala změnami v obsahovém spektru a množství fenolických složení v 6 šumivých vínech označovaných jako „Cava“ a vliv těchto změn na hnědnutí vín. Vzorčky byly odebrány celkem jedenáctkrát během tříletého zrání a změny ve složení byly monitorovány za pomoci HPLC metody [52].

<b>Testovaný materiál</b>	6 šumivých vín
<b>Stanovované látky</b>	14 fenolických sloučenin
<b>Kolona</b>	Nucleosil Tracer 120 C <sub>18</sub> (250 x 4 mm; 5μm)
<b>Detekce</b>	DAD 1050 M detektor
<b>Mobilní fáze</b>	A - 2,7% kyselina octová ve vodě, B - 20% roztok A, 80% acetonitril
<b>Gradientová eluce:</b>	
0. - 5. min.	100% A, 0% B
5. - 10. min.	98% A, 2% B
10. - 15. min.	96% A, 4% B
15 - 26. min.	90% A, 10% B
26. - 26,5. min.	81% A, 19% B
26,6. - 35. min.	79,5% A, 20,5% B
35. - 35,5. min.	70% A, 30% B
35,5. - 40. min.	67% A, 33% B
40 - 45. min.	0% A, 100% B
45. min.	100% A, 0% B

Tabulka č. 6: Podmínky stanovení fenolických sloučenin v příkladu č. 4

#### 4.3.1.5 Příklad stanovení číslo 5 - Phenolic Characterization of Malbec Wines from Mendoza Province (Argentina)

Tato studie jako první charakterizovala spektrum fenolických látek červených vín odrůdy „Malbec“, jejichž hrozny zrály v provincii Mendoza v Argentině. V 61 vzorcích bylo indentifikováno a kvantifikováno více než 40 různých fenolických sloučenin za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a detektoru diodového pole [53].

<b>Testovaný materiál</b>	61 červených vín
<b>Stanovované látky</b>	44 fenolických sloučenin
<b>Kolona</b>	Nova-Pak C <sub>18</sub> (Water Corp., Milford, MA; 150 x 3,9 mm; 4 μm)
<b>Detekce</b>	DAD detektor L-7455 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany)
<b>Mobilní fáze</b>	A - voda:kyselina mravenčí; 90:10, B - acetonitril
<b>Gradientová eluce:</b>	
0. - 23. min.	96-85% A, 4-15% B
23. - 27. min.	85-80% A, 15-20% B
27. - 43. min.	80-70% A, 20-30% B

Tabulka č. 7: Podmínky stanovení fenolických sloučenin v příkladu č. 5

#### 4.3.1.6 Příklad stanovení číslo 6 - Comparative study on the antioxidant properties of Slovakia and Austrian wines

Ve studii bylo analyzováno celkem 86 vzorků vína, 35 bílých a 17 červených vín původem ze Slovenska a 12 bílých a 22 červených z regionu Burgundsko. U všech 86 vzorků byly zjišťovány jejich antioxidační vlastnosti použitím EPR spektroskopie, metody DPPH a ABTS<sup>+</sup> metody, u 16 vybraných vzorků byl stanoven jejich fenolický profil a následně byla porovnána antioxidační aktivita s obsahem fenolických sloučenin [54].

<b>Testovaný materiál</b>	16 bílých a červených vín
<b>Stanovované látky</b>	Kyselina gallová, 3,4-dihydroxybenzoová, kávová, syringová, p-kumarová
<b>Kolona</b>	LiChrospher® 100 RP-18 (Agilent, Germany; 125 mm; 5 μm)
<b>Detekce</b>	detektor s programovatelnou vlnovou délkou
<b>Mobilní fáze</b>	A - směs vody a kyseliny octové pH = 2, B - acetonitril
<b>Gradientová eluce:</b>	
0. - 20. min.	95% A, 5% B
20. - 25. min.	80% A, 20% B
25. - 35. min.	95% A, 5% B

Tabulka č. 8: Podmínky stanovení fenolických sloučenin v příkladu č. 6

#### 4.3.1.7 Příklad stanovení číslo 7 - Authentication of Riesling Wines from the Czech Republic on the Basis of the Non-flavonoid Phenolic Compounds

Ve 43 vzorcích vín z 5 vinohradnických regionů České republiky, Mikulova, Slovácko, Velké Pavlovice, Znojmo, Litoměřice, bylo analyzováno 18 neflavonoidních fenolických sloučenin pomocí HPLC metody. Cílem analýzy vybraných fenolických sloučenin bylo zjištění, zda je možné rozlišit původ vín na základě charakteristiky fenolického spektra [55].

<b>Testovaný materiál</b>	43 vín odrůdy Ryzlink
<b>Stanovované látky</b>	18 fenolických sloučenin
<b>Kolona</b>	Alltech Alltima C18 (150 x 3 mm; 3 $\mu$ m)
<b>Detekce</b>	DAD detektor SPD-M10 Avp
<b>Mobilní fáze</b>	A - 15 mmol/l HClO <sub>4</sub> , B - 15 mmol/l HClO <sub>4</sub> , 10% methanol, 50% acetonitril
<b>Gradientová eluce:</b>	
0. - 20. min.	96% A, 4% B
5. - 10. min.	72% A, 28% B
20. - 30. min.	58% A, 42% B
30. - 38. min.	40% A, 60% B
38. - 40,1. min.	0% A, 100% B
40,1. - 43. min.	96% A, 4% B

Tabulka č. 9: Podmínky stanovení fenolických sloučenin v příkladu č. 7

## 4.4 Validace chromatografické metody

Validace chromatografické metody je postup, jehož cílem je ověřit a prokázat spolehlivost analytické metody, tedy zda jejím použitím získáme relevantní a spolehlivá data. Dále se validace provádí z důvodu zjištění, zda je zvolený postup vyhovující pro daný účel a zda je metodu možné zopakovat se stejnou spolehlivostí. Výsledkem validace je pak potvrzení, že výsledky získané touto metodou budou trvale odpovídat předem zvoleným kritériím, jako je přesnost, správnost, linearita a test způsobilosti [56] [57] [58].

### 4.4.1 Správnost

Pojmem správnost analytické metody se rozumí míra těsnosti shody mezi výstupy měření získané právě validovanou metodou a skutečnou či referenční hodnotou měřené veličiny. Správnost analytické metody je reprezentována výtěžností metody, která se obvykle vyjadřuje jako poměr získané hodnoty množství analytu a hodnoty referenční, výsledek se zapisuje formou zlomku nebo jako procentuální hodnota. Cílem statistického testování správnosti metody pak je zjištění rozdílnosti mezi pravou a získanou hodnotou, a zda tento rozdíl je nebo není statistický významný [56] [58].

### 4.4.2 Přesnost

Pod pojmem přesnosti měření se rozumí blízkost mezi nezávislými hodnotami veličiny zjištěnými opakovanými měřeními stejného nebo podobného homogenního vzorku za předem specifikovaných podmínek. Přesnost měření podle podmínek opakování charakterizuje reprodukovatelnost, mezilehlá preciznost či opakovatelnost, kterou charakterizuje směrodatná odchylka získaná výpočtem z opakovaného měření totožného vzorku, na témže přístroji a provedeno jedním pracovníkem laboratoře za použití stejné metody během krátkého časového období. Výsledkem hodnocení přesnosti analytické metody je zjištění náhodných chyb, výsledek hodnocení se nevztahuje ani nevyjadřuje ke skutečné hodnotě veličiny [56] [58].

#### **4.4.3 Test způsobilosti chromatografického systému**

Test způsobilosti chromatografického systému se provádí za účelem zajištění odpovídající účinnosti a vhodnosti chromatografického systému před jeho samotným použitím, na počátku analýzy, při podezření na změnu či chybu negativně ovlivňující celý systém. Test způsobilosti patří mezi neodmyslitelnou složku validace metody, jehož součástí musí být nejméně dva parametry, jako je například určení symetrie píku pomocí „tailing“ faktoru, rozlišení chromatografických píků nebo provedení systémové opakovatelnosti [58].

#### **4.4.4 Linearita**

Linearita obecně charakterizuje přímkovou korelaci mezi výstupy z detektoru a koncentrací stanovované látky ve vzorku. Míru této lineární závislosti mezi dvěma náhodnými proměnnými reprezentuje korelační koeficient [56] [58].



## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité přístroje a pomůcky

<b>Chromatografická sestava</b>	Shimadzu LC-10
<b>Pumpy</b>	LC-10 AD VP
<b>Degasser</b>	DGU-14 A
<b>Autosampler</b>	SIL-HTA
<b>Termostat kolony</b>	CTO-10 AC VP
<b>Detektor</b>	DAD detektor SPD-M10A VP
<b>Kolona I.</b>	Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm; 5 µm)
<b>Kolona II.</b>	YMC Triart C-18 ExRS (150 x 4,6 mm; 5 µm)
<b>Kolona III.</b>	Ascentis® Express RP-Amide (150 x 4,6 mm; 2,7 µm)
<b>Vyhodnocení</b>	Chromatografický systém LC solution
<b>Dávkování</b>	10 µl
<b>Mobilní fáze</b>	A - Acetonitril; B - 0,1% kyselina fosforečná
<b>Průtok mobilní fáze</b>	1 ml/min
<b>Teplota</b>	30°C
<b>Gradientový režim</b>	Test více různých gradientových podmínek
<b>Ostatní pomůcky</b>	Analytické váhy Sartorius CPA 12 4S
	Pipety (BRAND)
	Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Tabulka č. 9: Chromatografický systém a ostatní pomůcky

### 5.2 Chemikálie a materiál

#### 5.2.1 Chemikálie

Methanol (Sigma-Aldrich)

Acetonitril (Sigma-Aldrich)

Kyselina fosforečná 85% (Sigma-Aldrich)

## 5.2.2 Materiál

### 5.2.2.1 Standardy

Standard	Čistota	Výrobce	Navážky	Detekce
Kyselina protokatechová	97,0%	Sigma-Aldrich	1,25 mg	280 nm
Kyselina fětarová	99,0%	Sigma-Aldrich	1,03 mg	280 nm
Kyselina kávová	98,0%	Sigma-Aldrich	1,17 mg	320 nm
Kyselina p-hydroxybenzoová	99,0%	Sigma-Aldrich	1,01 mg	280 nm
Kyselina syringová	98,0%	Sigma-Aldrich	0,99 mg	280 nm
Kyselina gallová	97,5%	Sigma-Aldrich	1,01 mg	280 nm
Kyselina p-kumarová	98,0%	Sigma-Aldrich	1,09 mg	320 nm
Kyselina ferulová	99,0%	Sigma-Aldrich	1,03 mg	320 nm
Katechin hydrát	98,0%	Sigma-Aldrich	0,98 mg	280 nm
Epikatechin	90,0%	Sigma-Aldrich	1,13 mg	280 nm
Kyselina chlorogenová	95,0%	Sigma-Aldrich	1,03 mg	320 nm
Kyselina kaftarová	95,0%	Dalton Pharma Services	0,97 mg	320 nm
Resveratrol	99,0%	Sigma-Aldrich	1,06 mg	320 nm
Polydatin	99,0%	Sigma-Aldrich	1,01 mg	320 nm
Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová	99,0%	Sigma-Aldrich	1,05 mg	280 nm

Tabulka č. 10: Seznam použitých standardů

### 5.2.2.2 Vzorky archivních Tokajských vín

Vzorky archivních Tokajských vín pochází z vinařství slovenské části Vinohradnické a vinařské oblasti Tokaj, konkrétně vinařství Zlatý Strapec leží ve vesnici Viničky v okrese Trebišov, vinohrady patřící vinařské firmě Ostrožovič spol. s.r.o. se rozkládají spolu s vinohrady společnosti Tokaj & CO na území vesnice Malá Trňa.

Pořadí	Archivní tokajské víno	Vinařství	Ročník
1	Tokajský výběr 5-putnový	Zlatý Strapec	1983
2	Tokajský výběr 3-putnový	Ostrožovič	2003
3	Tokajský výběr 6-putnový	Zlatý Strapec	1972
4	Tokajský výběr 5-putnový	Ostrožovič	2004
5	Tokajský výběr 5-putnový	Ostrožovič	1989
6	Tokajský výběr 6-putnový	Ostrožovič	2002
7	Tokajský výběr 6-putnový		1983
8	Tokajský výběr 6-putnový	Zlatý Strapec	1993
9	Tokajský výběr 4-putnový	Ostrožovič	2004
10	Tokajský výběr 4-putnový	Ostrožovič	2002
11	Tokajský výběr 3-putnový	Ostrožovič	1995
12	Tokajský výběr 4-putnový	Ostrožovič	1999
13	Tokajský výběr 4-putnový	Ostrožovič	2016
14	Furmint-Šupkáč 90 dní		2017
15	Tokajský výběr 6-putnový	Zlatý Strapec	1997
16	Tokajský výběr 5-putnový	Zlatý Strapec	1993
17	Tokajský výběr 3-putnový	Ostrožovič	1999
18	Tokajský výběr 4-putnový	Tokaj&Co	1995
19	Tokajský výběr 6-putnový	Ostrožovič	1993
20	Tokajský výběr 4-putnový	Zlatý Strapec	1993
21	Furmint-Šupkáč 30 dní		2017
22	Tokajský výběr 6-putnový	Ostrožovič	2003
23	Tokajský výběr 3-putnový	Zlatý Strapec	1988
24	Tokajský výběr 5-putnový	Ostrožovič	2003
25	Tokajský výběr 6-putnový	Tokaj&Co	1993

Tabulka č. 11: Seznam analyzovaných Tokajských vín

### 5.2.3 Příprava roztoků

#### 5.2.3.1 Zásobní roztoky standardů

Zásobní roztoky jednotlivých standardů byly připravovány separátně, navážky pro přípravu zásobních roztoků jsou spolu s názvy a čistotou standardů uvedeny v tabulce č. 11 výše. Tyto navážky byly ve vialce rozpuštěny v 1 ml MeOH, všechny tyto zásobní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě 5°C.

### 5.2.3.2 Pracovní roztoky pro kalibraci

Pracovní roztoky pro kalibraci byly připraveny jako směsné roztoky zásobních roztoků všech standardů, rozmezí koncentrací se pohybovalo od 40 mg/l do 0,125 mg/l. Jako první byl připraven pracovní roztok o koncentraci 40 mg/l, do vialky bylo napipetováno 40 µl z každého ze zásobních roztoků standardů (objem těchto standardů tvořil celkem 600 µl) a nakonec bylo do vialky napipetováno 400 µl methanolu. Z tohoto směsného pracovního roztoku o koncentraci 40 mg/l bylo poté odpipetováno 500 µl a doplněno methanolem do objemu 1 ml, a tím byl vytvořen pracovní roztok o koncentraci 20 mg/l. Další pracovní roztoky o koncentraci 10 mg/l, 5 mg/l, 2 mg/l, 1 mg/l, 0,5 mg/l, 0,25 mg/l a 0,125 mg/l byly připraveny odpipetováním odpovídajícího množství pracovního roztoku o vyšší koncentraci a doplněním methanolem do objemu 1 ml.

<b>Koncentrace</b>	<b>Směs standardů</b>	<b>Methanol</b>
40 mg/l	40 µl od každého ze standardu	400 µl
20 mg/l	500 µl ze směsi o koncentraci 40 mg/l	500 µl
10 mg/l	500 µl ze směsi o koncentraci 20 mg/l	500 µl
5 mg/l	500 µl ze směsi o koncentraci 10 mg/l	500 µl
2 mg/l	400 µl ze směsi o koncentraci 5 mg/l	600 µl
1 mg/l	500 µl ze směsi o koncentraci 2 mg/l	500 µl
0,5 mg/l	500 µl ze směsi o koncentraci 1 mg/l	500 µl
0,25 mg/l	500 µl ze směsi o koncentraci 0,5 mg/l	500 µl
0,125 mg/l	500 µl ze směsi o koncentraci 0,25 mg/l	500 µl

Tabulka č. 12: Postup přípravy pracovních roztoků pro kalibraci

### 5.2.3.3 Pracovní roztoky pro stanovení výtěžnosti a opakovatelnosti

Pracovní roztoky určené k zjištění přesnosti a správnosti metody byly připravovány z pracovních roztoků určených pro kalibraci. K zjištění správnosti bylo použito stanovení výtěžnosti za pomoci 8 roztoků, které obsahovaly 100 µl směsného roztoku standardů o koncentraci 40 mg/l a 700 µl Tokajského vína, a 4 srovnávací roztoky vytvořené přidáním 100 µl methanolu k 700 µl Tokajského vína. Přesnost byla určovaná na základě opakovaného měření pracovního roztoku standardů pro kalibraci o koncentraci 5 mg/l.

#### 5.2.3.4 Pracovní roztoky pro identifikaci látek

Každý z pracovních roztoků pro identifikace píků byl připravován jednotlivě a to tak, že do vialky bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku určitého standardu o koncentraci 1  $\mu\text{g/l}$  a poté bylo do téže vialky přidáno 990  $\mu\text{l}$  metanolu. Dále bylo do samostatné vialky číslo 2 nejdříve napipetováno 10  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku určitého standardu a dále pak 990  $\mu\text{l}$  reálného vzorku Tokajského vína. Porovnáním retenčních časů standardů a retenčních časů ploch zvýšených o přídavek standardu v Tokajských vínech byly identifikovány přesné pozice sledovaných látek na chromatogramu vín.

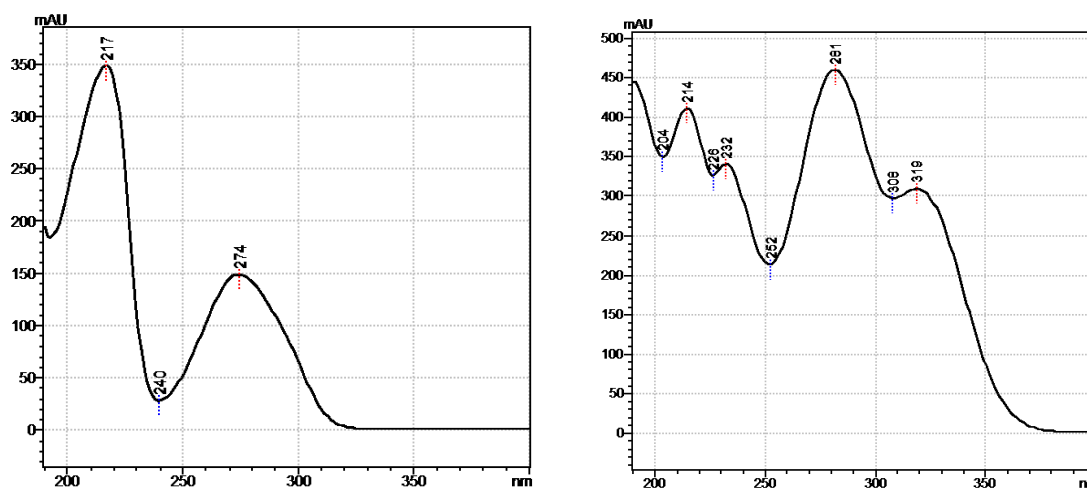
## 6 OPTIMALIZACE METODY

Cílem optimalizace bylo nalezení ideálních chromatografických podmínek, za kterých lze současně optimálně separovat a následně stanovit všechny vybrané fenolické sloučeniny, které se liší jak chemickými, tak fyzikálními vlastnostmi. Optimalizace chromatografické metody pro stanovení vybraných fenolických sloučenin v Tokajském víně se skládala z výběru vlnové délky detektoru, z volby jedné ze tří kolon a nastavení optimální gradientové eluce.

