VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

FAKULTA CHEMICKÁ

CHARAKTERIZACE VLASTNOSTÍ EXTRAKTŮ Z HROZNOVÝCH BOBULÍ POMOCÍ MODERNÍCH ANALYTICKÝCH METOD

MULTI-EXPERIMENTAL CHARACTERIZATION OF GRAPE SKINS' EXTRACTS

Autoreferát doktorské disertační práce k získání vědecké hodnosti Ph.D.

BRNO 2010 **Ing. Lenka Šťavíková**

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Chemie a technologie potravin na Vysokém učení technickém v Brně, Fakultě chemické.

Uchazeč: Ing. Lenka Šťavíková
Ústav chemie potravin a biotechnologií,
FCH VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno

Školitel: Doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ústav chemie potravin a biotechnologií,
FCH VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:……

Obhajoba disertační práce se koná dne…….před komisí pro obhajoby doktorských disertačních prací na FCH VUT v Brně od…….hodin.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně, Purkyňova 118.

OBSAH

ABSTRAKT 4
ABSTRACT 5
1. PŘEHLED AKTUÁLNÍCH POZNATKŮ 6
1.1 Polyfenoly 6
1.2 Anthokyany 6
1.2.1 Obecná charakteristika 6
1.2.2 Výskyt anthokyanových barviv 7
1.2.3 Biologická aktivita anthokyanů 8
1.2.4 Využití v potravinářství a izolace anthokyanů 8
2. CÍLE PRÁCE 10
3. METODICKÉ POSTUPY 11
3.1. Materiál a úprava vzorků 11
3.2. Extrakce 11
3.3. UV/VIS metody a pH 11
3.4. HPLC experimenty 12
3.5. EPR experimenty 12
4. VÝSLEDKY A DISKUSE 13
4.1 Vliv podmínek extrakce na pH 13
4.2 Vliv podmínek extrakce na celkový obsah polyfenolických látek 13
4.3 Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky a další parametry extraktů 14
4.4 Stanovení anthokyanového profilu extraktů pomocí HPLC 16
4.5 Stanovení radikál-zhášejících vlastností pomocí $ABTS^{\bullet+}$ 18
4.6 Stanovení radikál-zhášejících vlastností pomocí $^{\bullet}$DPPH 21
4.7 Určení antioxidační kapacity vzorků v systému DMPO/Fe^{2+}/H_2O_2 24
4.8 Porovnání vlastností extraktů z hroznových slupek a vína 28
5. ZÁVĚR 30
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ 32
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 33
8. PUBLIKČNÍ ČINNOST 38

ABSTRAKT

V posledních letech se zvýšil zájem o stanovení anthokyanů v hroznech a vínech červených odrůd protože hrají významnou roli v kvalitě barvy červených vín, ale mají také mnoho prospěšných účinků na lidské zdraví. Přispívají například k redukci srdečně-cévních onemocnění, mají antimutagenní, protizánětlivý, antikarcinogenní a v neposlední řadě také antioxidační vlastnosti.

Předložená práce se zabývá komplexním studiem alkoholických a vodných extraktů z hroznových slupek, připravených ze dvou vinných odrůd, Alibernet a Svatovavřinecké. Extrakty byly připraveny ze tří různých navážek lyofilizovaných hroznových slupek (0,5; 1,0 a 1,5g) pomocí vysokotlaké extrakce rozpouštědlem (PFE) a extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE) při teplotách 40 až 120 °C a tlaku 15 MPa. Jako rozpouštědlo byl použit methanol, ethanol a voda.

Pomocí Folin-Ciocalteuho metody byl u jednotlivých extraktů stanoven celkový obsah polyfenolů (TPC) a jejich trichromatické souřadnice (CIE Lab) byly stanoveny pomocí UV/VIS spektrofotometru. Identifikace a kvantifikace anthokyanů byla provedena pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s detekcí pomocí diodového pole (HPLC-DAD). Bylo také změřeno pH všech extraktů s využitím skleněné elektrody. Antioxidační aktivita byla testována EPR spektroskopií s využitím Fentonova systému (H_2O_2/Fe^{2+}) generujícího reaktivní radikály ($^{\bullet}OH$, $O_2^{-\bullet}$, $^{\bullet}CH_3$) ve spojení s technikou spinových lapačů využívající 5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) jako spinový lapač. Radikál-zhášející aktivita byla posouzena pomocí stabilního volného radikálu 1,1-difenylu-2-pikrylhydrazylu ($^{\bullet}$DPPH) a kation radikálu 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny) - ($ABTS^{\bullet+}$).

Všechna data byla zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a kánonické diskriminační analýzy (CDA) kvůli specifikaci optimálních extrakčních podmínek pro potenciální využití extraktů jako potravinových doplňků nebo barviv.

Výsledky prokázaly, že hroznové slupky obou odrůd, jsou slibným zdrojem anthokyanů s možným využitím v potravinářském průmyslu.

ABSTRACT

The determination of anthocyanins in red grapes and wines has been of increasing interest in the last years, as they play an important role in colour quality of red wines revealing also many human health beneficial effects. They contribute e.g. to the reduction of coronary heart disease, but exhibit also antimutagenic, anti-inflammatory, anti-carcinogenic and antioxidant properties.

In this thesis, the complex study of grape skin alcoholic and water extracts, prepared from *Alibernet* and *St. Laurent* wine grape varieties is presented. Extracts were prepared from three different amounts (0.5; 1.0 and 1.5g) of lyophilized grape skin powder using the Pressurized fluid extraction (PFE) and the Pressurized Hot Water Extraction (PHWE) at different temperatures ranging from 40 up to 120°C and pressure of 15 MPa. Methanol, ethanol and water were used as a solvents.

Total phenolic coumpound content (TPC) of individual extracts was determined using the Folin-Ciocalteu assay and their tristimulus color values (CIE Lab) were estimated, using the UV/VIS spectrophotometer. The identification and quantification of anthocyanins by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) was performed. In addition, pH values of all extracts were also measured using the combinated glass electrode. Antioxidant activity of extracts was tested by EPR spectroscopy in Fenton system (H_2O_2/Fe^{2+}) generating reactive radicals ($^{\bullet}OH$, $O_2^{-\bullet}$, $^{\bullet}CH_3$) followed by spin trapping technique, using 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide (DMPO) as spin trap. In addition, radical scavenging activity of extracts was assessed applying 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($^{\bullet}$DPPH) free radical and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) cation radical ($ABTS^{\bullet+}$) assays.

All the experimental data were processed with principal component analysis (PCA) and canonical discriminant analysis (CDA) to specify the optimum extraction conditions for extract preparation from the perspective of the potential further application of the extracts as food supplements or food colour enhancers.

The results indicated that grape skins of both varieties are a promising source of anthocyanins with prospective application in food industry.

1. PŘEHLED AKTUÁLNÍCH POZNATKŮ

V současné době se klade důraz na zdraví, zejména na zdravou životosprávu. Je snahou konzumovat potraviny bohaté na vlákninu, vitamíny a antioxidanty. Antioxidanty jsou předmětem zájmu jak potravinářských, tak i zdravotnických odborníků. V lidském organismu představují ochranu před oxidačním poškozením nejen antioxidanty syntetizované v těle, ale i ty, které jsou přijímány s potravou.

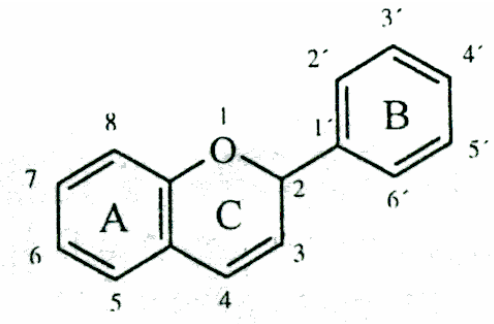
Hroznové slupky červených odrůd *Vitis vinifera* jsou bohaté na polyfenoly, jimž jsou připisovány antioxidační vlastnosti. Byly prokázány i mnohé další zdraví prospěšné účinky těchto látek, jako například redukce koronárních onemocnění, antikancerogenní, antimutagenní a protizánětlivé účinky [1−5].

1.1 Polyfenoly

Polyfenoly se dělí na dvě hlavní skupiny látek - flavonoidní a neflavonoidní. Látky flavonoidní povahy se nacházejí ve slupkách, semenech a třapinách hroznů. Patří sem anthokyany, flavony, flavanony, flavonoly, flavanoly (také nazývané katechiny), proanthokyanidiny. Neflavonoidní sloučeniny se nacházejí převážně v dužnině, zahrnují hlavně fenolické kyseliny a resveratrol [6].

Flavonoidy jsou nejdůležitější látky z polyfenolů jak po stránce kvality, tak kvantity [6]. Ve své molekule obsahují flavanový cyklický skelet, který sestává ze dvou substituovaných benzenových kruhů (A a B) a pyranového kruhu C, napojeného na kruh A (obr. 1) [7].

Spolu s mnohými fyziologickými úlohami v rostlinách jsou flavonoidy také důležitou součástí lidské stravy. Množství příjmaných flavonoidů ve stravě je podstatně vyšší v porovnání s vitaminem C i E. Doporučený příjem flavonoidů je 50 až 800 mg/den v závislosti na množství zkonzumované zeleniny, ovoce a určitých nápojů [8].