### 6.1 Volba vlnové délky detektoru

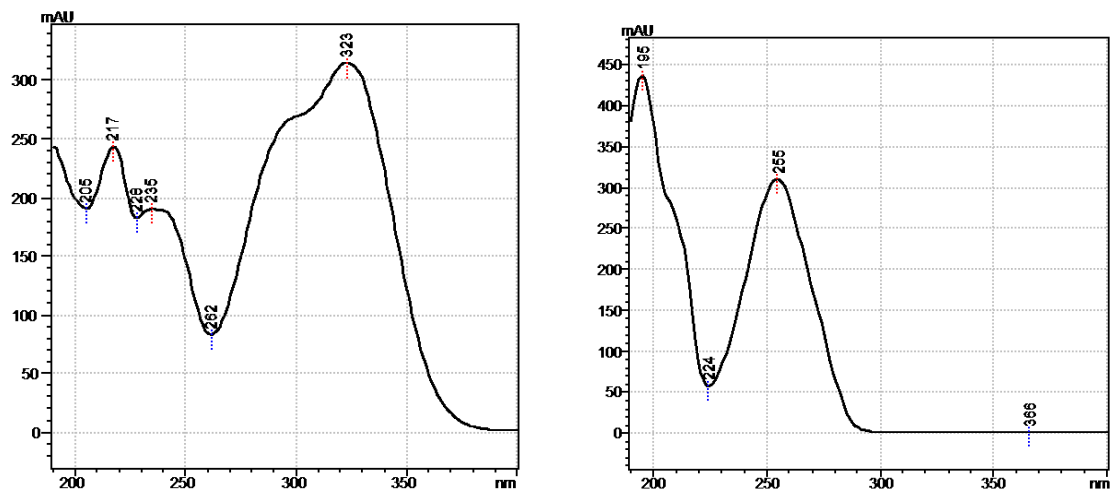
Na základě dostupných studií, které se věnovaly stanovení profilu fenolických sloučenin ve vínech (kapitola 4.1.3.4; 4.3.1.5), a získaných absorpčních spekter byly pro stanovení jednotlivých skupin fenolických sloučenin zvoleny dvě různé vlnové délky, pro identifikaci hydroxybenzoových kyselin a flavan-3olů byla použita vlnová délka 280 nm, pro stanovení většiny skořicových kyselin a vybraných stilbenů byla zvolena vlnová délka 320 nm.

#### 6.1.1 Absorpční spektrum kyseliny syringové a fertarové



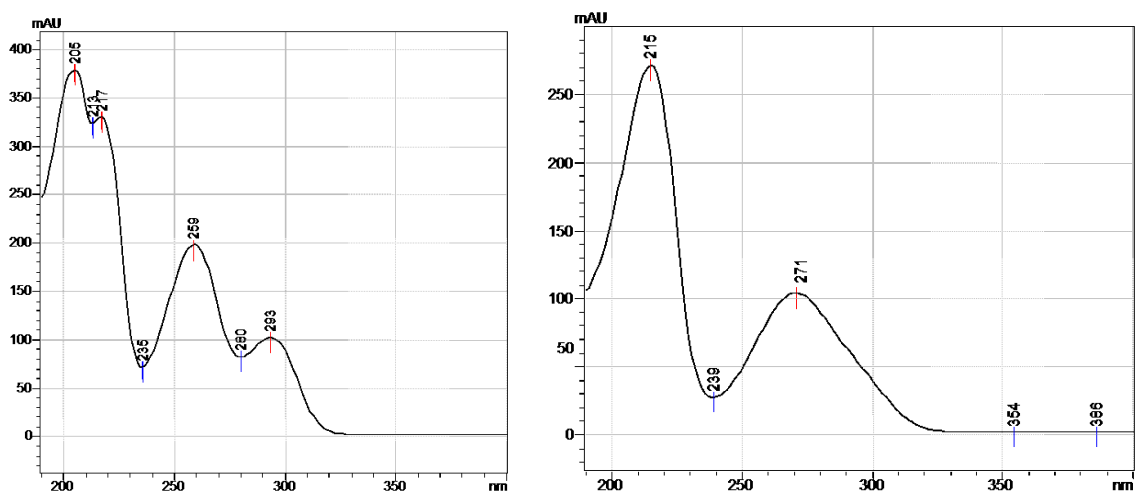
Obrázek č. 1: Absorpční spektrum kyseliny syringové (vlevo) a kyseliny fertarové (vpravo)

## 6.1.2 Absorpční spektrum kyseliny kávové a p-hydroxybenzoové



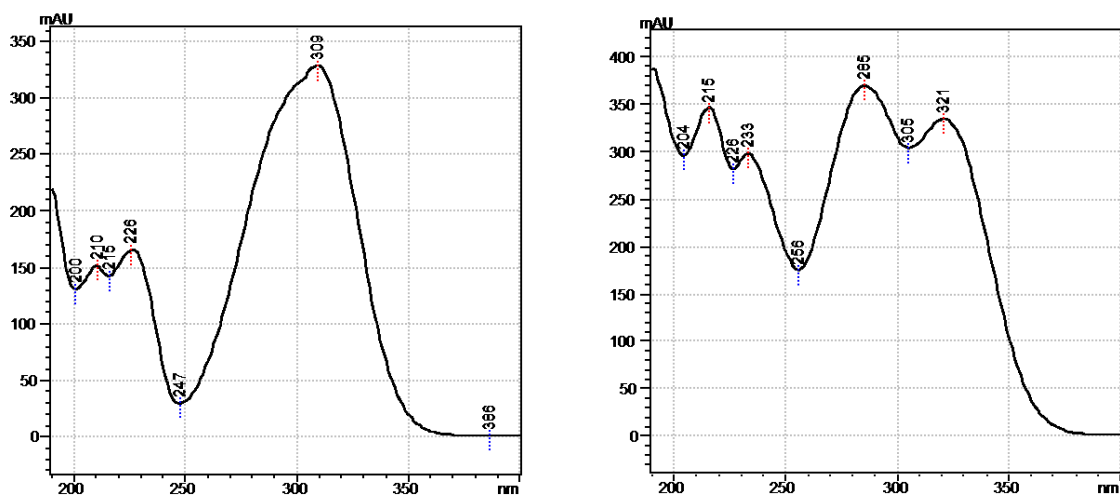
Obrázek č. 2: Absorpční spektrum kyseliny kávové (vlevo) a kyseliny p-hydroxybenzoové (vpravo)

## 6.1.3 Absorpční spektrum kyseliny protokatechové a gallové



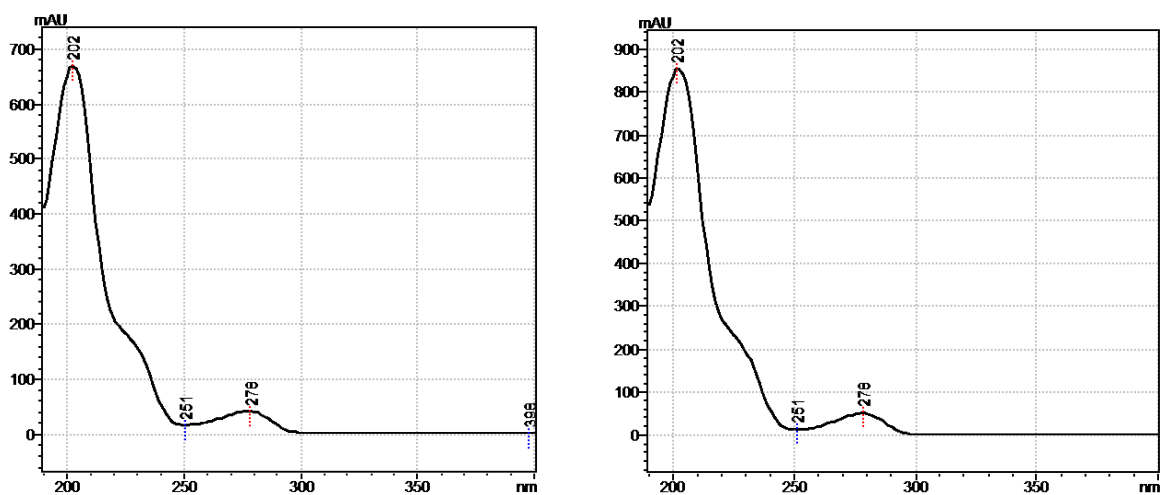
Obrázek č. 3: Absorpční spektrum kyseliny protokatechové (vlevo) a kyseliny gallové (vpravo)

#### 6.1.4 Absorpční spektrum kyseliny p-kumarové a ferulové



Obrázek č. 4: Absorpční spektrum kyseliny p-kumarové (vlevo) a kyseliny ferulové (vpravo)

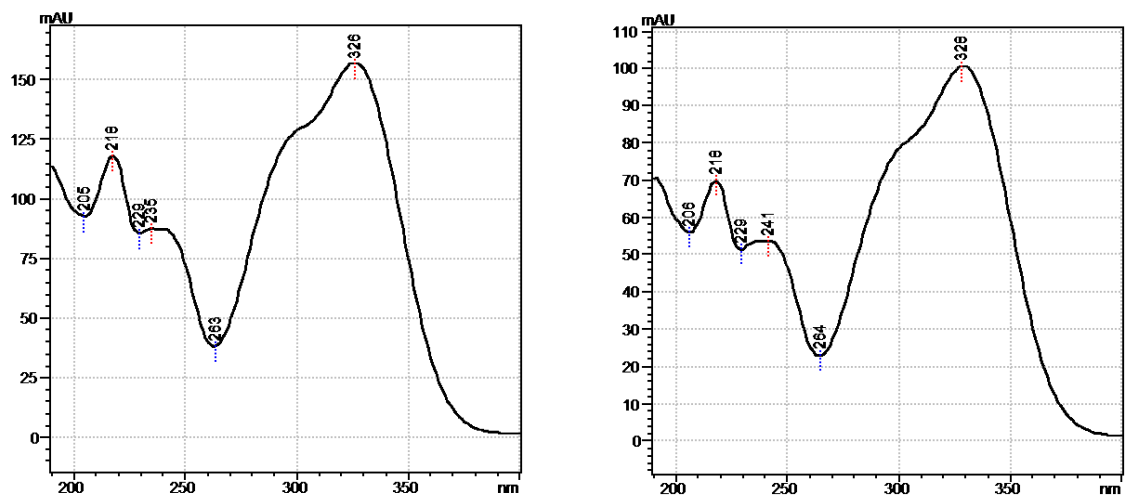
#### 6.1.5 Absorpční spektrum katechin hydrátu a epikatechinu



Obrázek č. 5: Absorpční spektrum katechin hydrátu (vlevo) a epikatechinu (vpravo)

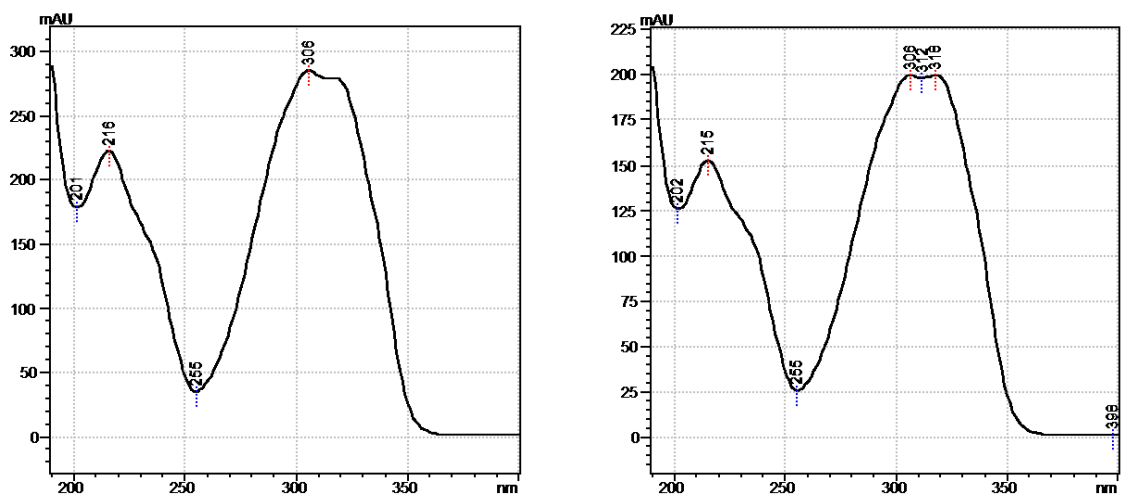


### 6.1.6 Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové a kaftarové



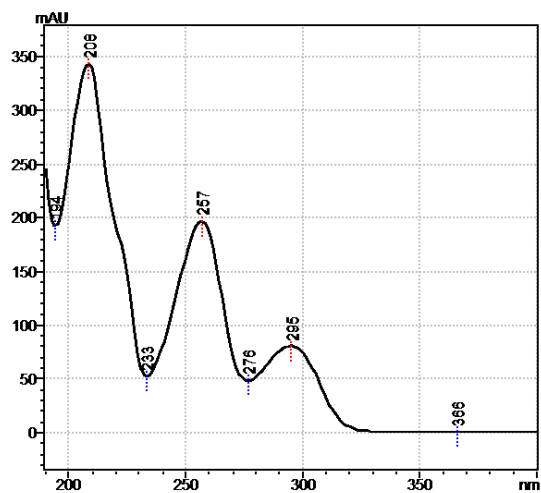
Obrázek č. 6: Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové (vlevo) a kyseliny kaftarové (vpravo)

### 6.1.7 Absorpční spektrum resveratrolu a polydatinu



Obrázek č. 7: Absorpční spektrum resveratrolu (vlevo) a polydatinu (vpravo)

### 6.1.8 Absorpční spektrum kyseliny 2-hydroxy-4-methoxybenzoové



Obrázek č. 8: Absorpční spektrum kyseliny 2-hydroxy-4-methoxybenzoové

## 6.2 Výběr kolony

Pro stanovení fenolických sloučenin se jako chromatografický systém volí systém s reverzními fázemi, přičemž mobilní fáze je směs vodného roztoku s polárním organickým rozpouštědlem a stacionární fáze má nepolární charakter. Pro stanovení fenolických sloučenin se obvykle využívá chemicky modifikovaná fáze s navázanými C-18 řetězci, v našem případě byla vybrána kolona Triart C-18 ExRS (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m). Na podkladě výsledků studií provedených na katedře analytické chemie farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy byla do testovacího výběru kolon zařazena i kolona s pentafluorofenolovou stacionární fází, Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), která dobu stanovení vybraných fenolických sloučenin, antokyanů, značně zkrátila a vykazovala větší účinnost než standardní C-18 kolony. Při optimalizaci metody byla jako třetí kolona testována kolona se stacionární fází obsahující vloženou polární amidovou skupinu zakotvenou na dlouhém alkylovém řetězci, Ascentis Express RP-Amide (150 x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m) [59].

## 6.3 Volba gradientu

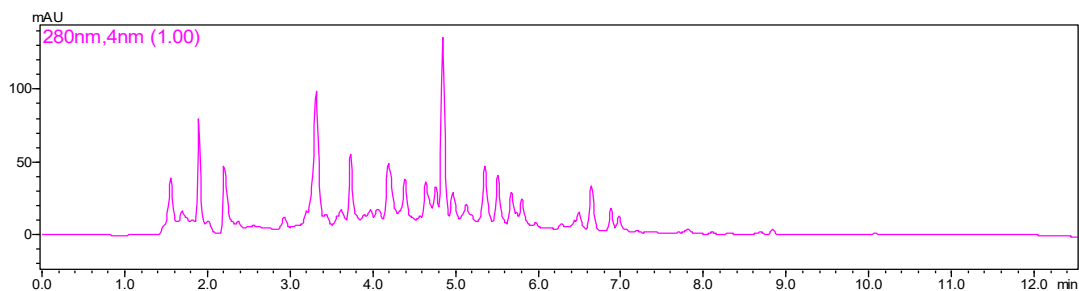
U všech výše zmíněných kolon byl proveden test, při průtoku 1,0 ml/min, celkem 10-ti různých gradientů, které se lišily jak délkou analýzy, tak v zastoupení vodné a organické složky mobilní fáze. Vliv jednotlivých gradientů na separaci vybraných fenolických sloučenin byl zjišťován pomocí reálného vzorku Tokajského vína. Hodnotícím kritériem při volbě gradientu byl především počet separovaných píků, jelikož některé fenolické sloučeniny vykazují podobné fyzikálně-chemické vlastnosti a jejich retenční časy byly téměř shodné, dále bylo cílem dosažení ideální symetrie a šířky píku. Volba gradientů na základě celkového času se pohybovala v rozmezí od 12 až 19,5 minut. Gradienty s celkovým kratším časem však nebyly vhodné z důvodů separace menšího množství látek. Testované gradienty se lišily pouze počátečním složením (množství organické fáze acetonitrilu od 2 do 10 %) a celkovou strmostí lineárního gradientu. Pro identifikaci stanovovaných látek v reálných vzorcích byl zvolen gradient 09 a jako nejvhodnější se jevila kolona Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), k identifikaci z celkového počtu testovaných 40 flavonoidů či fenolických kyselin bylo použito celkem 15 komerčně dostupných standardů, jejichž píky se shodovali s retenčními časy látek ve vínech. Ty byly následně porovnány s 10 reálnými vzorky Tokajských vín.