Obr. 1: *Struktura flavanu (2-fenylbenzopyranu, 2-fenylchromanu) [7].*

1.2 Anthokyany

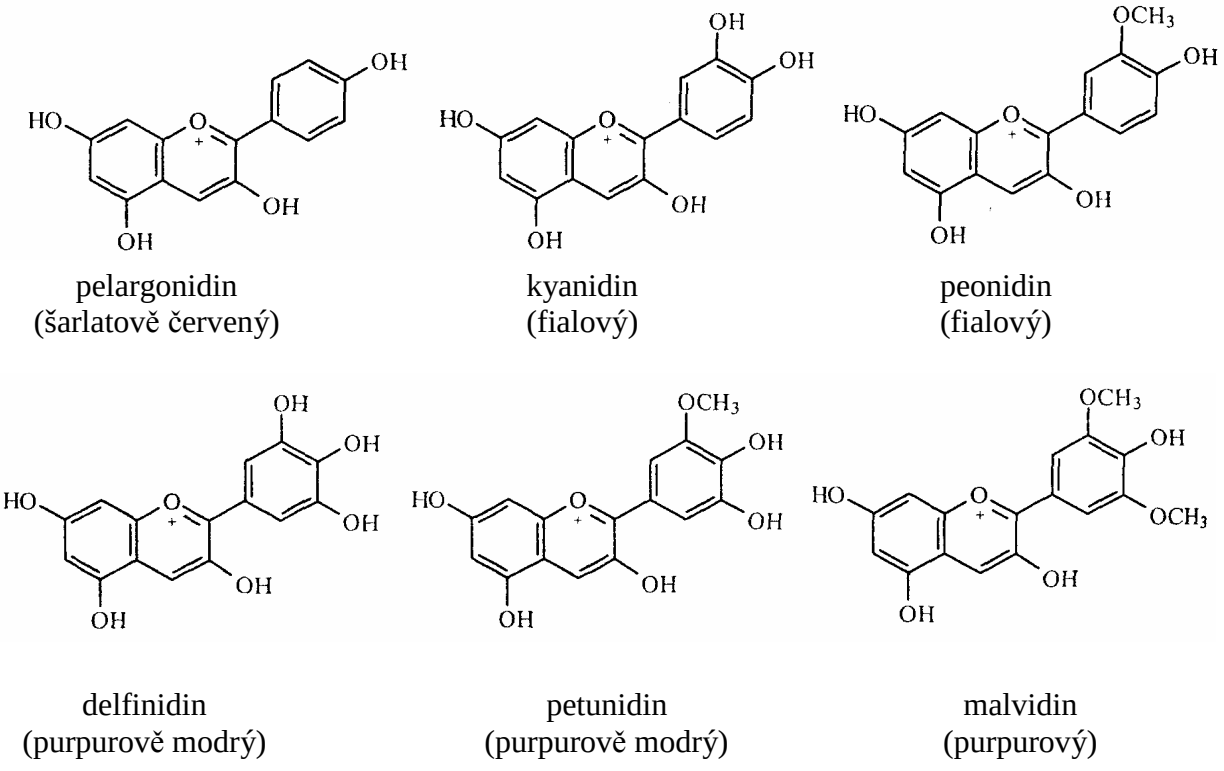
1.2.1 Obecná charakteristika

Anthokyanidiny a jejich glykosidy anthokyany jsou jedny z nejrozšířenějších polyfenolických látek v přírodě a jsou v řadě případů hlavním nositelem barvy

rostlinných materiálů [8]. Označení anthokyany pochází z řeckých slov květ (*anthos*) a modrý (*kyaneos*) [9].

Strukturálně jsou hroznové anthokyany odvozeny z šesti základních anthokyanidinů [8] (obr. 2). Jsou to kyanidin (název podle latinského názvu chrpy, *Cyanus sp.*), pelargonidin (pelargónie, *Pelargonium sp.*), peonidin (pivoňky, *Paeonia sp.*), delfinidin (stračky, *Delphinium sp.*), petunidin (petunie, *Petunia sp.*) a malvidin (slézu, *Malva sp.*) [9].

Anthokyany se v přírodě vyskytují většinou v glykosidické formě, což znamená, že původní barevná složka (aglykon) anthokyanidin je vázaný na cukernou složku [8]. Cukr se nejčastěji na tyto aglykony váže v poloze C-3 nebo C-5, ve výjimečných případech i v poloze C-7. Jsou to především *D*-glukosa, *D*-galaktosa, *L*-rhamnosa, *L*-arabinosa, rutinosa a soforosa. V poloze C-5 je vždy vázána *D*-glukosa. Cukry, především v poloze C-3, mohou být často acylovány deriváty kyseliny skořicové, nejčastěji však *p*-kumarovou, kávovou a ferulovou kyselinou [8].



Obr. 2: *Základní anthokyanidiny [9].*

1.2.2 Výskyt anthokyanových barviv

Anthokyany jsou lokalizovány v buněčných vakuolách. Hlavními zdroji využívanými jako potraviny jsou plody rostlin čeledi révovitých (*Vitaceae*, hrozny vinné révy) a růžovitých (*Rosaceae*, třešně, švestky, maliny, jahody, ostružiny aj.). Další potravinářsky významné rostliny obsahující anthokyanová barviva patří do čeledi lilkovitých (*Solanaceae*, lilek, odrůdy brambor s červenou slupkou),

lomikamenovitých (*Saxifragaceae*, červený a černý rybíz, červené odrůdy angreštu), vřesovcovitých (*Ericaceae*, borůvka, brusinka), olivovitých (*Oleaceae*, oliva) a brukvovitých (*Brassicaceae*, červené zelí, ředkvičky) aj.[9].

Evropské odrůdy vinné révy (*Vitis vinifera*) obsahují především 3-monoglykosidy různých aglykonů. Převládajícím pigmentem je malvidin-3-β-*D*-glukopyranosid, dříve nazývaný oenin [9].

Většina odrůd hroznů na výrobu červených vín má barvivo ve slupkách, jen některé odrůdy a hybridy mají barvivo i v dužnině. Barvivo se tvoří ve slupkách účinkem světla a nevniká do bobule z listů jako cukr. U druhů se zbarvenou dužninou vniká barvivo z listů do bobulí [8].

Zbarvení různých odrůd hroznů závisí na množství barviva ve slupkách, obsahu kyselin (pH) v bobulích a přítomnosti minerálních látek (např. Fe, Al, Mg, aj.) [10]. Z kyselejších hroznů se převážně vyrábějí jasně červená vína, zatímco z málo kyselých bobulí je víno tmavě červené až modré [11]. Hrozny mohou být v různých odstínech oranžové, růžové, červené, fialové a modré. Odstín barvy závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin ve struktuře anthokyanu, na přítomnosti komplexotvorných kovů a cukerných složek. Anthokyany jsou rozpustné ve vodě a alkoholu, nerozpustné jsou v chloroformu a etheru [7].

1.2.3 Biologická aktivita anthokyanů

Anthokyany snižují permeabilitu buněčných membrán v kapilárách, čímž zabraňují vzniku edémů a urychlují tak hojení ran. Působí preventivně proti ateroskleróze. Ovlivňují lipidový metabolismus a chrání pacienty s ischemickou chorobou srdeční před ataky anginy pectoris. Působí protiulcerózně a posilují ochranné mechanismy žaludeční sliznice. Významné použití mají i v oftalmologii, kde zlepšují funkci mikrocévního systému oka. Anthokyany také podporují adaptaci na šero, protože stimulují regeneraci rodopsinu (pigmentu reagujícího na světlo) a upravují enzymové paramenty, které jsou spojeny s poškozením sítnice. V neposlední řadě mají antioxidační účinky, čímž chrání před účinkem volných radikálů [7].

1.2.4 Využití v potravinářství a izolace anthokyanů

Anthokyany izolované z přírodních zdrojů se používají, jako potravinářská barviva (E134). Nevýhodou však je, že svou intenzivní barvu mají v prostředí o pH < 3,5, takže jsou vhodné jen pro kyselé potraviny [9].

Nejčastěji se k barvení potravin používají anthokyanová barviva získávaná z hroznů révy vinné (slupek či sedimentů šťáv), jejichž obsah anthokyanů je 0,3−7,5 g/kg. Bohatým zdrojem jsou také plody bezu černého nazývané bezinky (2−10 g/kg), hlávky červeného zelí (0,7−0,9 g/kg), květy ibišku (15 g/kg v sušině) aj. [9].

Mezi hlavní anthokyany identifikované ve slupkách *Vitis Vinifera* patří 3-*O*-glukosidy a 3-*O*-acetyl glukosidy delfinidinu, kyanidinu, petunidinu, peonidinu

a malvidinu [12−14]. Během zpracování vína se vyextrahuje 30–40 % polyfenolů (převážně anthokyanů) obsažených v hroznových bobulích [12].

Primárním zájmem je najít vhodný systém pro rychlou a účinnou extrakci anthokyanů, jakožto velice reaktivních látek, citlivých na změny pH [15, 16]. Tradičně se používala macerace v organických rozpouštědlech [2, 17] nebo okyselených vodných roztocích organických rozpouštědel [15, 18], pak také Soxhletova extrakce [19], superkritická fluidní extrakce s CO_2 [19] a extrakce za vysokého tlaku a teploty s okyselenou vodou, vodou s přídavkem SO_2 a s okyselenými organickými rozpouštědly [1, 12, 20]. Na separaci a kvantifikaci anthokyanových barviv se nejčastěji používá HPLC-DAD s využitím C_{18} kolony [1, 2, 21−27] a gradientovou elucí. Vzrůstající pozornost je v posledních letech zaměřena na polyfenoly vína a hroznů, vzhledem k jejich antioxidačním a radikál-zhášejícím schopnostem. Několik studií se zabývá antioxidačními vlastnostmi vína a jeho bioproduktů (matoliny, dužnina, semena, drť a třapiny) [28–32]. Většina metod používaných na hodnocení antioxidačních vlastností je založena na schopnosti zhášet volné radikály, nejčastěji $^{\bullet}$DPPH a $ABTS^{\bullet+}$ což může být sledováno buď UV/VIS spektrofotometrem [1, 15, 16, 18, 20, 28–30, 33–36] nebo přímým měřením EPR spektrometrem [34–37]. Další možností na měření antioxidační aktivity je nepřímá metoda EPR s využitím spinových lapačů, která byla například použita ke studiu aktivity a termální stability antioxidantů ve vzorcích zeleného, černého, ovocného čaje, olivového oleje, vína a piva [5, 36–41].

2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo komplexně charakterizovat extrakty z hroznových bobulí červených odrůd *Vitis vinifera* (Alibernet a Svatovavřinecké) z vinařské oblasti Morava, připravených extrakcí rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku (PFE) a extrakcí stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE) do methanolu, ethanolu a do vody, přičemž se vycházelo z různých navážek lyofilizovaných hroznových slupek – 0,5 g, 1,0 g a 1,5 g. Cílem bylo posoudit efektivitu a vliv podmínek extrakce – hmotnost navážky, teplota extrakce, rozpouštědlo, na vybrané charakteristiky daných extraktů.

Na připravených extraktech se proto realizovaly série experimentů, při nichž se:

- testovaly antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti extraktů využitím elektronové paramagnetické rezonance (EPR)
- identifikovala a kvantifikovala barviva jednotlivých extraktů pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s detekcí v diodovém poli (HPLC-DAD)
- charakterizovaly vybrané parametry vzorků pomocí UV/VIS spektroskopie
- stanovily další vybrané fyzikálně-chemické charakteristiky
- experimentálně získané parametry byly korelovány pomocí multivariačních statistických metod

V experimentech se využila technika HPLC-DAD, avšak oproti často používaným kolonám typu C_{18} byla pro lepší separaci použita nově vyvinutá kolona Synergi C_{12} Max-RP (Phenomenex). Jelikož nebyla doposud publikována žádná práce zabývající se separací anthokyanových barviv slupek bobulí vinné révy na kolonách typu C_{12}, jedním z hlavních přínosů této práce bylo ověření dělící schopnosti této kolony. Stejně tak dosud nebylo použito jedinečné spojení technik PFE (PHWE) a EPR.

Získané originální poznatky mohou být efektivně využity při praktické aplikaci do výroby, tj. přípravě potravinových doplňků, koncentrátů, barviv či jiných produktů z vinných slupek určených pro potravinářství.