## 6.4 Reprezentativní výsledky testování optimálního gradientu a různých kolon

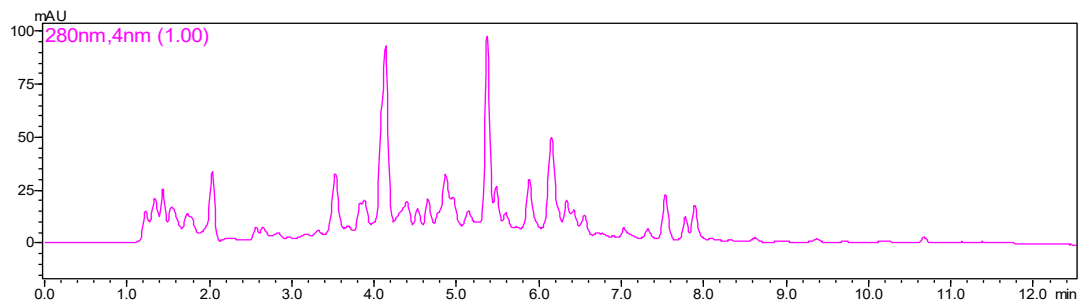
### 6.4.1 Gradient 03

Čas (min)	Mobilní fáze	
	Acetonitril (%)	0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)
0,01	Start analýzy	
0,01	5	95
10,00	50	50
10,20	5	95
12,50	5	95
12,51	Kondicionace	

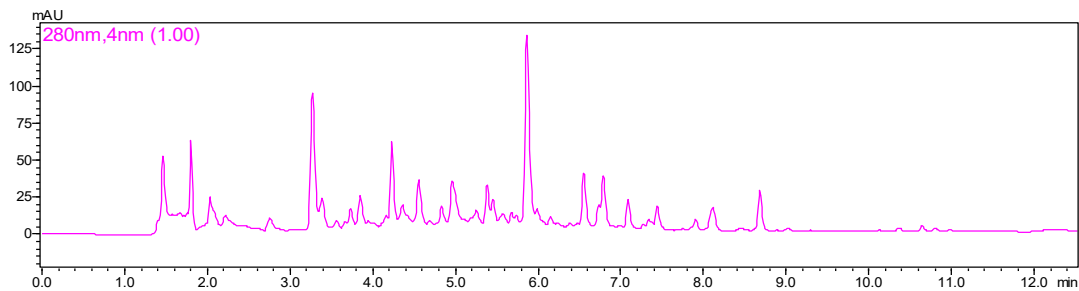
Tabulka č. 13: Podmínky gradientu 03



Obrázek č. 9: Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5 μm)



Obrázek č. 10: YMC Triart C-18 ExRS (150 x 4,6 mm; 5 μm)

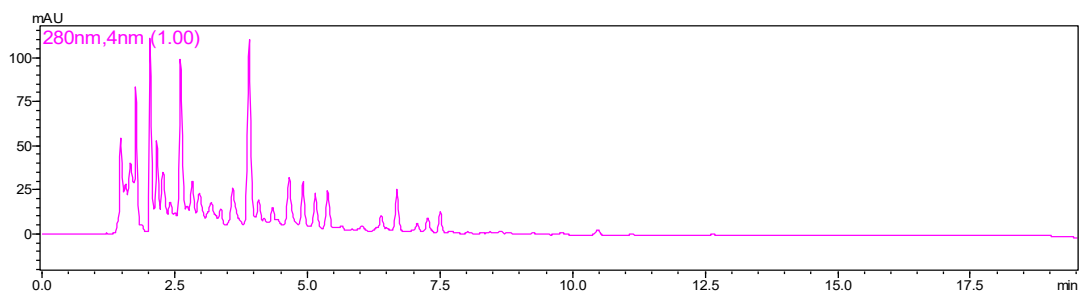


Obrázek č. 11: Ascentis Express RP-Amide (150 x 4,6 mm; 2,7 μm)

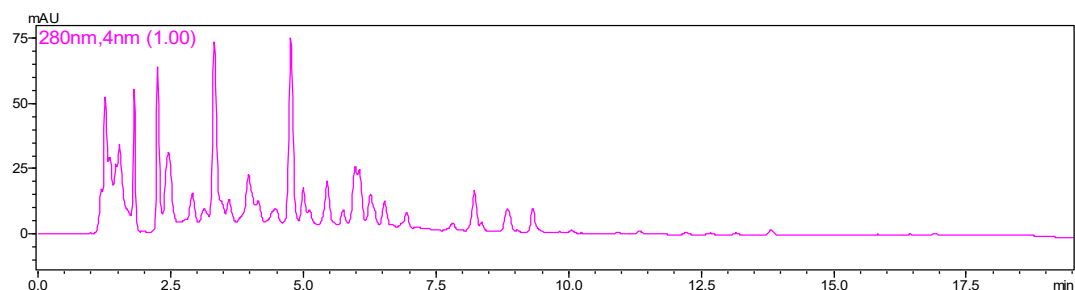
## 6.4.2 Gradient 05

			Mobilní fáze	
Čas (min)	Acetonitril (%)		0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	
0,01	Start analýzy			
0,01	10		90	
17,00	50		50	
17,20	10		90	
19,50	10		90	
19,51	Kondicionace			

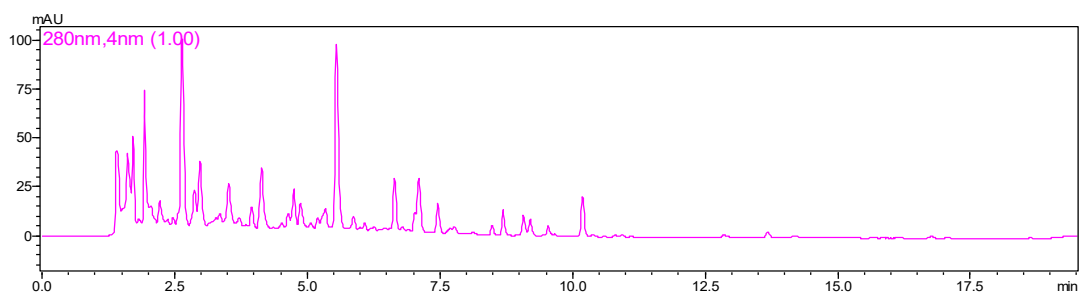
Tabulka č. 14: Podmínky gradientu 05



Obrázek č. 12: Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5 μm)



Obrázek č. 13: YMC Triart C-18 ExRS (150 x 4,6 mm; 5 μm)

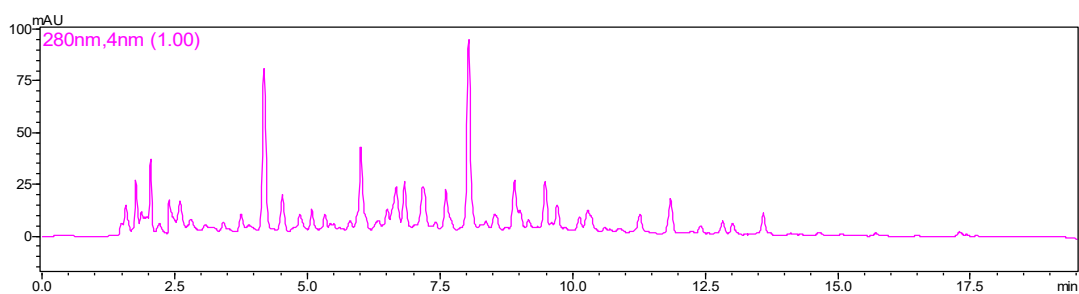


Obrázek č. 14: Ascentis Express RP-Amide (150 x 4,6 mm; 2,7 μm)

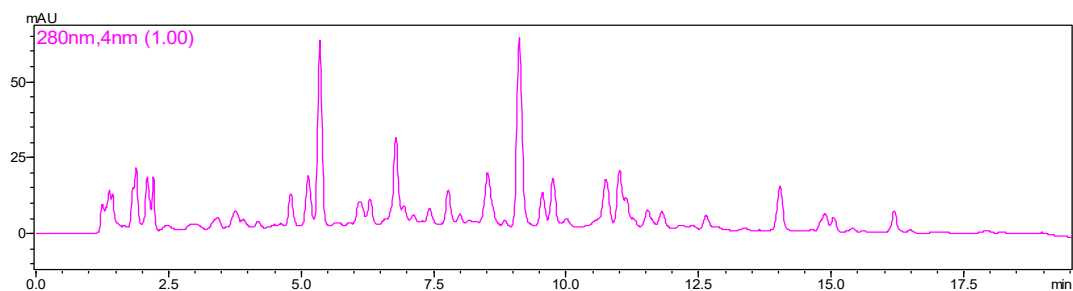
### 6.4.3 Gradient 09

	Mobilní fáze	
Čas (min)	Acetonitril (%)	0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)
0,01	Start analýzy	
0,01	2	98
17,00	30	70
17,20	2	98
19,50	2	98
19,51	Kondicionace	

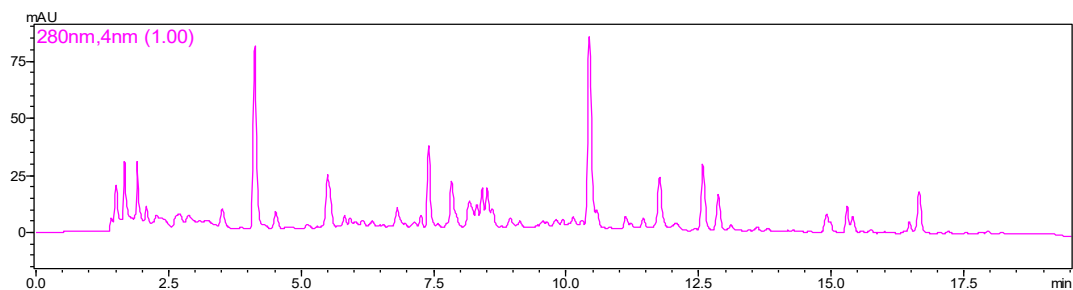
Tabulka č. 15: Podmínky gradientu 09



Obrázek č.15: Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5 μm)



Obrázek č. 16: YMC Triart C-18 ExRS 150 x 4,6 mm; 5 μm)



Obrázek č. 17: Ascentis Express RP-Amide (150 x 4,6 mm; 2,7 μm)

## 6.4.4 Hodnocení vybraných gradientů a kolon

### 6.4.4.1 Gradient 03

Gradient číslo 03 byl jedním ze dvou gradientů s nejkratší dobou analýzy, 12,51 minut. Tak krátká doba analýzy se neukázala jako vhodná pro stanovení, jelikož se ve vzorcích Tokajských vín vyskytuje velké množství dalších jiných látek, které při tomto čase a složení mobilní fáze, u všech tří testovaných kolon, nebyly dostatečně odseparovány.

### 6.4.4.2 Gradient 05

Gradient číslo 05, jehož doba analýzy byla výrazně delší než gradient 03, 19,51 minut, se pro tento případ nejevil jako vhodný. Přestože doba separace látek byla delší, ke zlepšení v rozlišení jednotlivých píků nedošlo.

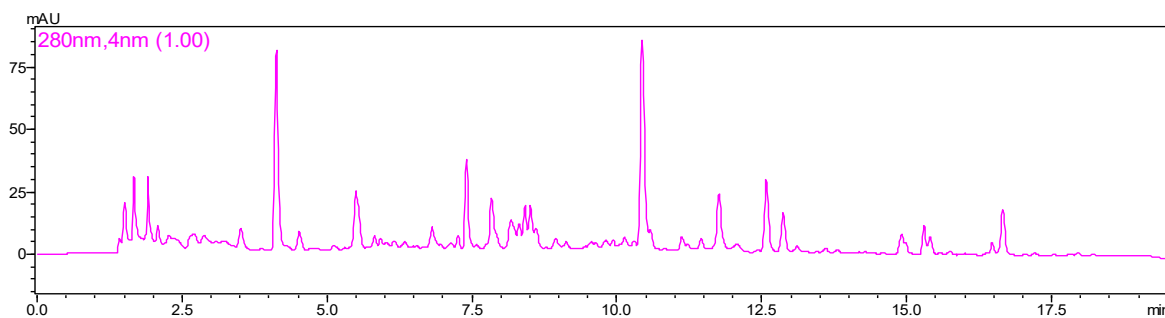
### 6.4.4.3 Gradient 09

Gradient číslo 09, s dobou analýzy totožnou jako u gradientu číslo 05, se prokázal jako nejvhodnější pro stanovení námi vybraných fenolických sloučenin. Díky odlišnému složení počáteční mobilní fáze, kdy byl použit pouze 2 % acetonitril se separace látek oproti gradientu číslo 5 prodloužila a rozlišení jednotlivých píků se značně vylepšilo. Jako optimální se při tomto gradientu jevila kolona Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), která byla zvolena pro analýzu vzorků Tokajských vín. Další testované podmínky ostatních gradientů nevedly k lepším výsledkům a vzhledem k omezenému rozsahu diplomové práce nejsou dále uváděny ani komentovány.

## 6.5 Optimální podmínky stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC

<b>Chromatografická sestava</b>	Shimadzu LC-10		
<b>Kolona</b>	Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm; 5 µm)		
<b>Detektor</b>	DAD detektor SPD-M10A VP		
<b>Detekce</b>	280 a 320 nm		
<b>Dávkování</b>	10 µl		
<b>Mobilní fáze</b>	A - Acetonitril; B - 0,1% kyselina fosforečná		
<b>Průtok mobilní fáze</b>	1 ml/min		
<b>Teplota</b>	30°C		
<b>Gradientová eluce</b>		Mobilní fáze	
	Čas (min)	Acetonitril (%)	0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)
	0,01	Start analýzy	
	0,01	2	98
	17,00	30	70
	17,20	2	98
	19,50	2	98
	19,51	Kondicionace	

Tabulka č. 16: Optimální chromatografické podmínky



Obrázek č. 18: Chromatogram finálních podmínek na koloně Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5 µm) při gradientu 09



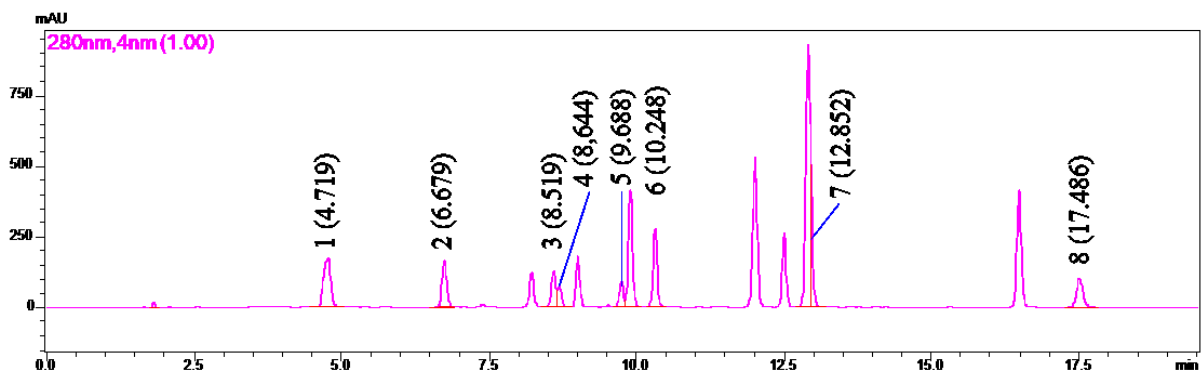
## 7 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY

### 7.1 Test vhodnosti chromatografického systému

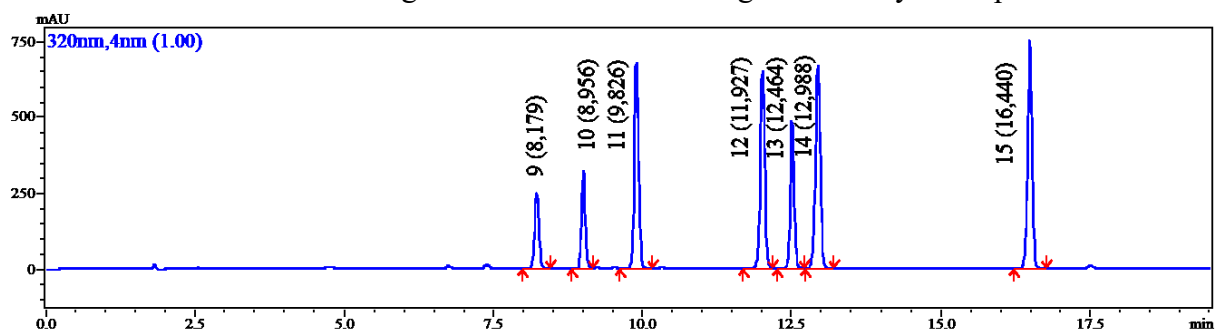
Hodnotícím kritériem testu vhodnosti chromatografického systému je stanovení kapacitního faktoru ( $k$ ), faktoru symetrie chromatografického píku ( $A_s$ ), retenčního času a rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ ). Při testu vhodnosti chromatografického systému byly využity již vytvořené pracovní roztoky pro kalibraci o koncentraci 40 mg/l, které byly připraveny dle postupu v kapitole 5.2.3.2. Rozlišení chromatografických píků odpovídalo hodnotám nad doporučený limit, větší než hodnota 1,5, s výjimkou kyseliny 4-hydroxybenzoové, katechin hydrátu a 2-hydroxy-4-methoxybenzoové. Faktor symetrie chromatografických píků se pohybuje v rozmezí od 0,914 až po 1,209, .

Pořadí	Fenolické sloučeniny	$t_r$ (min)	$R_s$	$A_s$	$k$
1	Kyselina gallová	4,719	19,216	0,914	1,637
2	Kyselina protokatechová	6,679	9,911	1,096	2,727
3	Kyselina 4-hydroxybenzoová	8,519	-	-	-
4	Katechin hydrát	8,644	0,501	-	3,807
5	Epikatechin	9,688	5,929	-	4,387
6	Kyselina syringová	10,248	2,847	1,080	4,704
7	Kyselina m-kumarová	12,852	16,229	-	6,141
8	Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová	17,486	-	1,209	8,684
9	Kyselina kaftarová	8,179	56,505	1,103	3,545
10	Kyselina chlorogenová	8,956	5,425	1,172	3,979
11	Kyselina kávová	9,826	6,302	1,104	4,471
12	Kyselina p-kumarová	11,927	14,032	1,048	5,641
13	Polydatin	12,464	3,740	1,137	5,916
14	Kyselina ferulová	12,988	2,768	0,989	6,156
15	Resveratrol	16,440	21,176	1,059	8,121

Tabulka č. 17: Výsledky testu chromatografického systému ( $t_r$  – retenční čas,  $R_s$  – rozlišení chromatografického píku,  $A_s$  – faktor symetrie chromatografického píku,  $k$  – kapacitní faktor)



Obrázek č. 19: Chromatogram hodnocení chromatografického systému při 280 nm



Obrázek č. 20: Chromatogram hodnocení chromatografického systému při 320 nm

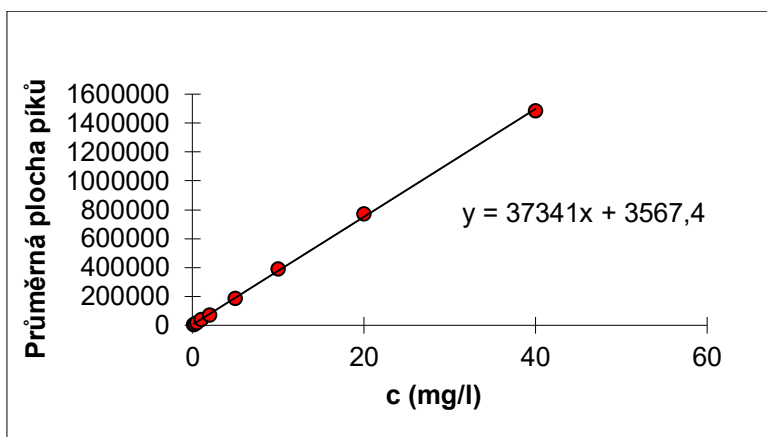
## 7.2 Linearita

Při hodnocení linearity chromatografické metody bylo pro kalibraci vytvořeno 9 pracovních kalibračních roztoků, o koncentracích pohybujících se v rozmezí od hodnoty 0,125 mg/l až po hodnotu 40 mg/l. Pracovní roztoky určené pro vytvoření kalibrační křivky byly připraveny dle popisu v kapitole 5.2.3.2. Z každého kalibračního roztoku byly provedeny tři samostatné stanovení, přičemž ze tří získaných ploch pod píkem byl pro každou koncentraci vypočítán průměr, který byl zanesen do grafu. Závislost průměrných ploch píků jednotlivých kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyjádřena metodou lineární regrese.

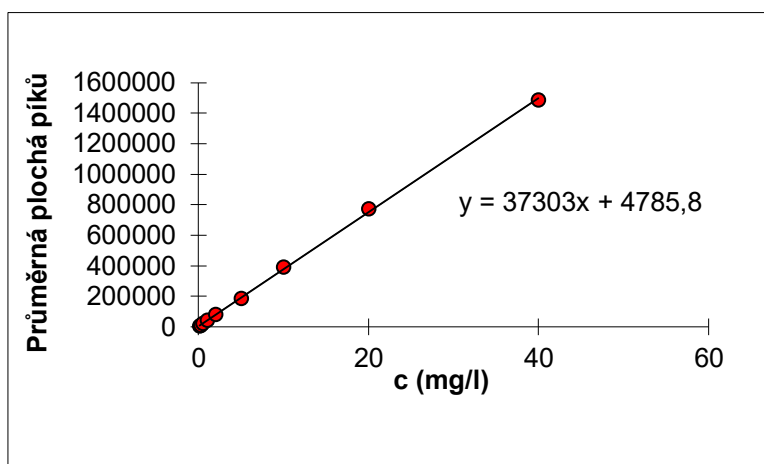
	Průměrná plocha pod píkem pro jednotlivé koncentrace											Korelační koef.					
	0,125 mg/l	0,25 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	40 mg/l								
Fenolické sloučeniny																	
Kyselina gallová	5574	10299	19253	40502	78363	185527	390500	770536	1484786								0,999805
Kyselina protokatechová	3060	6329	11983	25103	48630	114673	240629	474860	910949								0,999805
Kyselina 4-hydroxybenzoová	2386	4820	9624	19533	36131	86789	182075	363272	-								0,999919
Katechin hydrát	824	1670	4005	8446	17732	42105	86353	163631	322169								0,999834
Epikatechin	672	2315	4815	10318	20404	48758	102414	199968	385738								0,999778
Kyselina syringová	5011	9779	18142	36615	70183	166094	345984	681653	1318238								0,999844
Kyselina m-kumarová	19216	37716	74688	147611	285760	674853	1375364	2679384	5044772								0,999495
Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová	1561	4779	10449	21804	41111	98814	197039	385506	736361,67								0,999692
Kyselina kaftarová	7767	9160	16003	36329	65443	153360	328638	657535	1278314								0,999875
Kyselina chlorogenová	3256	8207	17842	37036	72130	173097	369656	739359	1446698								0,999915
Kyselina kávová	10332	22066	42559	89372	172919	412706	872589	1737204	3343314								0,999801
Kyselina p-kumarová	11469	23072	44896	92216	177700	421241	885044	1751437	3392644,7								0,999856
Polydatin	6826	14760	28840	60658	117040	275895	580606	1146345	2208977								0,999805
Kyselina ferulová	12634	24734	49075	103733	201576	479330	1014117	2023667	3906907								0,999831
Resveratrol	11886	25542	49603	104075	202601	483623	1024881	2036149	3947137								0,999859

Tabulka č. 18: Výsledky hodnocení linearity

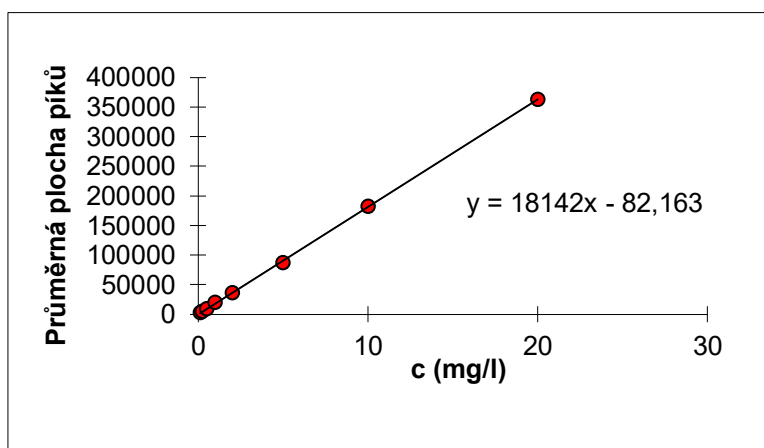
## 7.2.1 Kalibrační křivky vybraných fenolických sloučenin



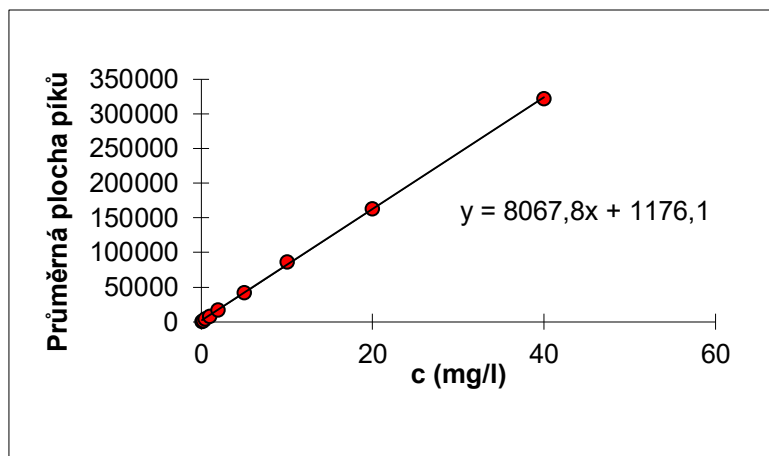
Graf č. 1: Kalibrační závislost pro kyselinu gallovou



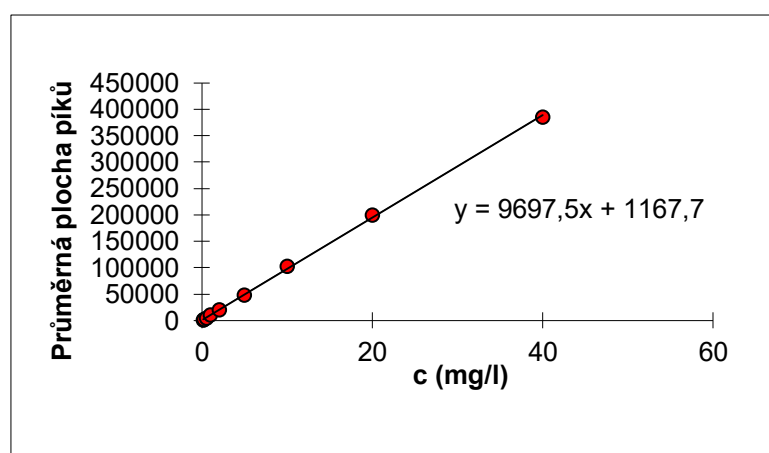
Graf č. 2: Kalibrační závislost pro kyselinu protokatechovou



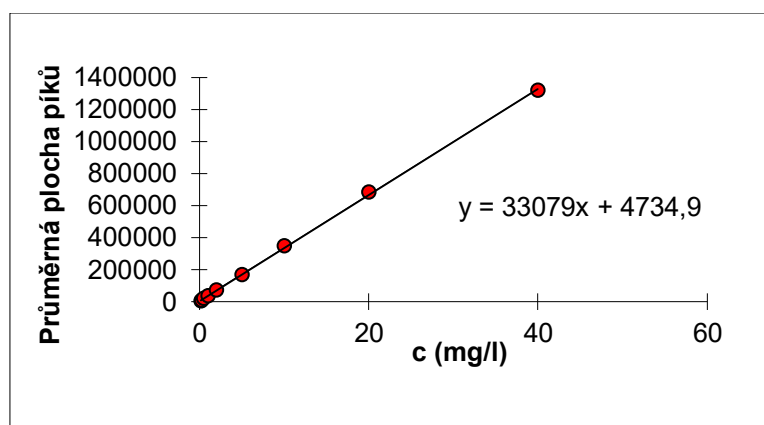
Graf č. 3: Kalibrační závislost pro kyselinu 4-hydroxybenzoovou



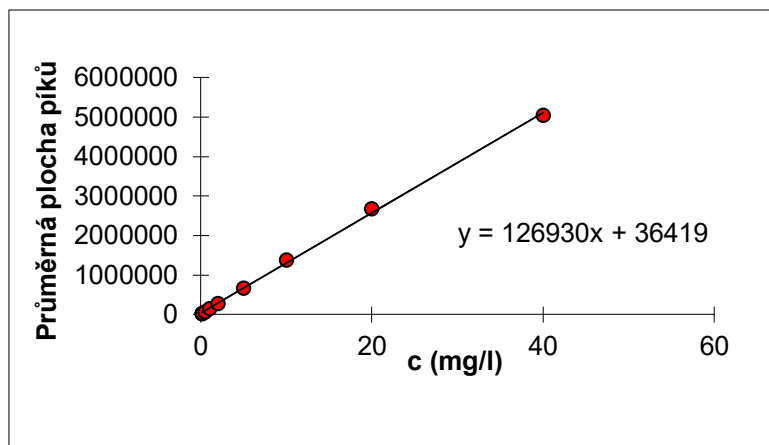
Graf č. 4: Kalibrační závislost pro katechin hydrát



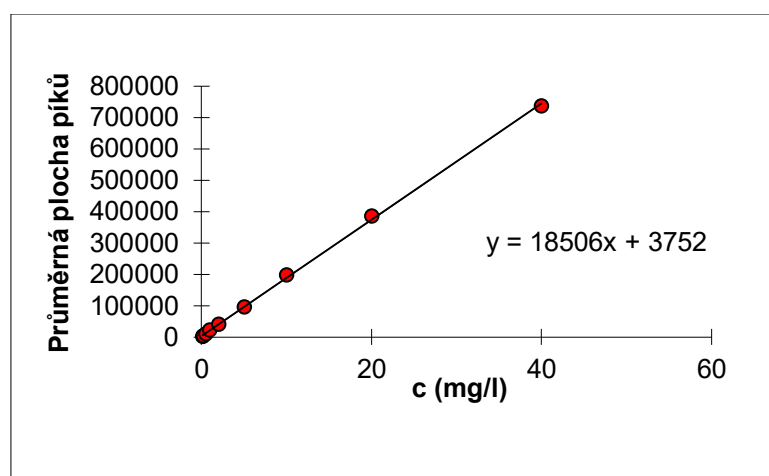
Graf č. 5: Kalibrační závislost pro epikatechin



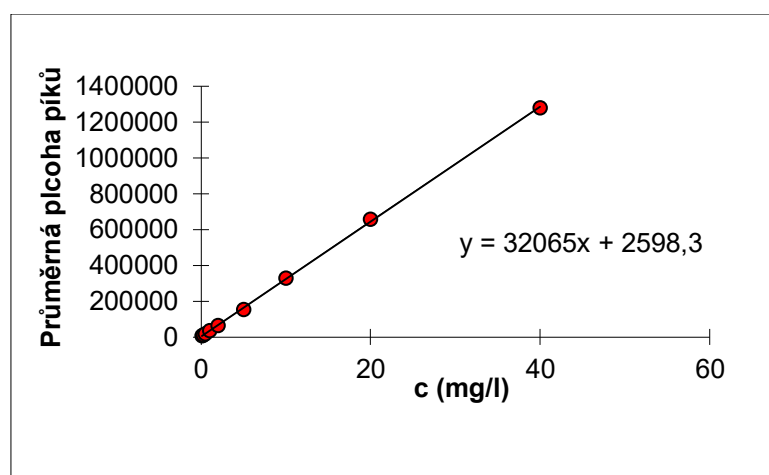
Graf č. 6: Kalibrační závislost pro kyselinu syringovou



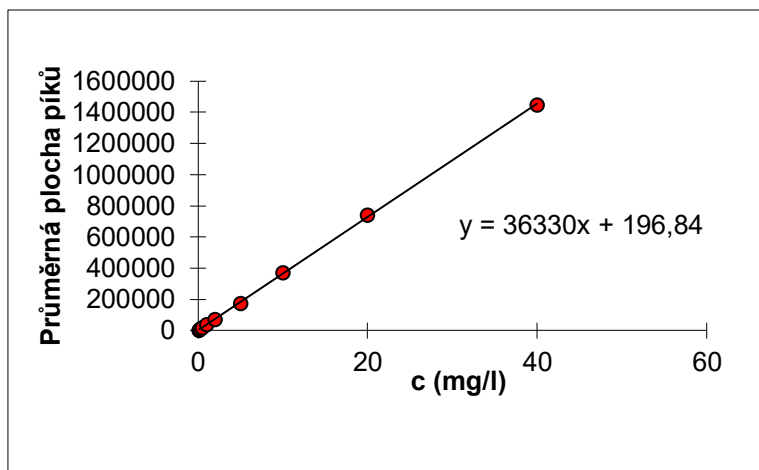
Graf č. 7: Kalibrační závislost pro kyselinu m-kumarovou



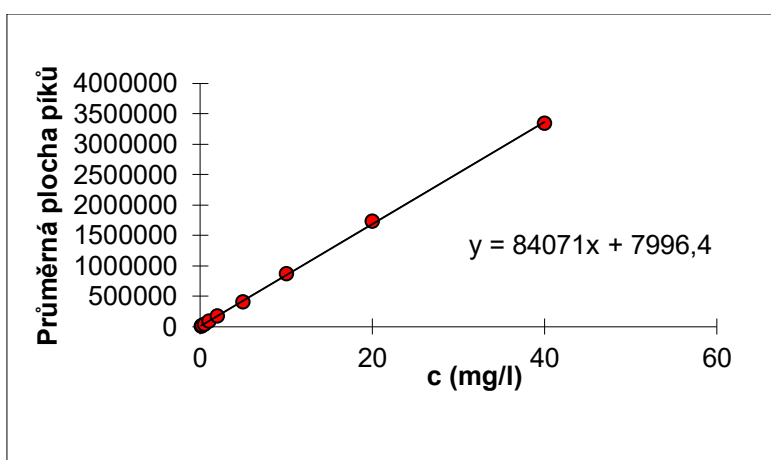
Graf č. 8: Kalibrační závislost pro kyselinu 2-hydroxy-4-methoxybenzoovou



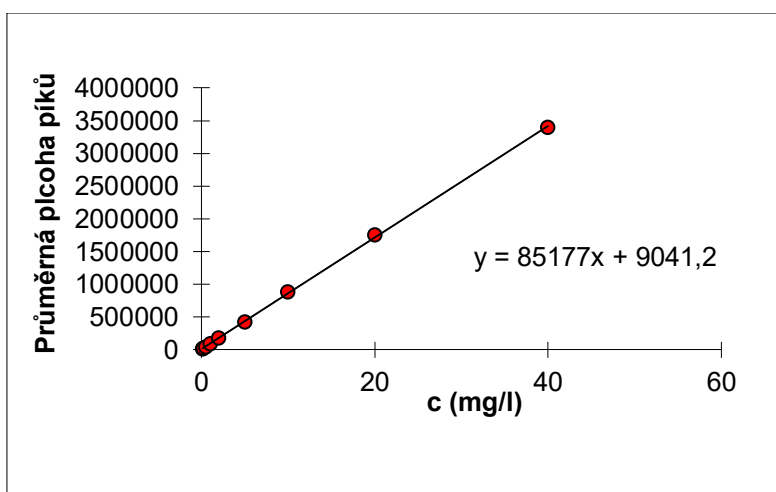
Graf č. 9: Kalibrační závislost pro kyselinu kaftarovou



Graf č. 10: Kalibrační závislost pro kyselinu chlorogenovou

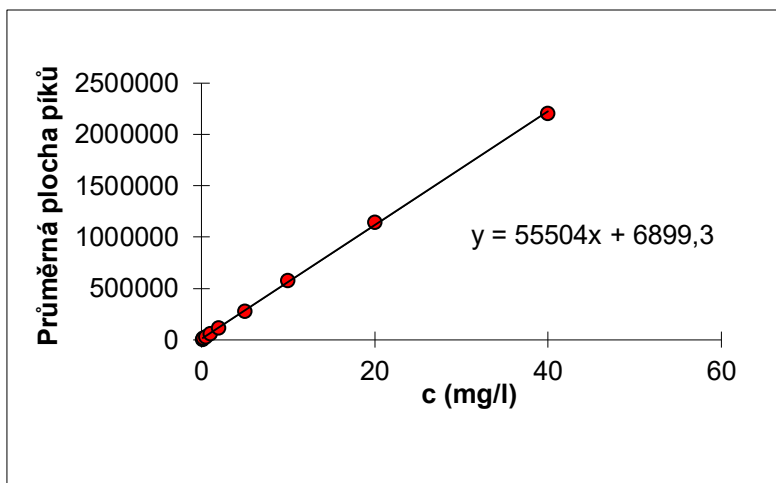


Graf č. 11: Kalibrační závislost pro kyselinu kávovou

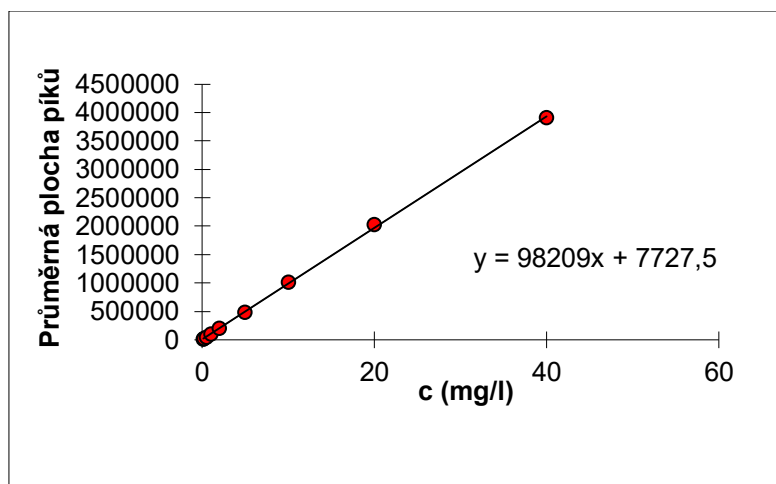


Graf č. 12: Kalibrační závislost pro kyselinu p-kumarovou

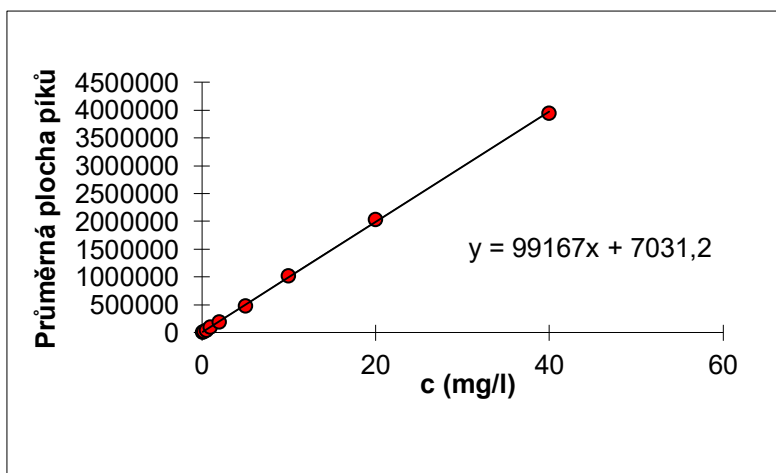




Graf č. 13: Kalibrační závislost pro polydatin



Graf č. 14: Kalibrační závislost pro kyselinu ferulovou



Graf č. 15: Kalibrační závislost pro resveratrol

## 7.3 Správnost a přesnost

### 7.3.1 Opakovatelnost

Při stanovení opakovatelnosti byl využit pracovní roztok pro kalibraci o koncentraci 5 mg/l, který byl připraven dle podrobného popisu v kapitole 5.2.3.2. Opakovatelnost byla stanovena na základě opakovaného měření pracovního roztoku o koncentraci 5 mg/l, celkem bylo provedeno z pracovního roztoku o koncentraci 5 mg/l šest nástriků na kolonu. Z naměřených ploch byla stanovena průměrná hodnota, dále byla spočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. U kyseliny 4-hydroxybenzoové a katechin hydrátu došlo ke koeluci, která znemožnila přesnou a opakovatelnou integraci ploch obou píků samostatně.