3. METODICKÉ POSTUPY

3.1. Materiál a úprava vzorků

Byla použita běžná odrůda Svatovavřinecké a tzv. „barvířka“ Alibernet. Barvířka je všeobecné označení modrých odrůd vykazujících velký obsah pigmentu.

Vzorky byly odebírány ve vinařské oblasti Morava, v podoblastech Velké Pavlovice a Mikulov. Odběr probíhal v období vinobraní. Hrozny byly stříhány nůžkami a následně pokládány na vrstvu suchého ledu uvnitř polystyrénového boxu. Množství asi 5 kg hroznů bylo následně zasypáno suchým ledem a box byl uzavřen. Celkem bylo odebráno asi 15 kg hroznů z každé odrůdy. Boxy byly převezeny na FCH VUT v Brně a uloženy do hluboko mrazicího boxu s teplotou -75 °C.

Zmrzlé hrozny byly vloženy do polyethylenového vaku naplněného dusíkem, aby se zabránilo oxidaci barviv. Po rozmražení bobulí byla mechanicky odstraněna slupka od dužniny. Následně probíhala lyofilizace slupek při tlaku 13,3 Pa a teplotě -45 °C. Usušené slupky byly pomocí tekutého dusíku rozdrceny v třecí misce tloučkem. Rozdrcené slupky byly dosoušeny v exsikátoru a před extrakcí byly uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C.

3.2. Extrakce

Byla provedena vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PFE) a extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE). Navážka vzorku slupek (0,5, 1 a 1,5 g pro methanol a vodu; 0,5 a 1 g pro ethanol) byla umístěna spolu s balotinou (inertní materiál) do ocelové patrony (11 ml) a vložena do přístroje. Jednotlivými rozpouštědly (methanol, ethanol, voda) byla extrahována barviva ve vzorku při teplotách 40−120 ºC a tlaku 15 MPa. Extrakční čas byl 3 x 5 min. Proplach dusíkem mezi jednotlivými cykly byl nastaven na 20 sekund a po ukončení extrakce trval 2 minuty. Výsledný extrakt (cca 35 ml) byl ihned ochlazen na 5 °C a uchován v ledničce. Před analýzou byly extrakty přefiltrovány mikrofiltrem (Ø 0,45 µm).

Extrakce byly provedeny na základě optimalizovaných podmínek podle Ju a Howarda [1].

Navíc byly pomocí PHWE vyextrahovány vzorky pro testování degradability polyfenolů - navážka 0,5g vzorku slupek odrůdy Alibernet byla extrahována vodou při teplotách 140, 150, 160, 170 a 180 °C.

3.3. UV/VIS metody a pH

Celkové polyfenoly byly stanovovány modifikovanou Folin-Ciocalteuovou metodou pomocí UV/VIS spektorfotometru [42]. Výsledky byly vyjádřeny jako GAE - gallic acid ekvivalent (mg kyseliny gallové/100 g vzorku).

Byly změřeny trichromatické souřadnice (CIE Lab) pro methanolové a ethanolové extrakty v neupraveném stavu. Z důvodů vážné závady UV-VIS spektrofotometru v průběhu experimentů s vodnými extrakty, toto měření nebylo možné realizovat.

pH všech vzorků v neupravovaném stavu bylo určeno použitím přenosného pH metru pracujícího se skleněnou elektrodou na principu dvojbodové kalibrace (pH=4 a pH=7) s přesností na 1 desetinné místo při teplotě 25 °C.

3.4. HPLC experimenty

K separaci anthokyanových barviv byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf HPLC Spektra SYSTEM. Kolona: Synergi 4 µm C_{12} Max-RP (250 x 4,6 mm). Mobilní fáze A: voda/acetonitril (87:3); mobilní fáze B: voda/acetonitril (40:60), obě okyselené kyselinou mravenčí na pH 1,8. Gradientová eluce: 0–20min. 94/6 (A/B); 20–35min. 80/20; 35–40min. 60/40; 40–45min. 40/60; 45–47 min. 10/90; 47–55min. 94/6. Průtok: 0,5 ml/min, nástřik 20µl, detekce při 520 nm.

Barviva byla identifikována pomocí retenčních časů anthokyanů směsného standardu, který obsahoval 3-*O*-*β*-glukopyranosidy šesti základních anthokyanidinů. Kvantifikace proběhla metodou vnitřní standardizace pomocí Brilantní modři.

3.5. EPR experimenty

Všechna měření se uskutečnila v ploché křemenné kyvetě s vnitřním objemem 500 µl, vhodné pro EPR měření polárních roztoků. Kyveta byla umístěna do dutiny EPR spektrometru a po nastavení parametrů měření se přesně v čase 3 min po přídavku volného radikálu resp. H_2O_2 do systému sledoval časový vývoj 10 EPR spekter během 15 minut ($^{\bullet}$DPPH, $ABTS^{\bullet+}$) resp. 30 minut ($DMPO/Fe^{2+}/H_2O_2$). Každé EPR spektrum představuje akumulaci (průměr) 10 individuálních scanů.

Při měření všech vzorků byla použita tatáž kyveta, přičemž se s ní při vkládání do dutiny spektrometru manipulovalo vždy stejným způsobem, aby byla zajištěna reprodukovatelnost měření. Nastavení a odezva spektrometru byla denně před měřením kontrolovaná pomocí referenčních měření signálů tuhých standardů 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil ($^{\bullet}$DPPH) a strong pitch, oba od firmy Bruker.

Typické parametry EPR spektrometru:
- střed pole - central field (CF): 346 mT - 348 mT
- šířka pole - sweep width (SW): 10 mT ($ABTS^{\bullet+}$, DPPH); 9 mT (DMPO)
- modulace - (Modulation Amplitude): 0.05 mT
- zesílení - (Receiver gain): 3.56×10^3
- výkon mikrovlnného zdroje: 6 mW
- frekvencie mikrovlnného záření: ≈ 9.71 GHz

Měření byla provedena v automatickém režimu se začátkem 3 min po smíchání reaktantů s následujícími parametry:
- časový rozdíl mezi spektry: $\Delta t \approx 1.5$ min (DMPO, 30 min)
- časová konstanta (t.c.): 10.24 ms
- délka 1 scanu: 2.62 s (DMPO, 5.24 s)
- počet scanů (NS): 30
- počet snímaných spekter: 10

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Postupně budou uvedeny a popsány výsledky všech získaných charakteristik extraktů z hroznových bobulí. Základní měřené charakteristiky:

1) Vliv podmínek extrakce na pH.
2) Vliv podmínek extrakce na celkový obsah polyfenolických látek.
3) Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky a další parametry extraktů.
4) Stanovení anthokyanového profilu extraktů pomocí HPLC.
5) Stanovení radikál-zhášejících vlastností pomocí $ABTS^{\bullet+}$.
6) Stanovení radikál-zhášejících vlastností pomocí $^{\bullet}$DPPH.
7) Určení antioxidační kapacity vzorků v systému DMPO/Fe^{2+}/H_2O_2.

Všechny kapitoly mají tři části podle použitého rozpouštědla - methanol, ethanol a voda.

4.1 Vliv podmínek extrakce na pH

Methanol **-** všechny extrakty jsou mírně kyselé a rozsah pH je úzký 5,5–6, což při zohlednění chyby přístroje naznačuje prakticky zanedbatelný rozdíl. Hodnota pH methanolu, který sloužil jako reference, byla 6,9.

Ethanol - bez ohlednu na odrůdu se průměrná hodnota pH připravených extraktů pohybuje okolo pH ~ 5,4, čistý ethanol, který byl použit jako reference, má hodnotu pH 6,3.

Voda **-** hodnoty pH obou odrůd se pohybují na úrovni pH ~ 4,3, hodnota pH deionizované vody, která byla použita jako reference byla stanovena na 6,8.

Z výsledků měření vyplývá, že způsob přípravy vzorku (použité rozpouštědlo, navážka vzorku na extrakci) jakožto i samotný průběh má na hodnotu pH jen mírný, ze statistického hlediska zanedbatelný vliv.

4.2 Vliv podmínek extrakce na celkový obsah polyfenolických látek

Dalším významným parametrem, který může ovlivnit antioxidační resp. radikál-zhášející vlastnosti vzorku, je celkový obsah polyfenolických látek. Obsah polyfenolů ve vzorcích extraktů hroznových slupek byl stanovený metodou Folin - Cicolteu. Jako standard byla použita kyselina gallová rozpuštěná ve vodě s různou koncentrací. Kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky. Výsledky jsou udávany jako GAE = Gallic Acid Equivalent (mg kyseliny gallové/100 g vzorku).

Methanol **-** obsah polyfenolů ve vzorcích připravených z odrůdy Svatovařinecké, při teplotě 40 °C, je v rozsahu 40 (0,5g) až 120 (1,5g) mg/100 g; u odrůdy Alibernet, je tento obsah řádově vyšší v porovnání s odrůdou Svatovavřinecké, pohybuje se v intervalu 120 (0,5g) až 360 (1,5g) mg/100 g.

Ve vzorcích odrůdy Svatovavřinecké se ze zvyšující teplotou mírně zvyšuje obsah polyfenolů do teploty 60 °C, pravděpodobně se zlepšuje extraktivita fenolických látek do rozpouštědla. Všeobecně je však pozorován asi 10% pokles extrakce polyfenolů s dalším zvyšováním teploty. Uvedený trend je mnohem výraznější u odrůdy Alibernet - dosahuje přibližně 30%.

Ethanol - absolutní hodnoty koncentrací polyfenolů v ethanolových extraktech jsou v porovnání s methanolovými extrakty nižší, výraznější jsou tyto rozdíly pro odrůdu Alibernet, kde koncentrace dosahuje přibližně 30 %, u odrůdy Svatovavřinecké je koncentrace cca 50 % z jejich koncentrace v methanolových extraktech. Nejvýraznější rozdíl oproti methanolovým extraktům pozorujeme při závislosti koncentrace polyfenolů na teplotě extrakce. Pro obě odrůdy a obě navážky hroznových slupek pozorujeme nárust koncentrace polyfenolů s teplotou.

Voda - ve vodném prostředí se potvrdil vyšší, téměř dvojnásobný obsah polyfenolů v extraktech odrůdy Alibernet proti odrůdě Svatovavřinecké. Koncentrace polyfenolů ve vodných extraktech odrůdy Svatovavřinecké dosahuje hodnoty porovnatelné s extrakty v methanolu, zatímco jejich koncentrace v odrůdě Alibernet je o něco nižší, avšak u obou odrůd jsou tyto hodnoty vyšší než při extraktech do ethanolu. Vliv teploty extrakce na obsah polyfenolů vykazuje podobný trend jako ethanolové extrakty - s rostoucí teplotou při obou navážkách hroznových slupek pozorujeme pro obě odrůdy nárust koncentrace polyfenolů.