Fenolické sloučeniny	Průměr ploch píků	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka (%)
Kyselina gallová	186645	1757	0,94
Kyselina protokatechová	115128	524	0,46
Kyselina 4-hydroxybenzoová	-	-	-
Katechin hydrát	-	-	-
Epikatechin	49389	1204	2,44
Kyselina syringová	166915	1128	0,68
Kyselina m-kumarová	649718	6457	0,99
Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová	95785	896	0,94
Kyselina kaftarová	154610	1105	0,71
Kyselina chlorogenová	172623	2303	1,33
Kyselina kávová	413973	3351	0,81
Kyselina p-kumarová	423421	3288	0,78
Polydatin	278491	2807	1,01
Kyselina ferulová	482504	3465	0,72
Resveratrol	485702	4467	0,92

Tabulka č. 19: Výsledky stanovení opakovatelnosti

### 7.3.2 Výtěžnost

Pro stanovení výtěžnosti byla využita metoda standardního přídatku. Výtěžnost byla stanovena na základě hodnot získaných měření roztoků připravených dle postupu, který je uveden v kapitole 5.2.3.3. Z každého z celkem 12 roztoků, 8 roztoků obsahujících směs standardů a vzorku a 4 směsné roztoky vzorku Tokajského vína a mobilní fáze, byly provedeny vždy tři analýzy, z jejichž výsledné plochy píků byla stanovena průměrná hodnota. Dále byly stanoveny plochy píků jednotlivých standardů, byly provedeny vždy 3 nástřiky roztoku standardů o koncentraci 5 mg/l, který byl připraven dle postupu v kapitole 5.2.3.2. Výsledné plochy píků jednotlivých standardů byly poté zprůměrovány. Výpočet výtěžnosti byl proveden dle následujícího vzorce, výsledky jsou uvedeny v procentech, přičemž  $A_{VZ+ST}$  je průměrná plocha píků roztoků vzorku Tokajského vína s přídatkem standardu,  $A_{VZ}$  je průměrná plocha píků roztoků obsahujících pouze Tokajské víno a  $A_{ST}$  je průměrná plocha píků směsného roztoku standardů.

$$\text{Výtěžnost (\%)} = \frac{A_{VZ+ST} - A_{VZ}}{A_{ST}} * 100$$

Fenolické sloučeniny	Průměr hodnot výtěžnosti (%)	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka (%)
Kyselina gallová	96,67	1,82	1,89
Kyselina protokatechová	110,39	18,24	16,53
Kyselina 4-hydroxybenzoová	-	-	-
Katechin hydrát	-	-	-
Epikatechin	70,35	13,46	19,13
Kyselina syringová	77,13	2,45	3,17
Kyselina m-kumarová	99,48	1,45	1,45
Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová	92,56	1,56	1,69
Kyselina kaftarová	106,46	1,61	1,51
Kyselina chlorogenová	-	-	-
Kyselina kávová	103,30	1,38	1,33
Kyselina p-kumarová	102,40	2,11	2,06
Polydatin	100,82	1,87	1,86
Kyselina ferulová	98,43	7,28	7,40
Resveratrol	102,21	1,92	1,88

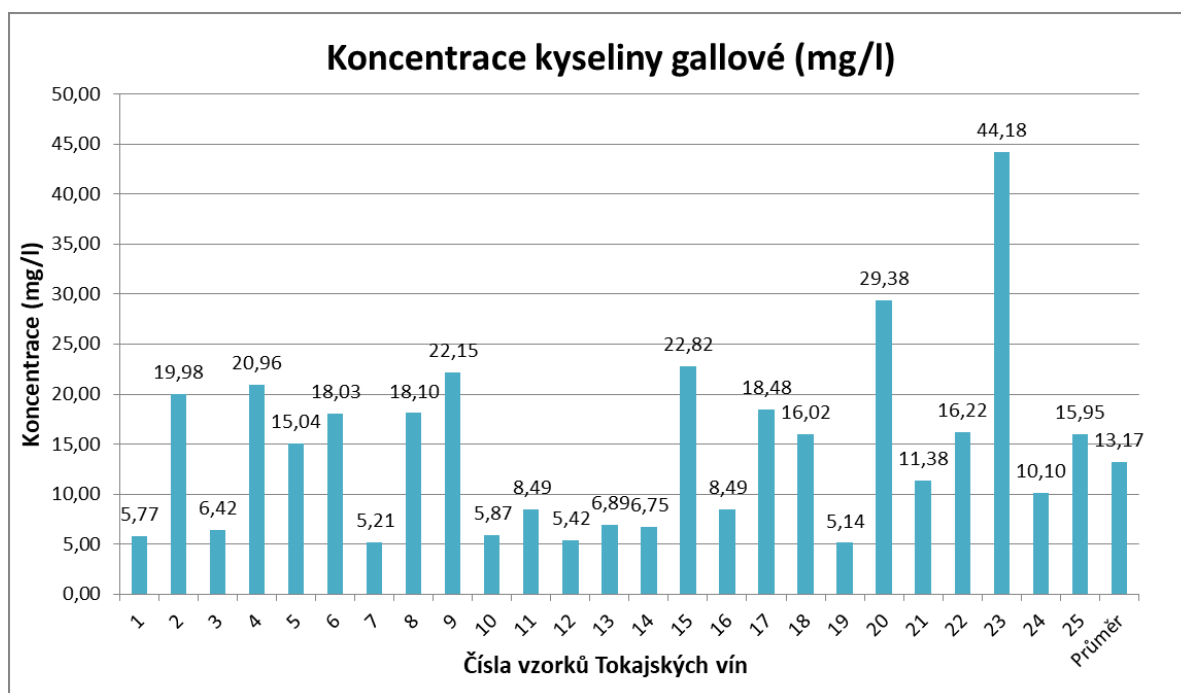
Tabulka č. 20: Výsledky stanovení výtěžnosti

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Po vývoji a úspěšné validaci byla vyvinutá chromatografická metoda použita pro stanovení jednotlivých fenolických sloučenin ve vzorcích archivních Tokajských vín, jejichž podrobný seznam je uveden v kapitole 5.2.2.2. Celkem bylo analyzováno 25 vzorků, ze kterých bylo odebráno množství 1,5 ml a napipetováno do vialky, z každého vzorku byly provedeny dva nástřiky na kolonu. Z výsledných ploch píků byla stanovena průměrná hodnota, která byla nakonec přepočítána podle kalibrační závislosti na hodnotu koncentrace vybraných fenolických látek v jednotlivých Tokajských vínech.

### 8.1 Kyselina gallová

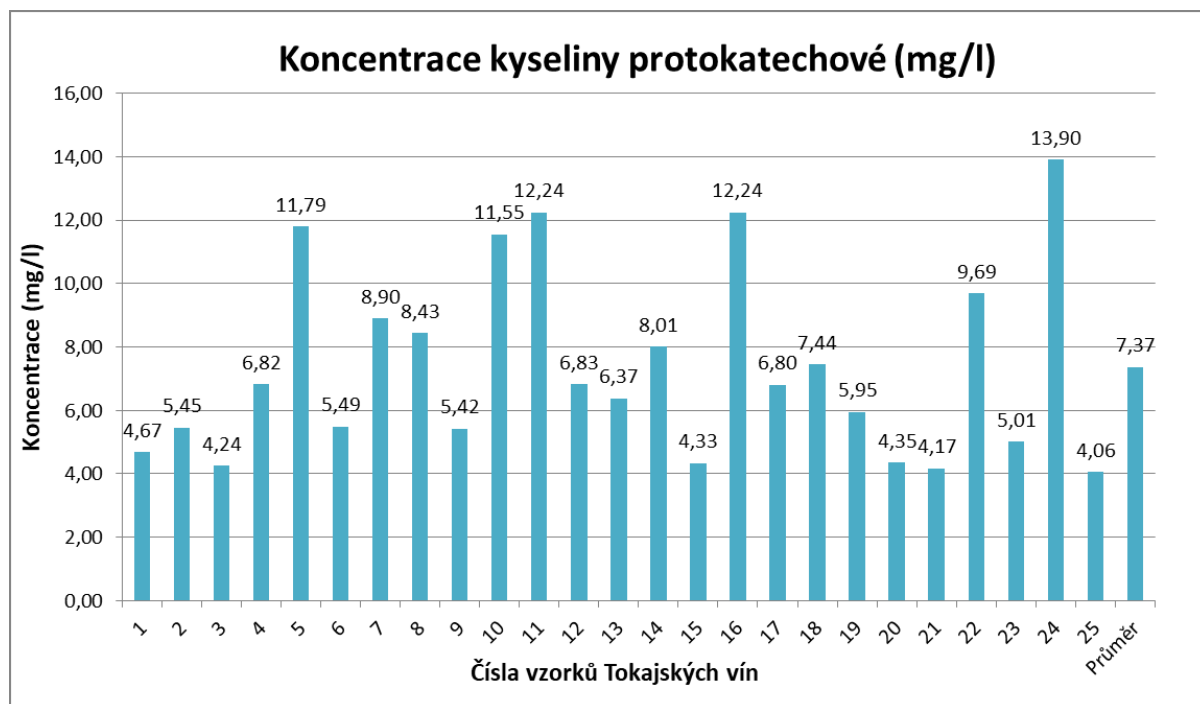
Z grafu lze vyčíst, že kyselina gallová je přítomná ve všech analyzovaných vzorcích Tokajského vína. Nejvyšší koncentrace kyseliny gallové (44,18 mg/l) se vyskytuje ve vzorku číslo 23 (Tokajský výběr 3-putnový z roku 1988 z vinařství Zlatý Strapec). Průměrná koncentrace kyseliny gallové ve vzorcích byla 13,17 mg/l.



Graf č. 16: Výsledky analýzy kyseliny gallové ve vzorcích Tokajských vín

## 8.2 Kyselina protokatechová

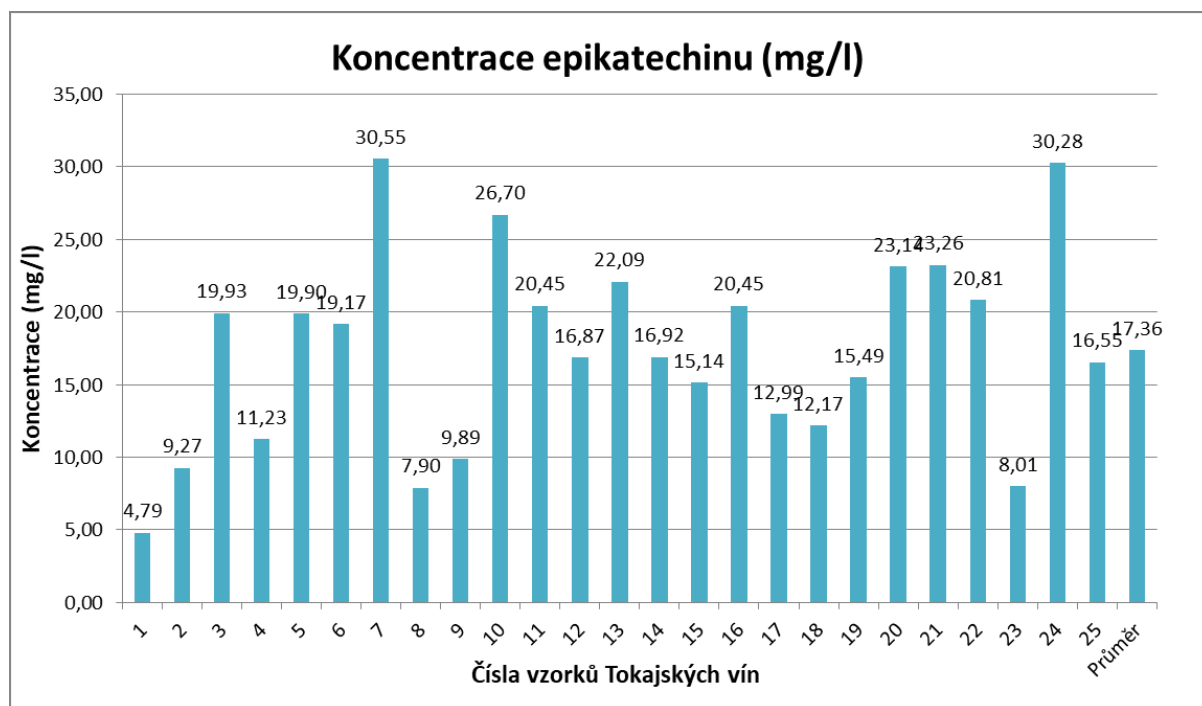
Z grafu vyplývá, že kyselina protokatechová se nachází ve všech analyzovaných vzorcích Tokajského vína. Nejvyšší množství kyseliny protokatechové (13,90 mg/l) se vyskytuje ve vzorku číslo 24 (Tokajský výběr 5-putnový z roku 2003 z vinařství Ostrožovič). Ve všech vzorcích byla koncentrace relativně srovnatelná, pohybovala se v rozmezí od 4,06 mg/l až do koncentrace 13,90 mg/l, s průměrnou hodnotou 7,37 mg/l.



Graf č. 17: Výsledky analýzy kyseliny protokatechové vzorcích Tokajských vín

### 8.3 Epikatechin

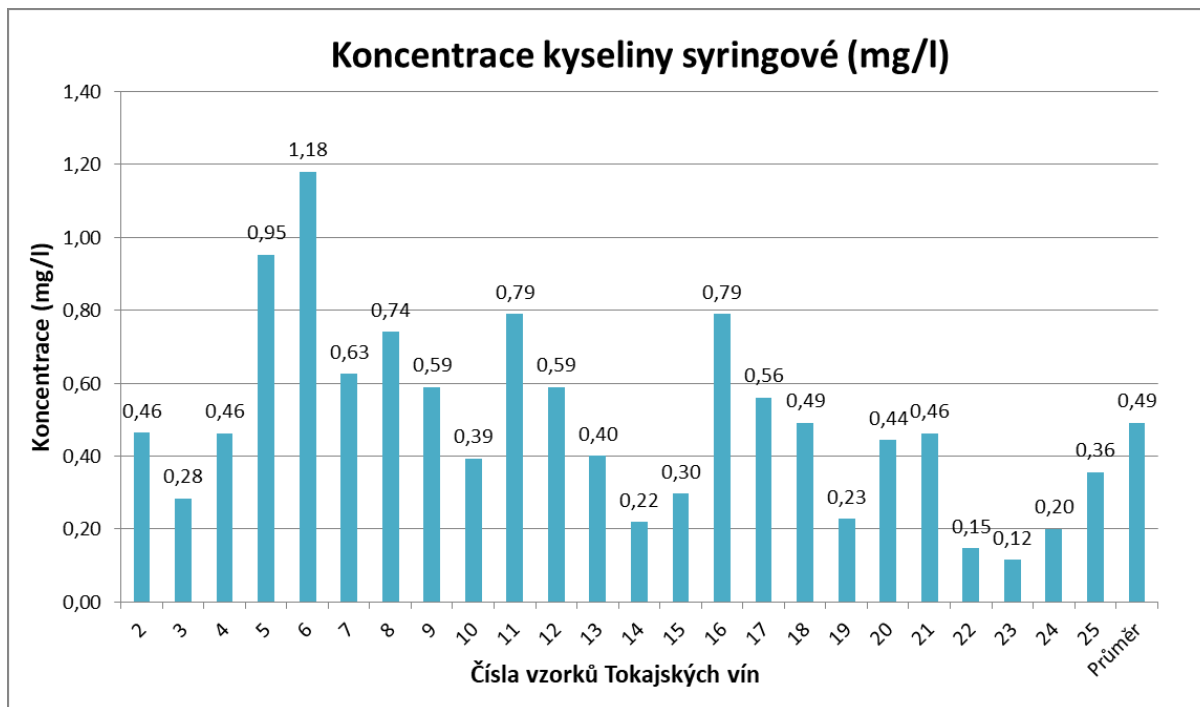
Epikatechin byl obsažen ve všech 25 vzorcích, jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí od 4,79 do 30,55 mg/l, přičemž nejvyšší množství epikatechinu bylo detekováno ve vzorcích číslo 7 (Tokajský výběr 6-putnový z roku 1983) a číse 24 (Tokajský výběr 5-putnový z roku 2003 z vinařství Ostrožovič).



Graf č. 20: Výsledky analýzy epikatechinu ve vzorcích Tokajských vín

## 8.4 Kyselina syringová

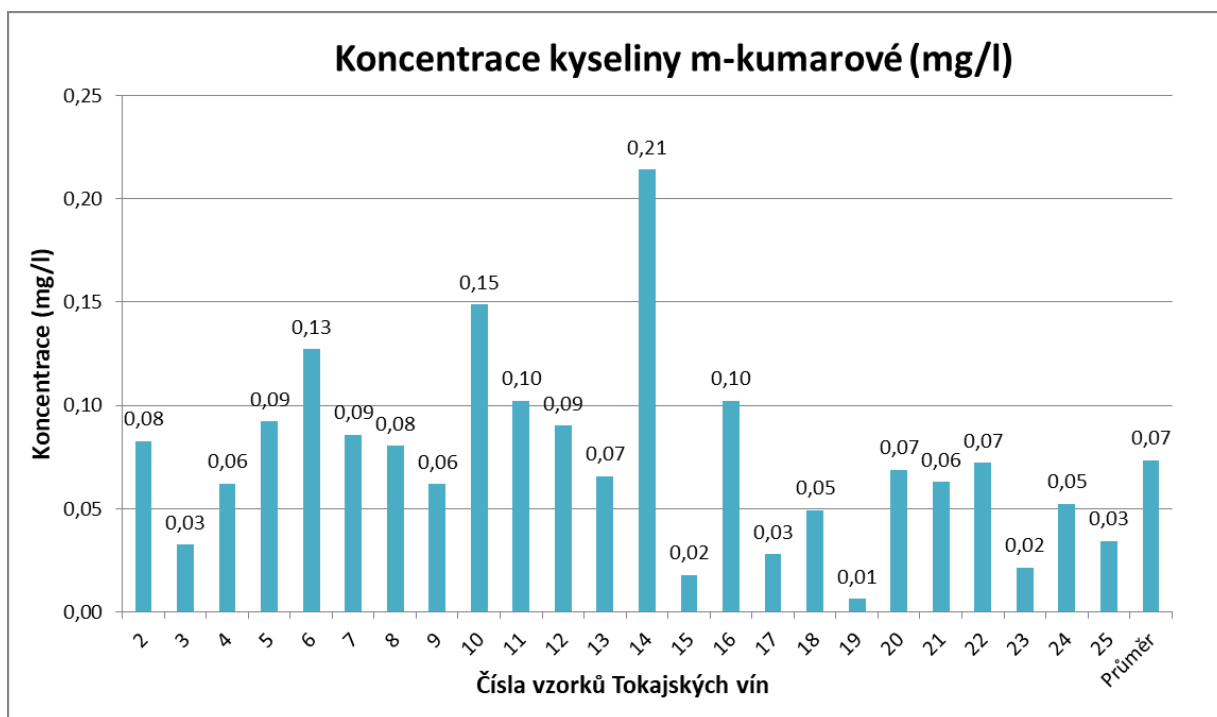
Přestože se kyselina syringová vyskytuje ve všech vzorcích, její koncentrace s výjimkou vzorku číslo 1 a 6 nepřevýšila hodnotu 1 mg/l.



Graf č. 21: Výsledky analýzy kyseliny syringové ve vzorcích Tokajských vín

## 8.5 Kyselina m-kumarová

Množství kyseliny m-kumarové vykazuje stejný trend jako u kyseliny syringové, přičemž u kyseliny m-kumarové se koncentrace pohybovaly pod hodnotou nejmenší koncentrace kalibrační křivky 0,125 mg/l a nemohou být tedy považovány za spolehlivé. Nicméně přítomnost této látky byla ve velice nízkých koncentracích prokázána.

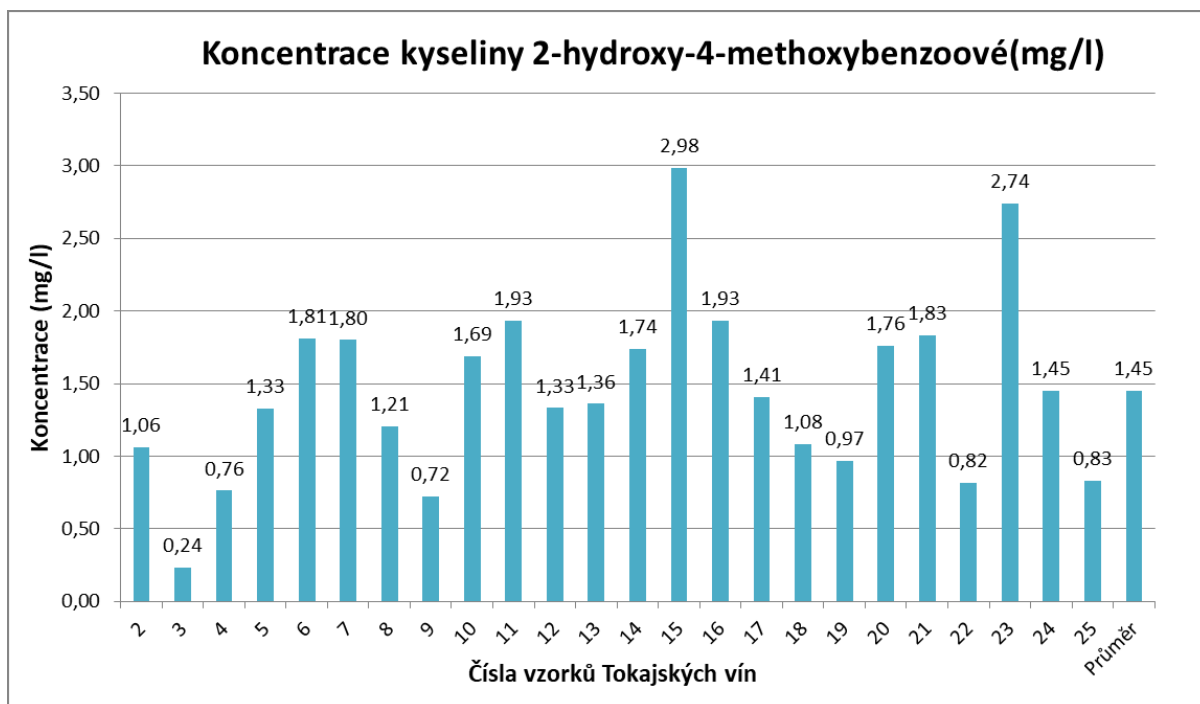


Graf č. 22: Výsledky analýzy kyseliny m-kumarové (fertarové) ve vzorcích Tokajských vín



## 8.6 Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová

Z grafu lze vyčíst, že kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová byla detekována u všech 25 vzorků, její koncentrace se pohybovala v rozmezí od 0,24 do 5,53 mg/l, průměrná hodnota u všech analyzovaných vzorků byla 1,45 mg/l.

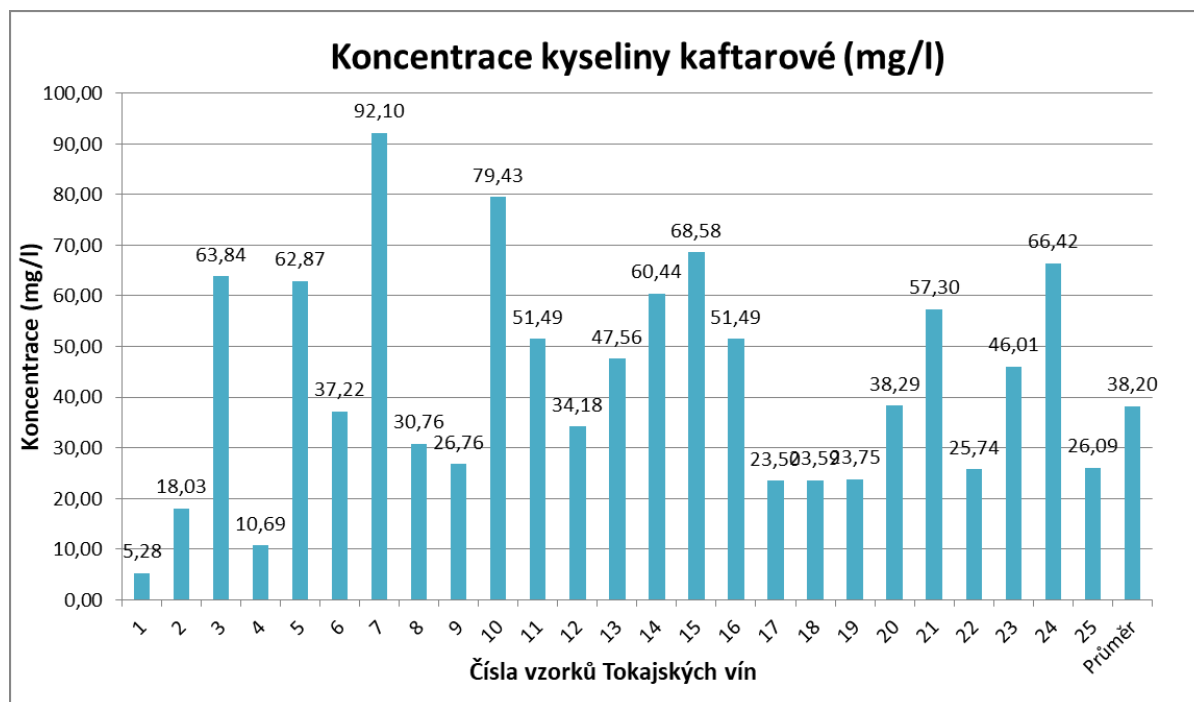


Graf č. 23: Výsledky analýzy kyseliny 2-hydroxy-4-methoxybenzoové ve vzorcích

Tokajských vín

## 8.7 Kyselina kaftarová

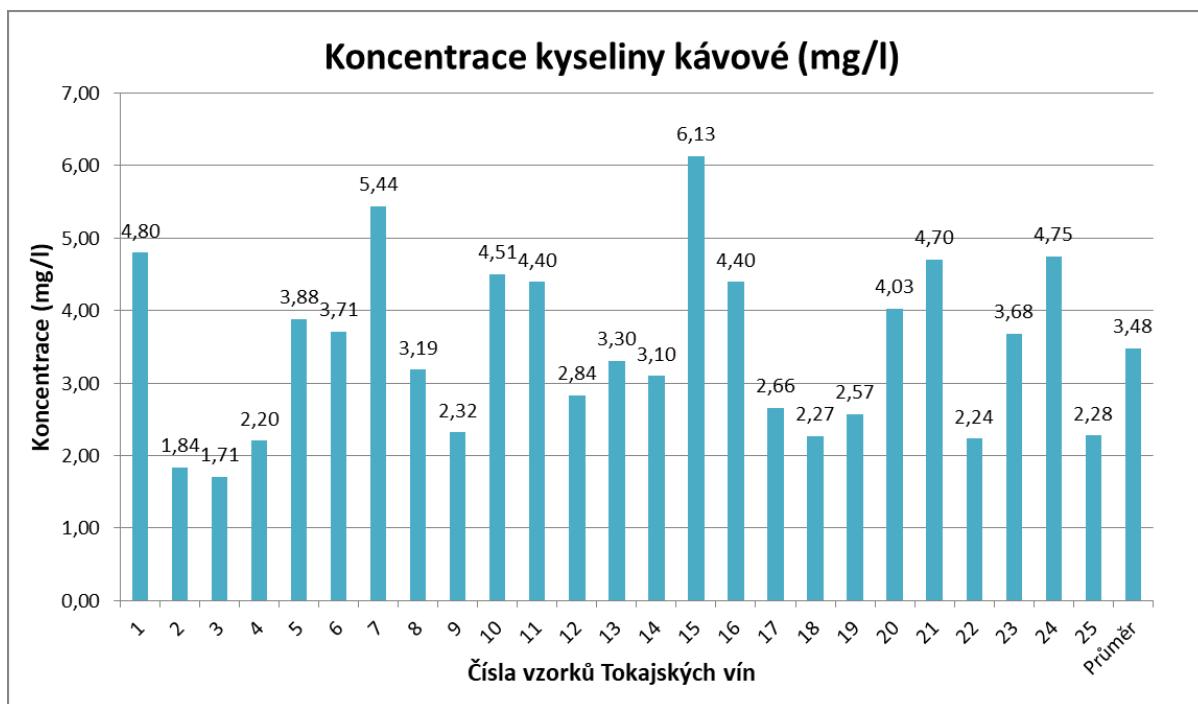
Kyselina kaftarová se řadí mezi skupinu stanovovaných látek, které se ve všech 25 analyzovaných vzorcích vyskytovaly v relativně vyšším množství. Nejvyšší koncentraci kyseliny kaftarové obsahoval vzorek číslo 7 (Tokajský výběr 6-putnový z roku 1983), vyšší množství bylo také detekováno ve vzorcích číslo 10 (Tokajský výběr 4-putnový z roku 2002 z vinařství Ostrožovič) a číslo 14 (Furmint-Šupkáč 90-denní z roku 2017).



Graf č. 24: Výsledky analýzy kyseliny kaftarové ve vzorcích Tokajských vín

## 8.8 Kyselina kávová

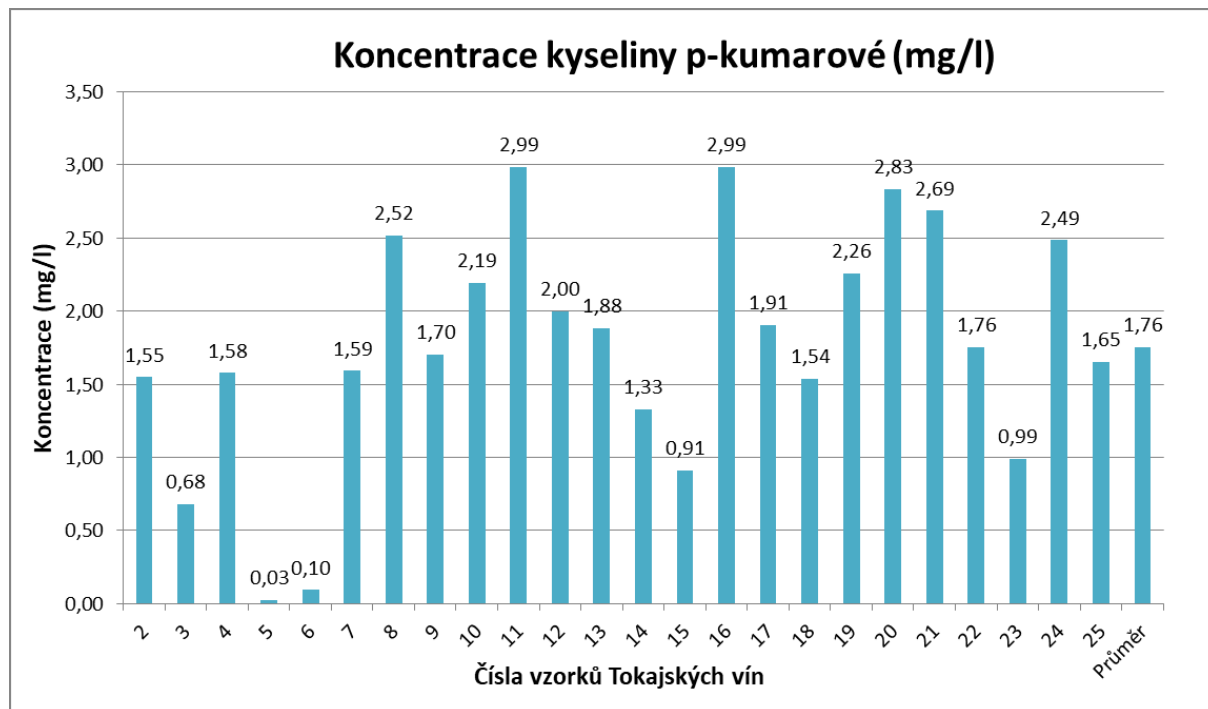
Z grafu lze vyčíst, že koncentrace kyseliny kávové se pohybovala v rozmezí od 1,84 do 6,13 mg/l, nejvyšší koncentrace kyseliny kávové byla zaznamenána ve vzorku číslo 15 (Tokajský výběr 6-putnový z roku 1997 z vinařství Zlatý Strapec).



Graf č. 26: Výsledky analýzy kyseliny kávové ve vzorcích Tokajských vín

## 8.9 Kyselina p-kumarová

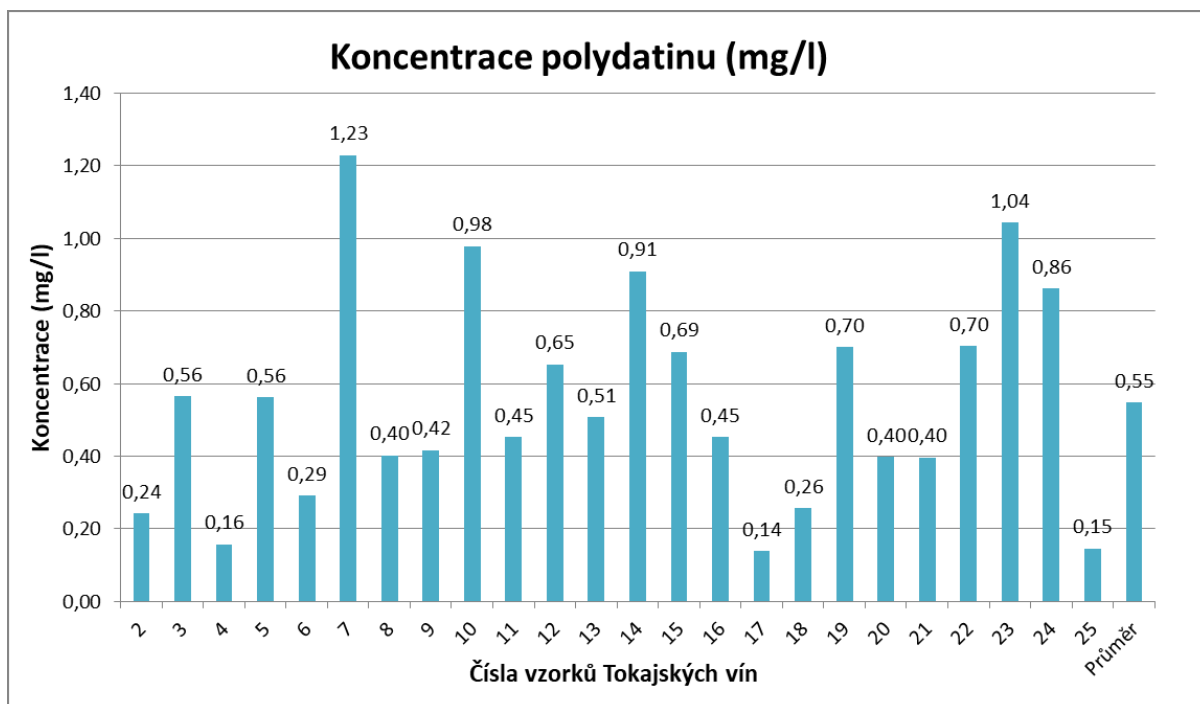
Para-kumarová kyselina byla přítomna ve všech vzorcích nejčastěji v koncentracích od 1 do 3 mg/l.