4.3 Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky a další parametry extraktů

Barevné koordináty L*, a*, b* byly naměřené pomocí UV/VIS spektrofotometru použitím tří různých zdrojů osvětlení - Illuminantu A, C, a D65. Vzhledem k velkému počtu parametrů majících vliv na vlastnosti extraktů, byla získaná data statisticky zpracována metodami multivariační statistiky s cílem sledování vzájemného vztahu (korelace) jednotlivých experimentálních parametrů a jejich vliv na vlastnosti extraktů.

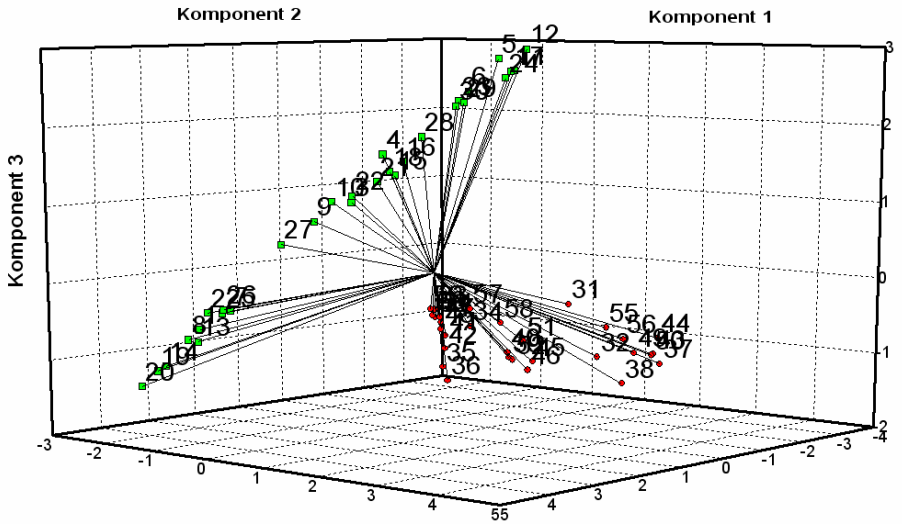
Methanol - kanonická diskriminační analýza poskytla prakticky 100% diskriminaci jednotlivých odrůd. Jako diskriminační porměnné byly použity: L*-IllA, L*-IllC, L*-IllD65, a*-IllA, a*-IllC, a*-IllD65, b*-IllA, b*-IllB, b*-IllD65, obsah polyfenolů a pH.

Vizualizace dat pomocí multivariační metody hlavních komponent (tzv. Principal component analysis), obr. 3, velmi jasně diferencuje sledované odrůdy na základě použitých charakteristik.

Diskriminace vzorků podle navážky je 100% u obou odrůd. Při diskriminaci vzorků podle extrakční teploty bylo u odrůdy Svatovařinecké možné správně klasifikovat 77 % vorků, u odrůdy Alibernet 90 %.

Vzájemná korelace trichromatických parametrů a navážky, teploty extrakce, pH resp. obsahu polyfenolů byla stanovená pomocí Pearsonovy korelační metody. Z údajů vyplývá, že existuje výrazná korelace trichromatických parametrů s hmotností

navážky vzorku a logicky i s obsahem polyfenolů u obou odrůd, korelace trichromatických parametrů s pH je málo významná (přibližně 65 % pro odrůdu Svatovavřinecké a Illuminant A, resp. 60 % pro odrůdu Alibernet). Zajímavá je prakticky zanedbatelná korelace trichromatických souřadnic a teploty, která se bez ohledu na použitý zdroj světla pohybuje na úrovni do 10 % pro odrůdu Svatovavřinecké, resp. do 20 % pro odrůdu Alibernet. Z toho vyplývá, že barva extraktů se s rostoucí teplotou prakticky nemění.



Obr. 3: *Klasifikace – odlišení ethanolových extraktů obou odrůd pomocí mtody tzv. hlavních komponent (Principal component analysis). Jako proměnné byly použité: L*-IllA, L*-IllC, L*-IllD65, a*-IllA, a*-IllC, a*-IllD65, b*.IllA, b*-IllB, b*-IllD65, obsah polyfenolů a pH.*

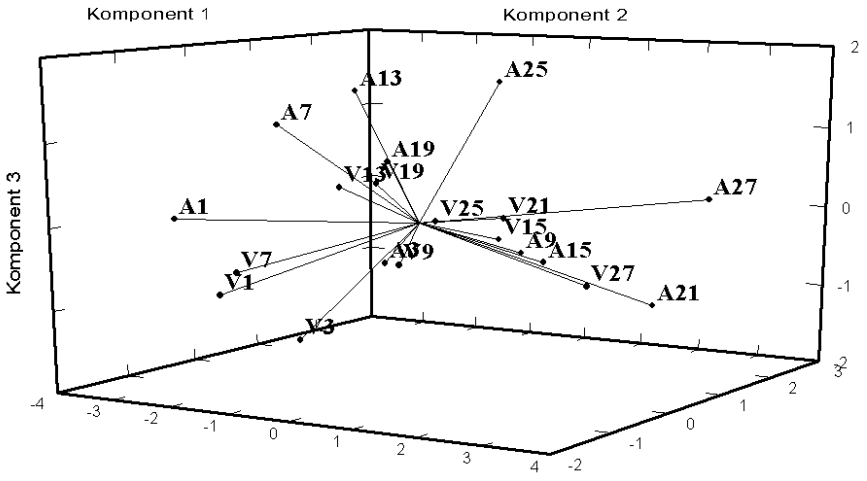
Ethanol **-** V rámci kanonické diskriminační analýzy byly pro obě odrůdy provedeny klasifikace vzorků podle navážky vzorku použité na extrakci a podle extrakční teploty. U obou odrůd bylo dosaženo 100% správné klasifikace vzorků podle navážky.

Kanonická diskriminační analýza podle teploty extrakce se realizovala pro obě odrůdy s tím, že se počet parametrů snížil o jeden - z analýzy byla vyloučena navážka vzorku. V předchozích experimentech bylo jednoznačně prokázáno, že hmotnost navážky je automatický diskriminátor, všechny sledované veličiny (s výjimkou pro pH) jsou extenzivní. Pro odrůdu Svatovavřinecké byla dosažena 90% korektní klasifikace extraktů s jedním nesprávně klasifikovaným extraktem. V případě odrůdy Alibernet bylo dosaženo 60% správnosti klasifikace vzorků.

Kanonická diskriminační analýza obou odrůd podle všech sledovaných proměnných potvrdila 100% korektní odlišení obou odrůd. Metodou hlavních komponent (Obr. 4) se podařilo jen částečně odlišit obě odrůdy, podobně jako při analýze individuálních odrůd se klíčovými parametry ukázaly být navážka vzorku a teplota extrakce, což je v plném souladu s očekáváním. Podobně jako v případě methanolových extraktů byly hodnoty barevných souřadnic (naměřené pro tři různé zdroje osvětlení) korelovány s ostatními sledovanými parametry (navážka vzorku, teplota extrakce, pH, obsah polyfenolů). Z hodnoty Pearsonových korelačních matic

vyplývá, že nejvýraznější korelace byla dosažena v případě extraktů obou odrůd mezi sytostí barvy (L*) a obsahem polyfenolů (o něco nižší u odrůdy Svatovavřinecké). Absolutní hodnoty korelačních koeficientů jsou v porovnání s methanolovými extrakty nižší.

V souladu s očekáváním byla dosažena vysoká korelace mezi hmotností vzorku použitého na extrakci a příspěvkem červené barvy (a*) - v případě odrůdy Svatovavřinecké, zatímco v případě odrůdy Alibernet je výraznější korelace mezi hmotností a podílem modré barvy (b*). Uvedené rozdíly souvisí s barevnými charakteristikami jednotlivých odrůd, resp. jsou ovlivněné rozdílnou skladbou jedn. složek extraktů. Pro obě odrůdy byla pozorována velmi nízká korelace barevných souřadnic s teplotou extrakce, podobně jako v případě methanolových extraktů, čímž se opět potvrdilo, že barva extraktů se s rostoucí teplotou prakticky nemění, resp. mění jen zanedbatelně.



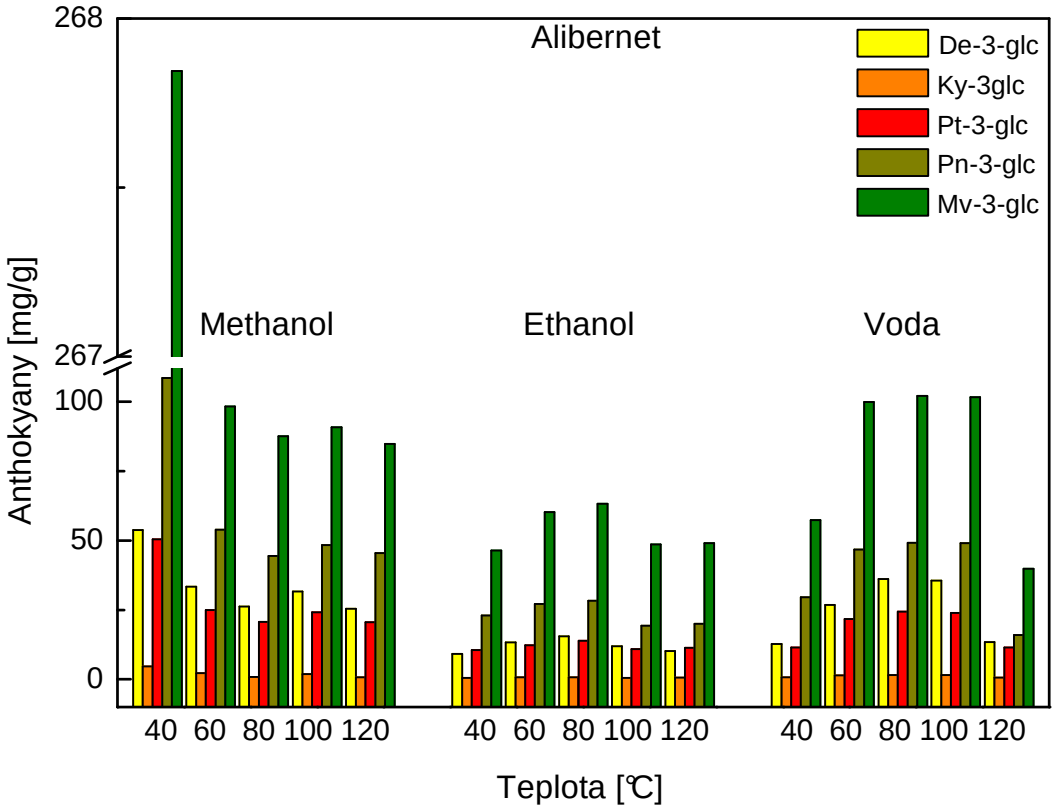
Obr. 4: *Analýza ethanolových extraktů pomocí metody hlavních komponent. K výpočtu komponent byly použity jako proměnné hodnoty navážky, teploty extrakce, pH, obsah polyfenolů a hodnoty L*, a*, b* (Illuminant A).*

Voda - barevné souřadnice pro vodné extrakty nebylo možné stanovit z důvodu vážné poruchy UV/VIS spektrofotometru. Z tohoto důvodu také nebylo možné uskutečnit analýzu hlavních komponent ani kánonickou diskriminační analýzu a ani vypočítat hodnoty vzájemných korelačních koeficientů.

Korelační koeficienty pro vzájemný vztah navážky vzorku, obsahu polyfenolů a teploty extrakce vykazují ze statistického hlediska významnou korelaci mezi navážkou vzorku a obsahem polyfenolů pro obě odrůdy.

4.4 Stanovení anthokyanového profilu extraktů pomocí HPLC

Bylo zjištěno, že nejúčinnějším rozpouštědlem pro extrakci anthokyanů z hroznových slupek, je methanol. Při jeho použití byla pomocí HPLC zaznamenána největší odezva pro všechna detekovaná barviva. Při vyšších teplotách je účinnost methanolu srovnatelná s účinností vody (obr. 5, 6) a to u obou odrůd.



***Obr. 5**: Obsah jednotlivých anthokyanů v extraktech hroznových slupek u odrůdy Alibernet, stanovený pro jednotlivá rozpouštědla a teploty.*

Při PFE extrakci methanolem byl zaznamenán statisticky významný pokles koncentrace barviv pro teploty 60−120 °C oproti teplotě 40 °C. Z tohoto pohledu se jeví teplota 40 °C jako nejúčinnější pro extrakci anthokyanových barviv z vinných slupek pomocí methanolu.

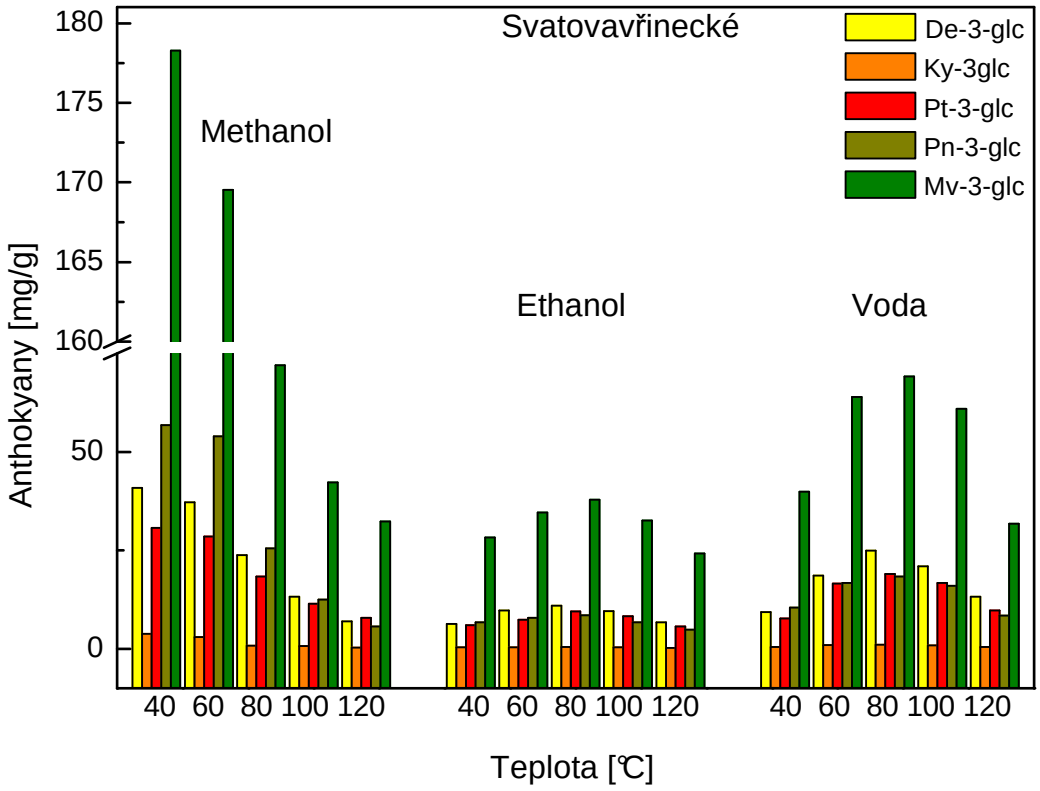
Mnohem méně účinným extrakčním činidlem je ethanol. Jako statisticky významný se jeví pokles koncentrace barviv pro teploty 40, 100 a 120 °C oproti teplotám 60 a 80 °C.

V případě použití vody jako extrakčního činidla se jako statisticky významný ukázal pokles při teplotách 40 a 120 °C, největší výtěžek byl v tomto případě získán při extrakční teplotě 80 °C. Při teplotách 60, 80 a 100 °C je účinnost vody srovnatelná s účinnosti methanolu jako extrakčního činidla. Odrůda Alibernet měla v porovnání s odrůdou Svatovavřinecké při PFE extrakci v mnoha případech 3krát vyšší obsah anthokyanových barviv (obr. 5, 6). Z tohoto hlediska jsou odrůdy jako Alibernet (tzv. barvířky) pro izolaci barviv z vinných slupek vhodnější.

Pro obě odrůdy byl jako nejvhodnější extrakční rozpouštědlo stanoven methanol, ikdyž z hlediska využití v potravinářství by bylo vhodnější použití vody při vyšších teplotách, kde je účinnost srovnatelná s methanolem. Nejúčinnější teplota pro PFE extrakci však nebyla závislá jen na odrůdě, ale hlavně na použitém rozpouštědle. Teplotní profily pro jednotlivá rozpouštědla jsou u obou odrůd velmi podobné.

Pro úplnost experimentů byly anthokyany stanoveny také ve víně připraveném z příslušných odrůd. Víno z odrůdy Alibernet obsahovalo asi o třetinu větší

množství anthokyanových barviv, nežli odrůda Svatovavřinecké, u které navíc nebyl kyanidin-3-*O*-glukosid zastoupen vůbec. (tab. 1).



***Obr. 6**: Obsah jednotlivých anthokyanů v extraktech hroznových slupek u odrůdy Svatovavřinecké, stanovený pro jednotlivá rozpouštědla a teploty.*

***Tab. 1:** Obsah anthokyanů ve vzorku vína - odrůda Alibernet a Svatovavřinecké*

odrůda	**Anthokyany [g/l]**				
	De-3-glc	**Ky-3-glc**	**Pt-3-glc**	**Pn-3-glc**	**Mv-3-glc**
Alibernet	0.3794	0.0038	0.4090	0.7644	2.8368
Svatovavřinecké	0.1856	-	0.2516	0.2190	1.8768

4.5 Stanovení radikál-zhášejících vlastností pomocí ABTS$^{\bullet+}$

Jako reference byla použita deionizovaná voda. EPR spektrum ABTS$^{\bullet+}$ tvoří za použitých experimentálních podmínek (velikost modulační amplitudy 0,05 mT) singlet s položířkou čáry, ΔB_{pp}~ 1.2 mT, g=2.0036. Byl měřen soubor deseti spekter se začátkem ve třetí minutě po přidání roztoku ABTS$^{\bullet+}$ do příslušného systému.

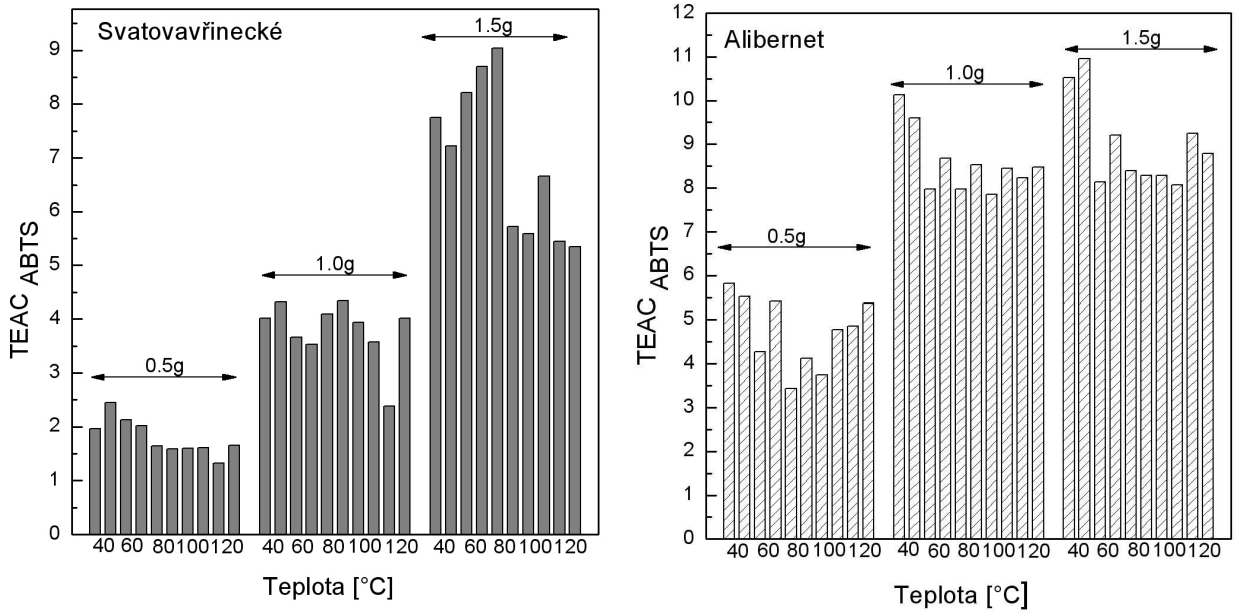
Methanol - vzorky odrůdy Svatovavřinecké připravené z navážky 1,5 g vykazují při teplotách 40, 60 a 80 °C velmi dobré radikál-zhášející vlastnosti - prakticky okamžitě po přidání do systému klesá koncentrace ABTS$^{\bullet+}$ v závislosti na schopnosti těchto extraktů terminovat uvedený kation-radikál, což se projeví postupným poklesem intenzity.

Po přidání extraktů připravených při teplotách 100 a 120 °C pozorujeme už jen mírný pokles intenzity spektra, z čehož vyplývá, že radikál-zhášející aktivita těchto

vzorků je horší. Z toho je možné udělat jednoznačný závěr o negativním vlivu teploty extrakce na antioxidační vlastnosti sledovaných vzorků.