Graf č. 27: Výsledky analýzy kyseliny p-kumarové ve vzorcích Tokajských vín

## 8.10 Polydatin

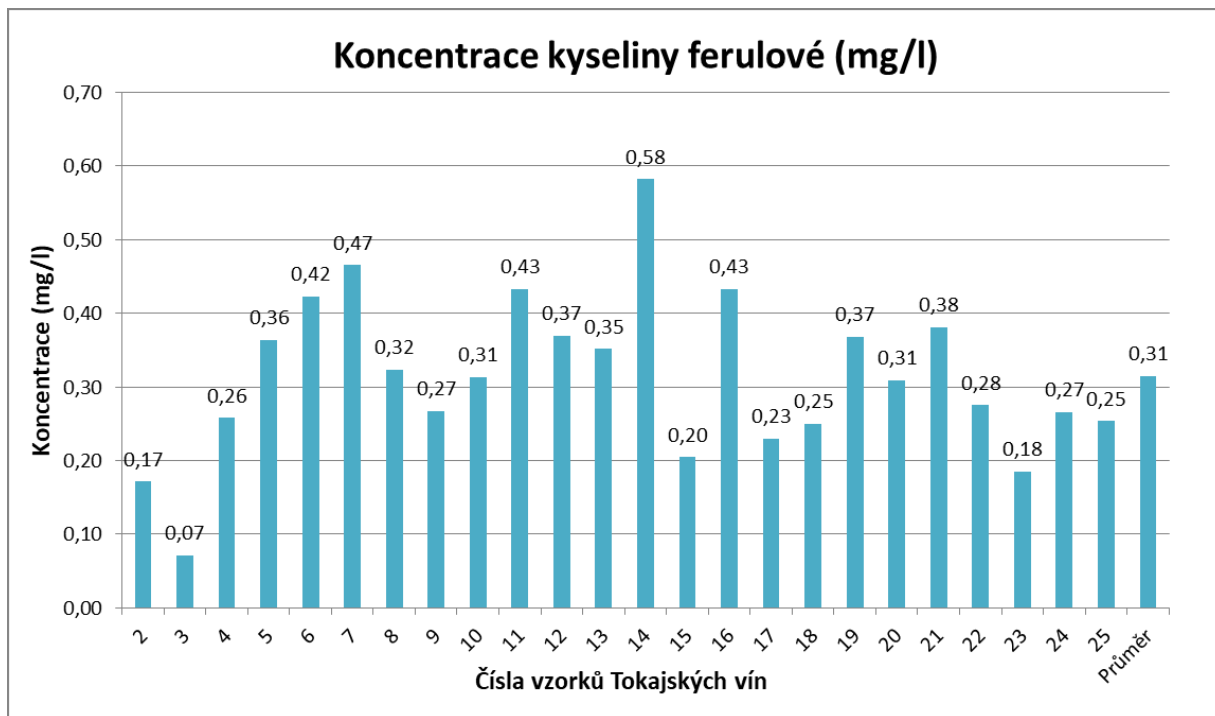
Přestože byl polydatin detekován u každého z testovaných vzorků, jeho koncentrace dosáhla hodnoty 1 mg/l pouze ve dvou případech, u vzorku číslo 23 (Tokajský výběr 3-putnový z vinařství Zlatý Strapec z roku 1988) a 7 (Tokajský výběr 6-putnový z roku 1983).



Graf č. 28: Výsledky analýzy polydatinu ve vzorcích Tokajských vín

## 8.11 Kyselina ferulová

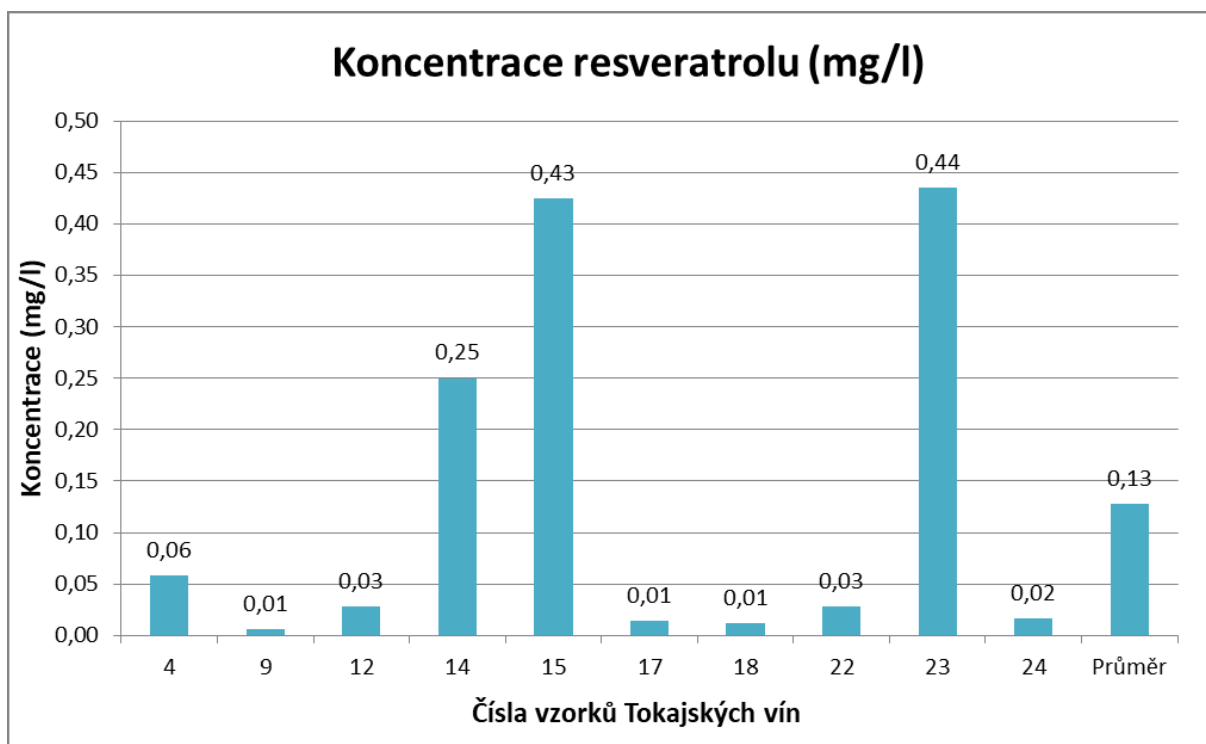
Kyselina ferulová, stejně jako polydatin, byla detekována u všech vzorků, její koncentrace se vyskytovala v intervalu od 0,07 do 0,58 mg/l s průměrnou hodnotou 0,31 mg/l.



Graf č. 29: Výsledky analýzy kyseliny ferulové ve vzorcích Tokajských vín

## 8.12 Resveratrol

Resveratrol byl přítomen pouze u jedenácti vzorků, prakticky u všech byl detekován ve stopovém množství. Většina zjištěných koncentrací však byla zjištěna pod rozsahem kalibrační křivky a proto nalezené koncentrace nemohou být považovány za spolehlivě určené.



Graf č. 30: Výsledky analýzy resveratrolu ve vzorcích Tokajských vín

### **8.13 Kyselina 4-hydroxybenzoová**

Vzhledem ke koeluci s dalším interferujícím píkem s podobným retenčním časem v Tokajském víně, který neměl identické UV spektrum se standardem, nebylo možné tuto látku spolehlivě kvantifikovat. Proto nebyl její obsah dále hodnocen.

### **8.14 Katechin hydrát**

Vzhledem ke koeluci s dalším interferujícím píkem s podobným retenčním časem v Tokajském víně byla při validaci zjištěna u této látky výtěžnost přesahující 170%. Pík interference neumožnil spolehlivě kvantifikovat obsah katechinu a proto nebyl dále hodnocen.

### **8.15 Kyselina chlorogenová**

Výtěžnost kyseliny chlorogenové byla při validaci zjištěna v rozmezí 12-45%. To bylo způsobeno nepřesnou integrací zaviněnou koelujícími píky z matrice vína. Nalezené hodnoty nejsou spolehlivé a nejsou dále uváděny.

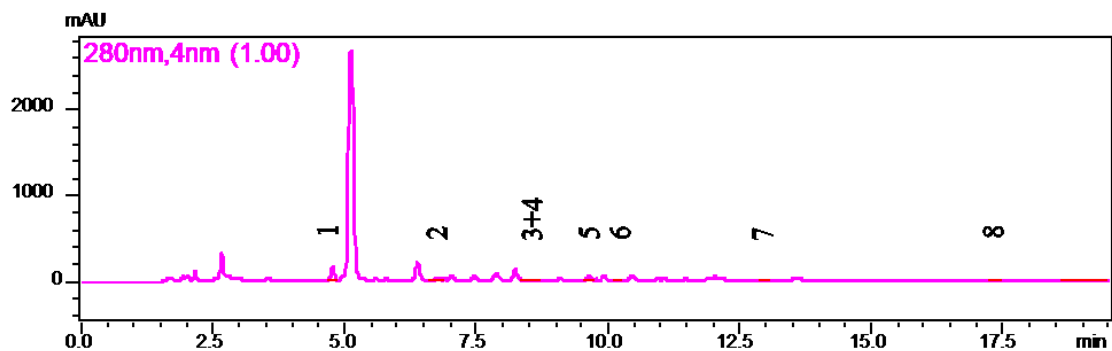


## 8.16 Chromatogramy reprezentativních analýz vybraných vzorků Tokajských vín

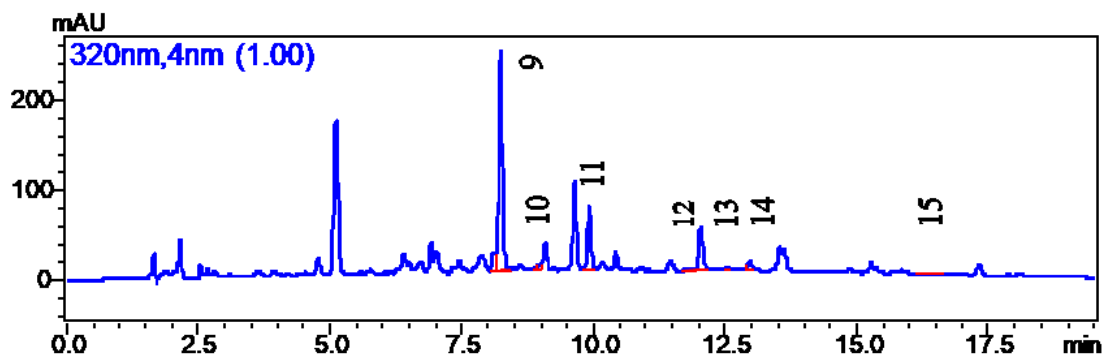
Pořadí	Fenolické sloučeniny	t <sub>r</sub> (min)
1	Kyselina gallová	4,719
2	Kyselina protokatechová	6,679
3	Kyselina 4-hydroxybenzoová	8,519
4	Katechin hydrát	8,644
5	Epikatechin	9,688
6	Kyselina syringová	10,248
7	Kyselina m-kumarová	12,852
8	Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová	17,486
9	Kyselina kaftarová	8,179
10	Kyselina chlorogenová	8,956
11	Kyselina kávová	9,826
12	Kyselina p-kumarová	11,927
13	Polydatin	12,464
14	Kyselina ferulová	12,988
15	Resveratrol	16,440

Tabulka č. 22: Pořadí a číslování fenolických sloučenin v následujících chromatogramech

### 8.16.1 Chromatogram vzorku č. 7 – Tokajský výběr 6-putnový z roku 1983

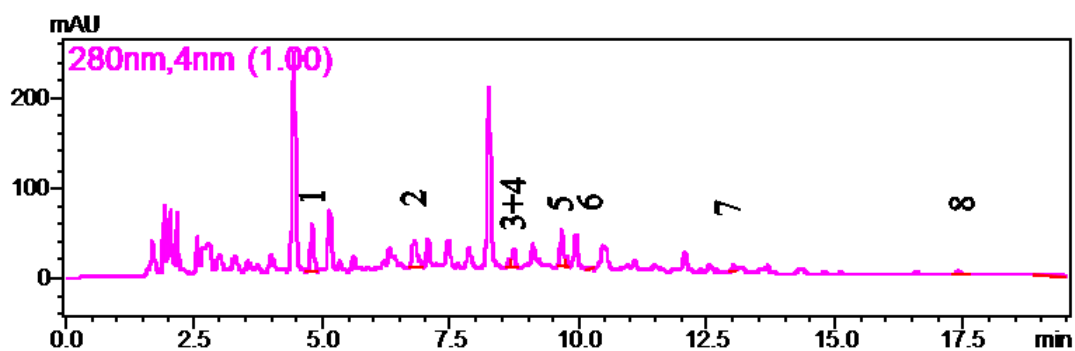


Obrázek č. 21: Chromatogram vzorku č. 7 měřen při 280 nm

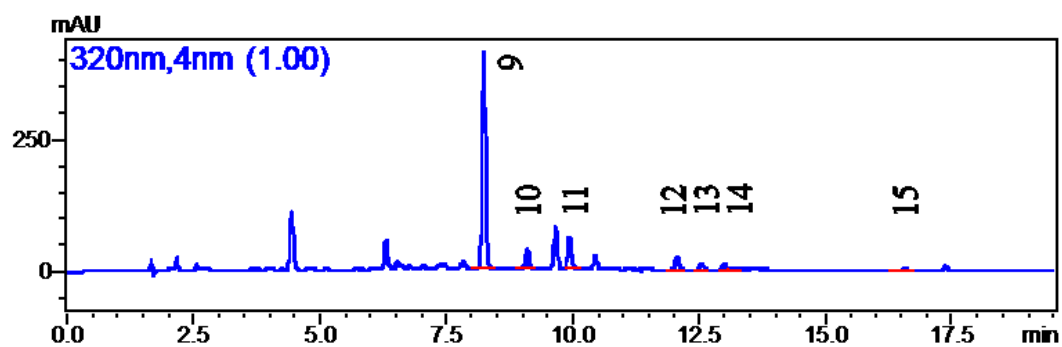


Obrázek č. 22: Chromatogram vzorku č. 7 měřen při 320 nm

8.16.2 Chromatogram vzorku č. 15 – Tokajský výběr 6-putnový z roku 1997  
z vinařství Zlatý Strapec

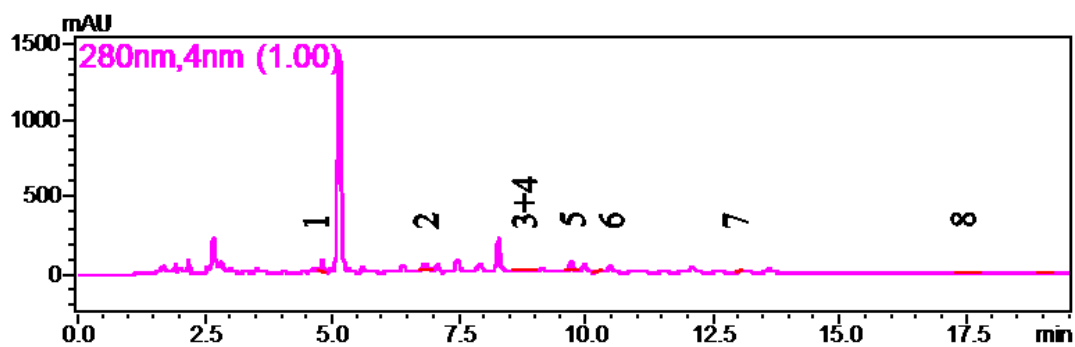


Obrázek č. 23: Chromatogram vzorku č. 15 měřen při 280 nm

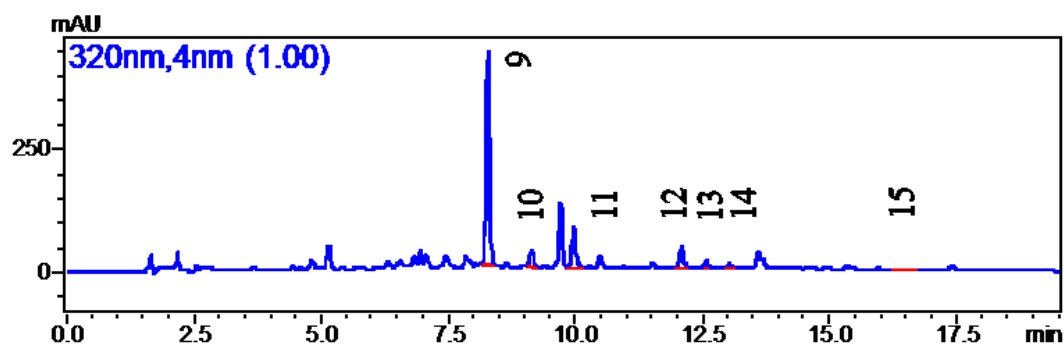


Obrázek č. 24: Chromatogram vzorku č. 15 měřen při 320 nm

### 8.16.3 Chromatogram vzorku č. 24 – Tokajský výběr 5-putnový z roku 2003 z vinařství Ostrožovič



Obrázek č. 25: Chromatogram vzorku č. 24 měřen při 280 nm

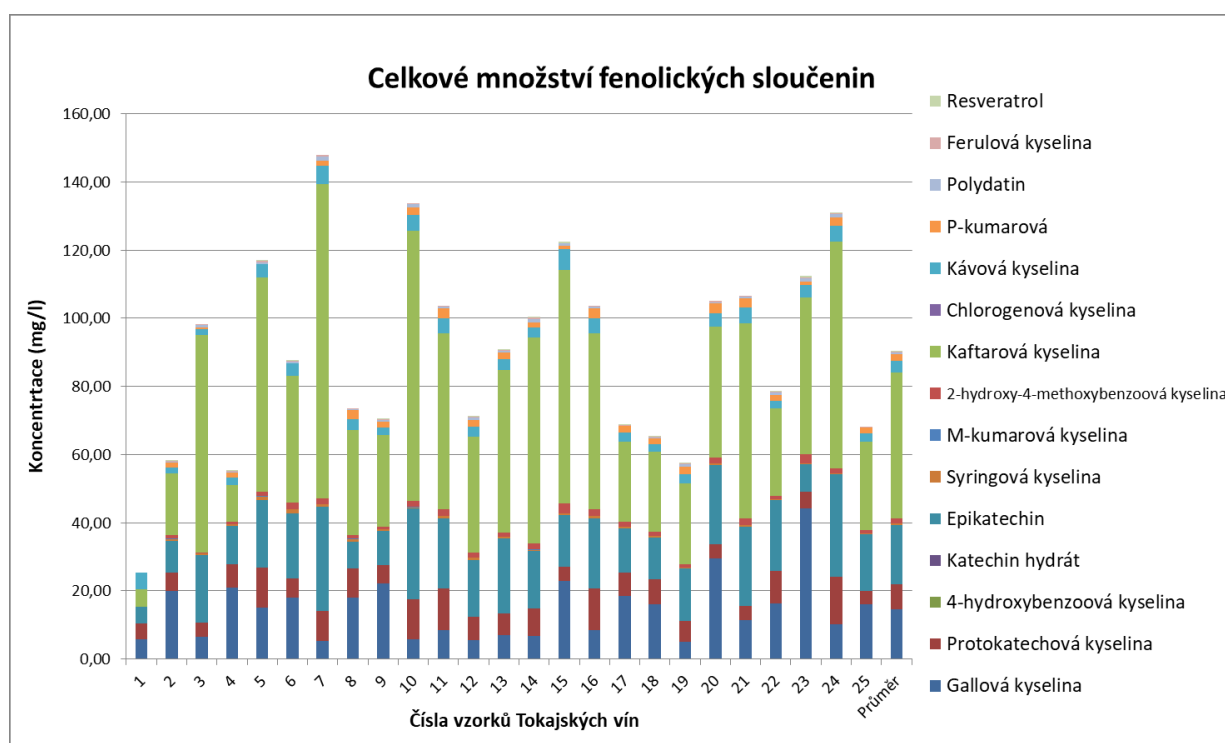


Obrázek č. 26: Chromatogram vzorku č. 24 měřen při 320 nm

## 8.17 Celkové množství vybraných fenolických sloučenin

Největší množství fenolických sloučenin bylo detekováno ve vzorku číslo 7 (Tokajský výběr 6-putnový z roku 1983), dále pak ve vzorku číslo 24 (Tokajský výběr 5-putnový z vinařství Ostrožovič z roku 2003) a ve vzorku číslo 10 (Tokajský výběr 4-putnový z vinařství Ostrožovič z roku 2002).