Podobný trend byl nalezen i u vzorků odrůdy Alibernet, ale změny radikál-zhášející aktivity vzorků s rostoucí teplotou nejsou tolik markantní jako u odrůdy Svatovavřinecké. Uvedené rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny různým kvalitativním a kvantitativním zastoupením polyfenolů v jednotlivých odrůdách resp. extraktech z nich.

Časové závislosti EPR spekter byly matematicky zpracovány s cílem kvantifikovat radikál-zhášející vlastnosti jednotlivých vzorků. Kvantifikace radikál-zhášející aktivity vzorků byla u obou odrůd realizována několika způsoby. Nejlépe se osvědčil přepočet na TEAC hodnoty. TEAC, neboli přepočet na Trolox, byl realizován pro hodnoty koncentrace $ABTS^{\bullet+}$ v čase t = 10,5 min. od jeho přídavku do systému. Výhodou tohoto přepočtu je, že zahrnuje jak objemové poměry, tak zředění. Jak je zřejmé z obr. 7, průměrné hodnoty TEAC se ve všech vzorcích odrůdy Svatovavřinecké pohybují v rozsahu 1,3–2,4 (navážka 0,5 g), 2,5–4,3 (navážka 1,0 g) a 5,3–9,0 (navážka 1,5 g), přičemž je zřejmé mírné zhoršení antioxidační kapacity s rostoucí teplotou extrakce, obzvlášť zřetelné u vzorků připravených z vyšších navážek. Uvedený trend je zachován i u odrůdy Alibernet, kde jsou však hodnoty v porovnání se Svatovavřineckou odrůdou vyšší - 3,4–5,8 (navážka 0,5 g) a 7,8–10,9 (navážka 1,0 a 1,5 g).



Obr. 7: *Hodnoty Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) stanovené pro vzorky methanolových extraktů, odrůd Svatovavřinecké a Alibernet.*

Ethanol - identické experimenty se uskutečnily i s ethanolovými extrakty obou odrůd. Jako reference byla místo vzorku extraktu do systému opětovně přidána deionizovaná voda.

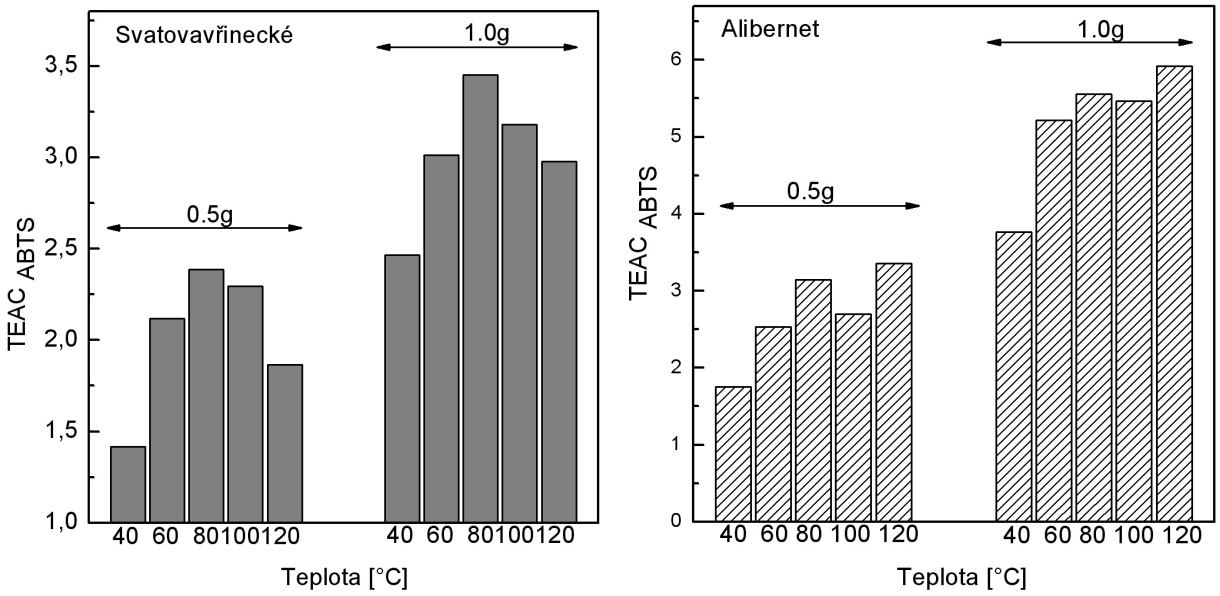
Je zajímavé, že ve srovnání s methanolovými extrakty je vliv teploty extrakce na chování jednotlivých odrůd prakticky stejný, jen u odrůdy Svatovavřinecké je

v případě methanolových extraktů výraznější vliv přídavku extraktu na přítomnost $ABTS^{\bullet+}$.

Po přidání extraktů slupek odrůdy Svatovavřinecké připravených při teplotách 40–80 °C pozorujeme mírný pokles intenzity spektra s rostoucí teplotou extrakce, z čehož vyplývá, že radikál-zhášející aktivita těchto vzorků se vlivem teploty extrakce mírně zlepšuje, zatímco při vyšších teplotách extrakce (100–120 °C) se zhoršuje.

Na obr. 8 jsou znázorněny hodnoty TEAC stanovené pro obě odrůdy. Pro odrůdu Svatovavřinecké se pohybují v rozmezí 1,4–2,3 (navážka 0,5 g), což je hodnota porovnatelná s methanolovými extrakty, resp. v rozmezí 2,5–3,6 (navážka 1,0 g) což jsou hodnoty v porovnání s methanolem o něco nižší. Hodnoty TEAC ukazují na mírné zhoršení antioxidační kapacity s rostoucí teplotou extrakce, ke kterému dochází při teplotě nad 80°C.

Hodnoty TEAC jsou pro odrůdu Alibernet (obr. 8) podle očekávání vyšší - 1,7–3,5 (navážka 0,5 g) a 3,7–5,9 (navážka 1,0 g). Tyto hodnoty jsou přibližně jen 30–40% v porovnání s TEAC hodnotami extraktů této odrůdy v methanolu. Závislost TEAC hodnot na teplotě extrakce potvrzuje zlepšování antioxidační aktivity jednotlivých extraktů v celém teplotním intervalu.



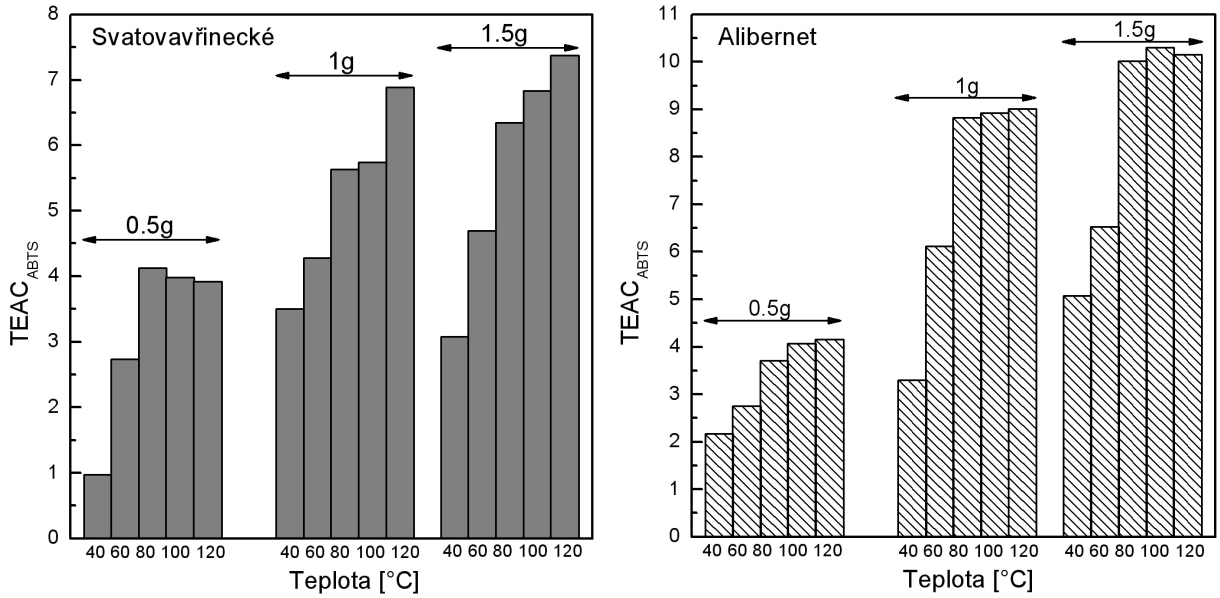
Obr. 8: *Hodnoty Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) stanovené pro vzorky ethanolových extraktů, odrůd Svatovavřinecké a Alibernet.*

Voda - přídavek extraktů obou odrůd vede k terminaci $ABTS^{\bullet+}$ složkami extraktů podobně jako v případě methanolových a ethanolových extraktů, ve vodných extraktech je však nejzřetelnější závislost radikál-zhášející aktivity na teplotě extrakce.

Ze závislosti integrálu naměřených EPR spekter na čase je možné konstatovat, obdobně jako u předchozích dvou experimentálních systému, že výraznější antioxidační vlastnosti mají extrakty odrůdy Alibernet.

Po vyhodnocení radikál-zhášející aktivity pomocí TEAC (obr. 9) je zřejmý jednoznačně pozitivní vliv teploty extrakce, jako i navážky vzorku použitého na extrakci. Pro vyšší navážky (1,0 a 1,5 g) bylo pozorováno určité „nasycení“ antioxidační aktivity. Průměrné hodnoty TEAC se pro navážku 0,5 g pohybovaly v intervalu 0,9–4,1 (Svatovavřinecké), resp. 2,1–4,2 (Alibernet); pro navážku 1,0 g v intervalu 3,5–5,7 (Svatovavřinecké), resp. 3,3–9,0 (Alibernet) a pro navážku 1,5 g v intervalu 3,0–6,8 (Svatovavřinecké), resp. 5,1–10,3 (Alibernet). Tím se opět potvrdila větší radikál-zhášející aktivita odrůdy Alibernet.

Hodnoty TEAC jsou v dobrém souladu s prací Pellegrini a kol. [43], ve které byly porovnány hodnoty antioxidační kapacity třemi různými způsoby pro zeleninu, ovoce, ovocné a alkoholicé nápoje. Pro vzorky různých vín autoři udávají $TEAC_{ABTS}$ hodnoty 1,6–12,0 [43].



Obr. 9: *Hodnoty Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) stanovené pro vzorky vodných extraktů, odrůd Svatovavřinecké a Alibernet.*

Vliv rozpouštědla na hodnoty TEAC kopíruje trend HPLC profilu a hodot GAE - nejvyšší průměrné hodnoty byly stanoveny pro extrakty v methanolu, následované vodou a nakonec ethanolem.

4.6 Stanovení radikál-zhášejících vlastností pomocí ˙DPPH

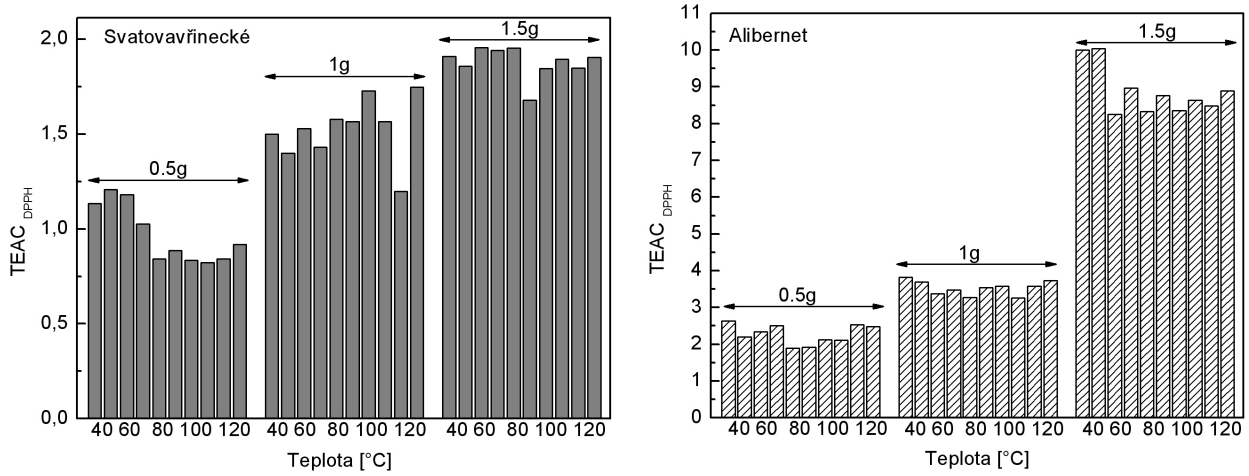
Podobně jako v případě $ABTS^{\bullet+}$ byl měřen soubor 10 spekter se začátkem ve třetí minutě po přidání roztoku ˙DPPH do systému. Jako referenční systém bylo použito vždy extrakční činidlo (methanol, ethanol, voda). EPR spektrum roztoku ˙DPPH tvoří za použitých experimentálních podmínek (velikost modulační amplitudy 0,05 mT, methanol/ethanol) kvintet pocházející od dvou přibližně ekvivalentních atomů dusíku charakterizovaný konstantami hyperjemné interakce a_{N1} = 0.88 mT, a_{N2} = 0.874 mT, g=2.0036.

Methanol - v případě obou odrůd, podobně jako při systému s $ABTS^{\bullet+}$, pozorujeme výrazné radikál-zhášející vlastnosti, které se v případě odrůdy Svatovavřinecké při teplotě extrakce nad 80 °C jen mírně zhoršují. U odrůdy Alibernet dochází ke zhoršení radikál-zhášejících vlastností už při teplotě 60°C. Vliv navážky opět potvrdil, že navážka je přímo úměrná odezvě systému, a to u obou odrůd.

Analogickým postupem jako při $ABTS^{\bullet+}$ byl realizován výpočet $TEAC_{DPPH}$ hodnot. Stechiometrický poměr mezi ˙DPPH a Troloxem je stejný - 2:1. I tímto postupem se jednoznačně potvrdila vyšší antioxidační kapacita vzorků odrůdy Alibernet.

Absolutní hodnoty TEAC (obr. 10) jsou pro vzorky odrůdy Alibernet připravené při teplotě 40°C a navážky 0,5 a 1,0 g v porovnání s $ABTS^{\bullet+}$ přibližně o 20 % nižší. U vzorků připravovaných z navážky 1,5 g je rozdíl v hodnotě TEAC na úrovni 5 %, což je s ohledem na chybu zanedbatelné.

Všechny vzorky odrůdy Svatovavřinecké vykazují v systému s ˙DPPH výrazně nižší hodnoty TEAC v porovnání s $ABTS^{\bullet+}$ (v průměru o 80 %). V případě ˙DPPH je zřetelně viditelný výrazný nepoměr TEAC hodnot obou odrůd. Tepelná závislost hodnot TEAC stanovených pro ˙DPPH pro obě odrůdy je analogická jako pro systém obsahující $ABTS^{\bullet+}$, s tím rozdílem, že změny TEAC pro odrůdu Svatovavřinecké nejsou tak markantní.



Obr. 10: *Hodnoty Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) stanovené pro vzorky vodných extraktů, odrůd Svatovavřinecké a Alibernet.*

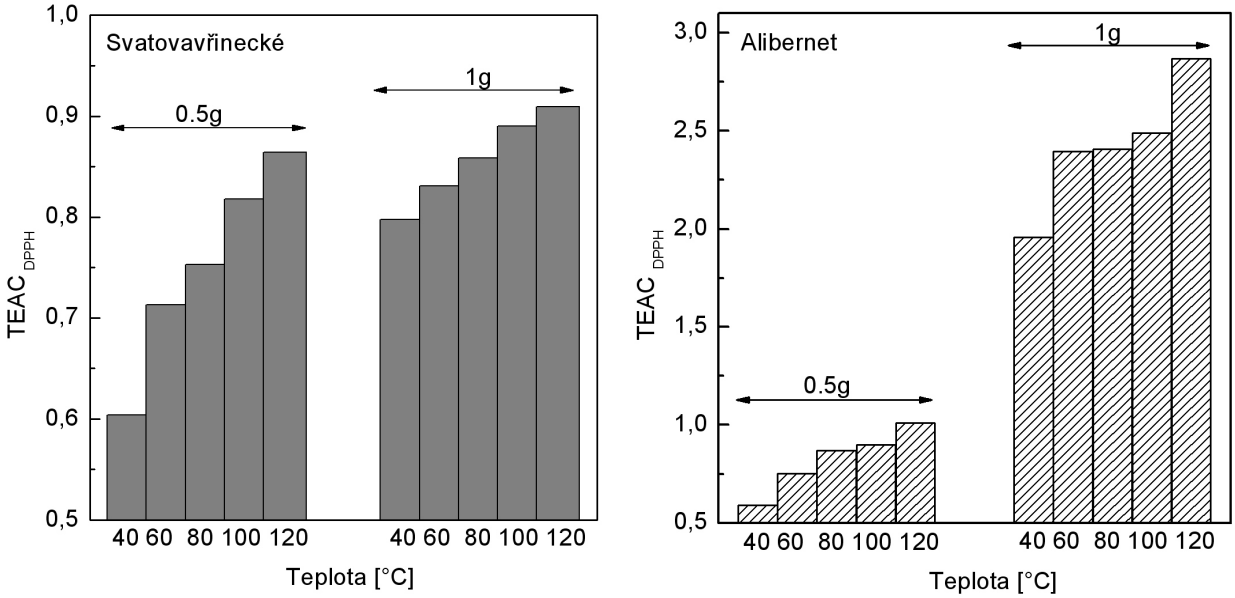
Ethanol - vlivem rostoucí teploty extrakce dochází k mírnému zlepšení schopnosti jednotlivých vzorků terminovat ˙DPPH. Tento trend je opět výraznější pro extrakty odrůdy Alibernet v celém teplotním intervalu, zatímco z průběhu spekter naměřených pro odrůdu Svatovavřinecké zdánlivě vyplývá mírné zhoršení této schopnosti u extraktů připravených při teplotách 80–120 °C.

Závislost TEAC jednotlivých extraktů na teplotě extrakce a na navážce vzorku je znázorněna na obr. 11.

Vypočítané hodnoty TEAC pro spektra naměřená v 10,5 minutě od přidání ˙DPPH do systému potvrzují trend popsaný při závislosti intenzity EPR spektra naměřeného

za identických podmínek. V absolutním vyjádření se hodnoty TEAC extraktů odrůdy Svatovavřinecké pohybují v intervalu 0,6–0,9 (0,5 g), resp. 0,8–0,9 (1,0 g). Pro extrakty odrůdy Alibernet jsou tyto hodnoty v rozsahu 0,6–1,0 (0,5 g), resp. 2,0–2,9 (1,0 g). Opět se potvrdila vyšší antioxidační kapacita vzorků odrůdy Alibernet.

V porovnání s extrakty v methanolu jsou hodnoty TEAC ethanolových extraktů pro obě odrůdy výrazně nižší, dosahují přibližně 30–40 % oproti methanolu. Závislost TEAC na teplotě extrakce potvrzuje i v tomto experimentálním systému zlepšování antioxidační aktivity jednotlivých extraktů s rostoucí teplotou extrakce v celém teplotním intervalu, přičemž tento trend je mnohem výraznější pro extrakty odrůdy Alibernet.



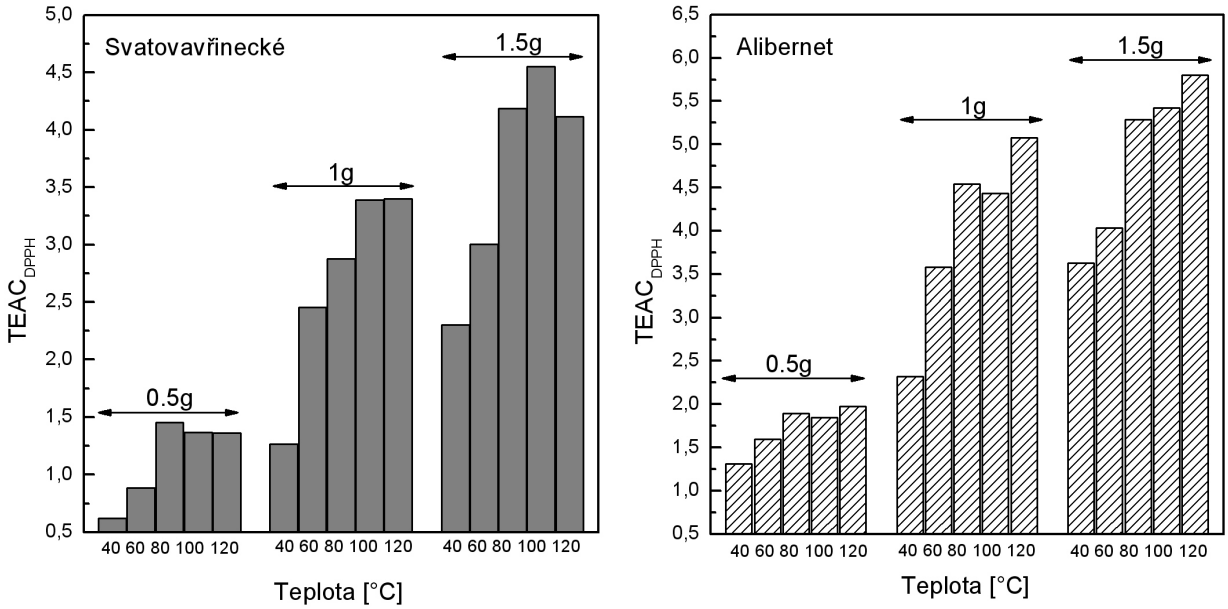
Obr. 11: *Hodnoty Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) stanovené pro vzorky vodných extraktů, odrůd Svatovavřinecké a Alibernet.*

Voda - analogicky byla sledována radikál-zhášející aktivita vůči ˙DPPH i u vzorků extrahovaných vodou. S ohledem na omezenou rozpustnost ˙DPPH ve vodě, byl v tomto experimentálním systému použit roztok ˙DPPH v ethanolu. Jako reference byla místo extraktu vzorku použita deionizovaná voda. Opětovně se potvrdila pozitivní odezva experimentálního systému na navážku vzorku, výrazněji pro extrakty odrůdy Svatovavřinecké.