Jak můžeme vidět v grafu, největší zastoupení mezi jednotlivými fenolickými látkami měla kyselina kaftarová, jejíž průměrná hodnota koncentrace ve všech vzorcích se pohybovala kolem hodnoty 42,86 mg/l. Druhou látkou s nejvyšším obsahem byl epikatechin s průměrnou koncentrací 17,36 mg/l. Hned za epikatechinem se, co do průměrného množství ve vzorcích, umístila kyselina gallová s průměrnou hodnotou koncentrace 14,53 mg/l. Je nutné zmínit i kyselinu protokatechovou a káвовou, které se ve vzorcích objevovaly v nezanedbatelném množství, 7,37 mg/l respektive 3,48 mg/l.



Graf č.31: Celkové množství a zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin ve vzorcích

Standard	Koncentrace fenolických sloučenin ve vzorcích tokajských vín (mg/ml)																									Průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Gallová kyselina	5,77	19,98	6,42	20,96	15,04	18,03	5,21	18,10	22,15	5,87	8,49	5,42	6,89	6,75	22,82	8,49	18,48	16,02	5,14	29,38	11,38	16,22	44,18	10,10	15,95	14,53
Protokatechová kyselina	4,67	5,45	4,24	6,82	11,79	5,49	8,90	8,43	5,42	11,55	12,24	6,83	6,37	8,01	4,33	12,24	6,80	7,44	5,95	4,35	4,17	9,69	5,01	13,90	4,06	7,37
4-hydroxybenzoová kyselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katechin hydrát	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epikatechin	4,79	9,27	19,93	11,23	19,90	19,17	30,55	7,90	9,89	26,70	20,45	16,87	22,09	16,92	15,14	20,45	12,99	12,17	15,49	23,14	23,26	20,81	8,01	30,28	16,55	17,36
Syringová kyselina	-	0,46	0,28	0,46	0,95	1,18	0,63	0,74	0,59	0,39	0,79	0,59	0,40	0,22	0,30	0,79	0,56	0,49	0,23	0,44	0,46	0,15	0,12	0,20	0,36	0,49
M-kumarová kyselina	-	0,08	0,03	0,06	0,09	0,13	0,09	0,08	0,06	0,15	0,10	0,09	0,07	0,21	0,02	0,10	0,03	0,05	0,01	0,07	0,06	0,07	0,02	0,05	0,03	0,07
2-hydroxy-4-methoxybenzoová kyselina	-	1,06	0,24	0,76	1,33	1,81	1,80	1,21	0,72	1,69	1,93	1,33	1,36	1,74	2,98	1,93	1,41	1,08	0,97	1,76	1,83	0,82	2,74	1,45	0,83	1,45
Kafarová kyselina	5,28	18,03	63,84	10,69	62,87	37,22	92,10	30,76	26,76	79,43	51,49	34,18	47,56	60,44	68,58	51,49	23,50	23,59	23,75	38,29	57,30	25,74	46,01	66,42	26,09	42,86
Chlorogenová kyselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Káвовá kyselina	4,80	1,84	1,71	2,20	3,88	3,71	5,44	3,19	2,32	4,51	4,40	2,84	3,30	3,10	6,13	4,40	2,66	2,27	2,57	4,03	4,70	2,24	3,68	4,75	2,28	3,48
p-kumarová	-	1,55	0,68	1,58	0,03	0,10	1,59	2,52	1,70	2,19	2,99	2,00	1,88	1,33	0,91	2,99	1,91	1,54	2,26	2,83	2,69	1,76	0,99	2,49	1,65	1,76
Polydatin	-	0,24	0,56	0,16	0,56	0,29	1,23	0,40	0,42	0,98	0,45	0,65	0,51	0,91	0,69	0,45	0,14	0,26	0,70	0,40	0,40	0,70	1,04	0,86	0,15	0,55
Ferulová kyselina	-	0,17	0,07	0,26	0,36	0,42	0,47	0,32	0,27	0,31	0,43	0,37	0,35	0,58	0,20	0,43	0,23	0,25	0,37	0,31	0,38	0,28	0,18	0,27	0,25	0,31
Resveratrol	-	0,01	-0,02	0,06	0,00	0,00	-0,01	-0,02	0,01	0,00	-0,01	0,03	0,00	0,25	0,43	-0,01	0,01	0,01	0,00	-0,01	-0,01	0,03	0,44	0,02	-0,01	0,05

Tabulka č. 23: Výsledné koncentrace jednotlivých fenolických sloučenin ve vzorcích Tokajských vín

## 9 ZÁVĚR

Za účelem stanovení vybraných fenolických sloučenin, kyseliny gallové, protokatechové, syringové, ferulové, kávové, kaftarové, chlorogenové, m-kumarové, p-kumarové, 2-hydroxybenzoové, 2-hydroxy-4-methoxybenzoové, epikatechinu, katechin hydrátu, resveratrolu a polydatinu, ve vzorcích Tokajských vín byla vyvinuta a validována HPLC metoda. Na základně experimentálního testování byly vybrány optimální chromatografické podmínky pro analýzu vybraných fenolických látek.

### Optimální podmínky analýzy:

Kolona: Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m)

Mobilní fáze: A – acetonitril; B – 0,1% kyselina fosforečná

Rychlost průtoku mobilní fáze: 1 ml/min

Gradientová eluce: Gradient 09

Detekce DAD detektorem: 280 nm/320 nm

Dávkování vzorku: 10  $\mu$ l

Teplota: 30 °C

Po nalezení optimálních podmínek separace byla metoda validována. Součástí validace bylo stanovení přesnosti a správnosti metody, dále pak hodnocení linearity a určení symetrie a rozlišení chromatografických píků. U tří látek – kyseliny chlorogenové, katechin hydrátu a kyseliny 4-hydroxybenzoové nebyla validace plně dokončena z důvodů koeluce látek s interferujícími píky či vzájemné koeluce mezi sebou. Proto tyto látky nebyly v Tokajských vínech dále hodnoceny.

Za účelem stanovení přesnosti metody byla jako kritérium směrodatná odchylka, která byla určena opakovaným měřením vzorku standardů o koncentraci 5 mg/l. Směrodatná odchylka u celkem pěti standardů překročila hodnotu 1 %, velice výrazně u kyseliny 4-hydroxybenzoové a katechin hydrátu pravděpodobně z důvodu koeluce píků a následné nemožnosti správné integrace těchto píků, u epikatechinu, polydatinu a kyseliny chlorogenové byla hranice 1 % překročena pouze mírně.

Správnost metody byla vyjádřena hodnotami výtěžnosti, kde u většiny standardů se hodnoty výtěžnosti vyskytovaly v intervalu od 93 do 110 %, výjimku tvořila kyselina 4-hydroxybenzoová, katechin hydrát, epikatechin, kyselina syringová a chlorogenová.

Linearita metody byla ověřována za pomoci devíti vzorků, jejichž koncentrace se pohybovala v rozmezí od 0,125 mg/l do 40 mg/l. Z grafů lineární regrese byl odečten korelační koeficient jednotlivých standardů, hodnoty korelačního koeficientu se vyskytovaly v intervalu od 0,99939 do 0,99992.

Testem vhodnosti chromatografického systému bylo prokázáno adekvátní rozlišení chromatografických píků, které odpovídalo doporučeným hodnotám u velké většiny standardů, opět s výjimkou kyseliny 4-hydroxybenzoové, katechin hydrátu a 2-hydroxy-4-methoxybenzoové kyseliny. Faktor symetrie se u látek, u kterých jej bylo možné určit, pohyboval v rozmezí od 0,914 až po 1,209.

Celkem bylo testováno 25 vzorků, v množství jednotlivých fenolických sloučenin ve vzorcích Tokajských vín byly zjištěny významné rozdíly jak mezi jednotlivými vinařstvími, tak zejména mezi Tokajskými výběry dle počtu přidávaných puten a ročníku výroby daného Tokajského výběru. Největší množství fenolických látek bylo detekováno v Tokajském 6-putnovém výběru z roku 1983 bez známého původu (157,73 mg/l), dále v Tokajské 5-putnovém výběru původem z vinařství Ostrožovič ročník 2003 (143,44 mg/l) a Tokajském 4-putnovém výběru původem z vinařství Ostrožovič ročník 2002 (140,68 mg/l).

Rozdíly byly zjištěny i v zastoupení mezi jednotlivými fenolickými sloučeninami, nejvyšší průměrnou koncentraci měla kyselina kaftarová (42,86 mg/l), dále pak průměrná koncentrace epikatechinu byla 17,36 mg/l, průměrná koncentrace kyseliny gallové byla 14,53 mg/l, průměrná koncentrace kyseliny protokatechové se rovnala hodnotě 7,37 mg/l a průměrná hodnota koncentrace kyseliny kávové se rovnala hodnotě 3,48 mg/l.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOVÁČ, Jozef. *Spracovanie hrozna*. Bratislava: Priroda, 1990. ISBN 80-07-00313-4.
- [2] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU, Bernard DONÈCHE a Aline LONVAUD. *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd Edition. France: JOHN WILEY, 2006. ISBN 978-0-470-01034-1.
- [3] Tokajská esence. In: *Www.znalecvin.cz* [online]. Milan Sedláček, 2006 [cit. 2019-11-30]. Dostupné z: <http://www.znalecvin.cz/tokajska-esence>
- [4] RÉBLOVÁ, Martina. Tokajské víno a jeho styly: esence, tokajské výběry včetně Aszú, samorodné víno a další speciality a jejich výroba. In: *MojeLahve.cz* [online]. Tomáš Šrum, 2011 [cit. 2019-11-30]. Dostupné z: <https://mojelahve.cz/clanek/tokajske-vino-a-jeho-styly-esence-tokajske-vybery-vcetne-aszu-samorodne-vino-a-dalsi-speciality-a-jejich-vyroba-423>
- [5] MICHLOVSKÝ, Miloš. *Příprava bílých vín*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014. ISBN 978-80-905319-4-9.
- [6] Botrytis cinerea v enologii. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví*. 1991, **102**(9), 32-35.
- [7] PAVLOUŠEK, Pavel a Pavla BUREŠOVÁ. *Vše, co byste měli vědět o víně: --a nemáte se koho zeptat*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4351-6.
- [8] Plíseň tokajských a jiných vinných sklepů je užitečná. In: *MojeLahve.cz* [online]. Tomáš Šrum, 2011 [cit. 2019-11-25]. Dostupné z: <https://mojelahve.cz/clanek/plisen-tokajskych-a-jinych-vinnych-sklepu-je-uzitecna-637>
- [9] Vinařská oblast Tokaj – kraj, kde se rodí tokajská vína, její historie a původní transylvánské odrůdy. In: *MojeLahve.cz* [online]. Tomáš Šrum, 2011 [cit. 2019-11-30]. Dostupné z: <https://mojelahve.cz/clanek/vinarska-oblast-tokaj-kraj-kde-se-rodí-tokajska-vina-jeji-historie-a-puvodni-transylvanske-odrudy-422> ; <http://www.agroporadenstvo.sk/index.php?pl=92&article=755>
- [10] Tuf. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Tuf>
- [11] *Phenolic Compound Biochemistry*. Berlín: Springer, 2009. ISBN 978-1-4020-5163-0.
- [12] Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010, **2010**(2), 1231-1246. DOI: 10.3390/nu2121231.

- [13] Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2014, **5**(5), 393-396.
- [14] Stilbeny - fytoalexiny se širokým potenciálem. *Bioprospect*. 2015, **25**(4), 85-89.
- [15] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, c2011. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [16] KRAUS, Vilém. *Pěstujeme révu vinnou*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2012. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-3465-1.
- [17] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstujeme stolní odrůdy révy vinné*. Praha: Grada, 2009. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-2787-5.
- [18] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [19] NOLLET, Leo M.L. a Janet Alejandra GUTIERREZ-URIBE. *Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis*. CRC Press, 2018. ISBN 9781498722964.
- [20] JACKSON, Ron. *Wine Science: Principles and Applications*. 3, ilustrované vydání. Elsevier/Academic Press, 2008. ISBN 0123736463, 9780123736468.
- [21] MORENO-ARRIBAS, M. Victoria a M. Carmen POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, c2009. ISBN 9780387741185.
- [22] Fenolické látky červených vín - část 2.: Taniny. *Vinařský obzor: odborný časopis pro vinohradnictví a vinařství*. 1991, **2008**(7-8), 345-347.
- [23] Comparison of Phenolic Acids and Flavan-3-ols During Wine Fermentation of Grapes with Different Harvest Times. *Molecules*. 2009, **14**(2), 827-838.
- [24] 3,4-Dihydroxybenzoic acid. In: *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA): PubChem, 2004 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72>
- [25] Faktory ovlivňující kvalitu moštu a vína. *Vinařský obzor: odborný časopis pro vinohradnictví a vinařství*. 1991, **2010**(1-2), 36.
- [26] Syringic acid. In: *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA): PubChem, 2005 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10742#section=Top>
- [27] Gallic acid. In: *Human metabolome database* [online]. Canada: Metabolomics centre, 2018 [cit. 2019-01-15]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0005807#identification>

- [28] Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: Results of human and animal experiments. *Mutation Research*. 2011, **715**(1-2), 61-71.
- [29] Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical Methods*. 2014, **6**, 3203-3210.
- [30] CADENAS, Enrique a Lester PACKER. *Handbook of antioxidants*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2002. ISBN 0824705475.
- [31] Ferulic acid. In: *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA): PubChem, 2004 [cit. 2019-02-01]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ferulic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ferulic_acid#section=Top)
- [32] Kyselina p-kumarová. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_p-kumarová](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_p-kumarová)
- [33] 4-hydroxycinnamic acid. In: *PubChem Database* [online]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA): PubChem, 2005 [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637542>
- [34] Hydroxyskořicové kyseliny - Část 1.: Obecné a antioxidační vlastnosti. *Vinařský obzor: odborný časopis pro vinohradnictví a vinařství*. 1991, **100**(6), 293-295.
- [35] (-)-Epicatechin. In: *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA): PubChem Database, 2005 [cit. 2019-02-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72276#section=Top>
- [36] A Validated HPLC Method for the Quantitative Analysis of Trans-Resveratrol and Trans-Piceid in Hungarian Wines. *Journal of Chromatographic Science*. 2005, **43**(9), 445-449.
- [37] A Rapid Method for Determination of Resveratrol in Wines by HPLC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2009, **32**(14), 2105-2121.
- [38] *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 9783319600208.
- [39] KÖNIG, Helmut, Gottfried UNDEN a Jürgen FRÖHLICH. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Berlin: Springer, c2009. ISBN 978-3-540-85462-3.
- [40] *Wine: Phenolic Composition, Classification and Health Benefits*. New York: Nova Science Publishers, 2014, s. 71-102. ISBN 978-1633210486.
- [41] Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chemické listy*. 2011, **105**, 667-673.

- [42] *Český lékopis 2017: Tištěná verze (1.-4. díl)*. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 9788027105007.
- [43] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [44] Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*. 2002, **973**(1-2), 221-227.
- [45] The Effect of Micro-oxygenation on the Phenolic Composition, Quality and Aerobic Wine-Spoilage Microorganisms of Different South African Red Wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2006, **27**(1), 57-67.
- [46] Rapid Determination of Simple Polyphenols in Grapes by LC Using a Monolithic Column. *Chromatographia*. 2010, **72**(5-6), 417-424.
- [47] A core-shell column approach to a comprehensive high-performance liquid chromatography phenolic analysis of *Vitis vinifera* L. and interspecific hybrid grape juices, wines, and other matrices following either solid phase extraction or direct injection. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1251**, 111-121.
- [48] Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*. 2000, **897**, 177-184.
- [49] Resveratrol-derivates and antioxidative capacity in wines made from botrytized grapes. *Food Chemistry*. 2006, **96**(1), 74-79.
- [50] Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*. 2007, **2007**(12), 679-693.
- [51] Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *Eur Food Res Technol*. 2007, **226**(4), 871-876.
- [52] Browning of Cava (Sparkling Wine) During Aging in Contact with Lees Due to the Phenolic Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2000, **51**(1), 29-36.
- [53] Phenolic Characterization of Malbec Wines from Mendoza Province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, **58**(4), 2388-2397.
- [54] Comparative study on the antioxidant properties of Slovakia and Austrian wines. *LWT - Food Science and Technology*. 2008, **41**(10), 2126-2135.
- [55] Authentication of Riesling Wines from the Czech Republic on the Basis of the Non-flavonoid Phenolic Compounds. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013, **31**(5), 474-482.
- [56] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Klatovy: Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

- [57] Validace metod. In: *EffiChem* [online]. Brno: EffiChem [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <http://www.effichem.cz/reseni/laboratorni-specialiste/validace-metod/>
- [58] Validace metod: validační kritéria. In: *EffiChem* [online]. Brno: EffiChem [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <http://www.effichem.cz/produkty/effivalidation-4-0/moduly/validace-metod/>
- [59] *Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení antokyanů v kanadských borůvkách*. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova - farmaceutická fakulta v Hradci Králové