Hodnoty TEAC vypočítané pro extrakty obou odrůd (obr. 12) plně potvrzují předcházející závěry o vlivu navážky vzorku a teploty extrakce na RSA jednotlivých vzorků. Číselné hodnoty se pohybují v případě odrůdy Svatovavřinecké v intervalu 0,6–1,5 (0,5 g); 1,3–3,4 (1,0 g) a 2,3–4,6 (1,5 g). U odrůdy Alibernet jsou hodnoty TEAC vyšší a dosahují 1,3–2,0 (0,5 g); 2,3–5,1 (1,0 g) a 3,6–5,8 (1,5 g). V porovnání s ethanolovými extrakty jsou uvedené hodnoty vyšší, ale zase nižší než u methanolových extraktů.

Při sledování vlivu rozpouštědla na antioxidační aktivitu extraktů je možno konstatovat, že i v případě ˙DPPH dosažené výsledky korelují s obsahem polyfenolů. Podobný trend byl zaznamenán i v případě testů s $ABTS^{\bullet+}$. Odlišnosti v absolutních

hodnotách $TEAC_{ABTS}$ a $TEAC_{DPPH}$ je možné připsat jednak rozdílům v hodnotách redoxního potenciálu - podle prací [38, 44, 45] je potenciál redukce $^{\bullet}DPPH/DPPH^{-}$ = 0.43 V a $ABTS^{\bullet+}/ABTS$ = 0.68 V [38, 46], stanovený proti standardní vodíkové elektrodě. Redoxní potenciál $^{\bullet}DPPH$ umožňuje jeho oxidační reakce i s látkami s nižším redoxním potenciálem, kdežto potenciál $ABTS^{\bullet+}$ tyto reakce neumožňuje.



Obr. 12: *Hodnoty Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) stanovené pro vzorky vodných extraktů, odrůd Svatovavřinecké a Alibernet.*

Uvedené rozdíly jsou také ovlivněny odlišnou skladbou antioxidantů v jednotlivých odrůdách, jakož i rozdílnými vlastnostmi rozpouštědel, ovlivňujícími extrakci jednotlivých složek.

4.7 Určení antioxidační kapacity vzorků v systému DMPO/Fe^{2+}/H_2O_2

Tento tzv. Fentonovský systém byl zvolený za účelem generování reaktivních, v prvním kroku převážne hydroxylových ($OH^{\bullet}$) radikálů, které jsou následně schopné reagovat přímo s antioxidanty a s dalšími složkami systému a iniciovat tak ve vzorku oxidační stres za tvorby dalších radikálů. Podobně jako v předchozích experimentech byl měřen soubor 10 spekter se začátkem ve třetí minutě po přidání H_2O_2 do systému. Jako referenční systém bylo použito vždy příslušné extrakční činidlo (methanol, ethanol, voda).

Methanol - všechny experimenty byly realizovány při objemovém poměru Fe^{2+}:H_2O_2 = 100:100 µl. Vzhledem k tomu, že iniciátorem tvorby radikálů v systému je peroxid vodíku, se za začátek všech časově-závislých experimentů považoval jako t = 0 - okamžik přidání H_2O_2 do systému.

Byl otestován i vliv rozpouštědla na tvorbu spinových aduktů s DMPO. Z výsledků experimentů vyplývá, že když se jako rozpouštědlo použije voda místo methanolu (adukty $^{\bullet}DMPO–CH_2–OH$), v systému dochází ke generování výlučně

hydroxylových radikálů a EPR spektra tvoří tomu odpovídající spinové adukty •DMPO–OH (a_N=1.49 mT, a_H=1.49 mT, g=2.0059) [47, 48].

Mimo uvedených dvou spinových aduktů se ve spektrech reálných vzorků objevuje ještě málo intenzivní triplet (a_N = 1.65 mT; g = 2.0059), který odpovídá aduktu •DMPO–CX, resp. •DMPO–R jeho přesná struktura není známá. Předpokládá se, že jeho tvorba je důsledkem buď rozkladu samotného spinového lapače, nebo jiné reakce, která v systému může probíhat.

Vzorky obou odrůd mají výrazné antioxidační vlastnosti. Vzorky připravené při teplotě 40 °C v celém časovém intervalu měření vykazují jen zanedbatelný nárust koncentrace spinových aduktů. Z výsledků experimentů je zřejmé, že vzrůstající teplota výrazně snižuje antioxidační schopnosti vzorků obou odrůd. Tento trend je o mnoho výraznější než při testech s použitím $ABTS^{\bullet+}$ nebo •DPPH radikálů - kvalitativním porovnáním průběhu EPR spekter naměřených pro vzorky připravené při různé teplotě extrakce je možné dospět k závěru, že vzorky tepelně namáhané při 120 °C prakticky ztrácejí schopnost terminovat radikály produkované v systému. Intenzita spekter je porovnatelná, v případě odrůdy Alibernet dokonce vyšší, než je intenzita spekter v referenčním systému.

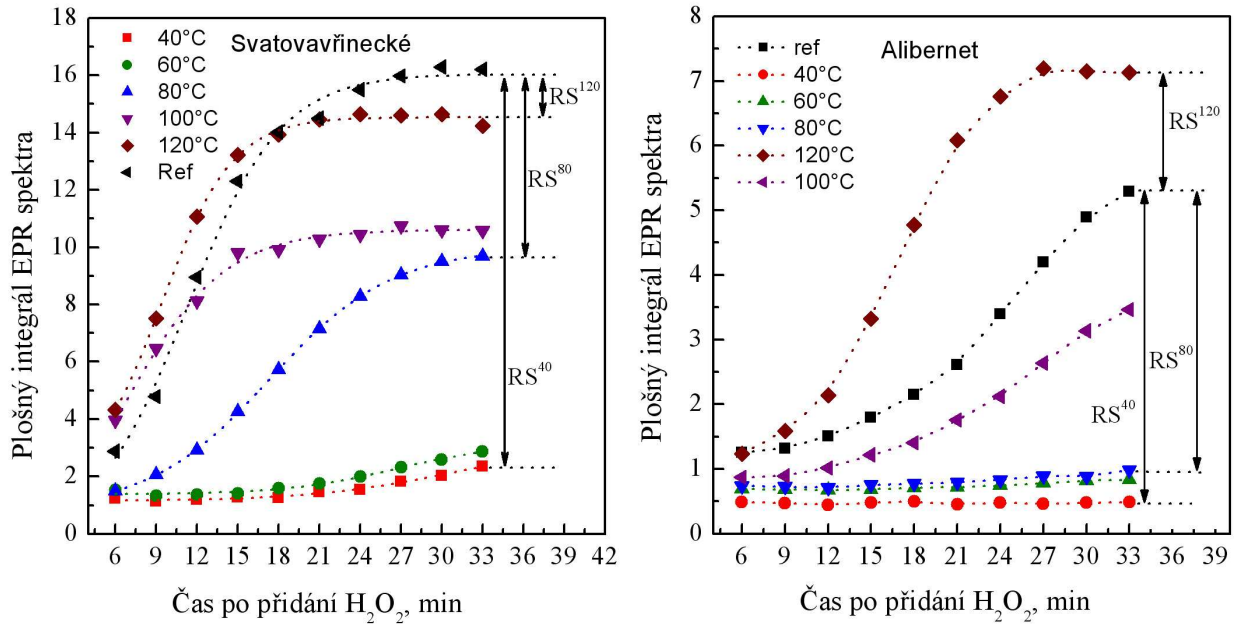
Co se týká časového průběhu EPR spekter naměřeného pro vzorky odrůdy Alibernet, je potřebné poznamenat, že ač jsou referenční systémy pro obě odrůdy identické co do objemových i koncentračních poměrů, průběh tvorby spinových aduktů je odlišný. Opakované měření naznačují, že zatímco v případě odrůdy Svatovavřinecké pozorujeme nárust koncentrace spinových aduktů v důsledku probíhajících redoxních procesů bez konkurenční antioxidační reakce, v případě reference naměřené pro odrůdu Alibernet je zřejmé, že výtěžek spinových aduktů je nižší, což nasvědčuje tomu, že dochází k interakcím se složkami systému.

Vzhledem k tomu, že samotný referenční systém žádné antioxidanty neobsahoval, muselo dojít během experimentu k sekundární kontaminaci. Pravděpodobně docházelo k usazování složek vzorku na stěnách kyvety, což jsme při odrůdě Svatovavřinecké nepozorovali. Kvůli objektivitě výsledků, když je opakovatelnost měření s ohledem na povahu EPR experimentů výborná, byla ke zpracování použita spektra tak, jak byla naměřena. Vycházelo se přitom z toho, že všechny vzorky této odrůdy jsou zatíženy toutéž chybou měření.

Kvantifikace antioxidační aktivity vzorků byla uskutečněna podobným způsobem, jaký byl použit pro vzorky Tokajských, červených a bílých vín v práci Staško et al. [38]. Porovnávala se koncentrace spinových aduktů v příslušném vzorku s koncentrací aduktů v referenčním systému v čase 33 minut po přidání peroxidu vodíku (tj. dvojitý integrál posledního ze série naměřených EPR spekter pro vzorek a k němu korespondující reference). Rozdíl těchto dvou hodnot udává parametr RS - (Radical Scavenged, obr. 13). Ve snaze přejít od absolutních hodnot k relativním, byla hodnota RS vyjádřena v % podle vztahu:

$$\%\,\mathrm{RS} = \frac{c_{(\mathrm{ADUKTY})_{VZ}} - c_{(\mathrm{ADUKTY})_{REF}}}{c_{(\mathrm{ADUKTY})_{REF}}} * 100 \qquad (1)$$

Hodnota % RS přímo vyjadřuje antioxidační schopnost příslušného vzorku, resp. jeho schopnost eliminovat radikály vznikající v experimentálním systému (tab. 2).



Obr. 13: *Závislost plošného integrálu EPR spektra (relativní koncentrace ˙DMPO aduktů získaná dvojitou integrací EPR spekter naměřených během 33 minut od přidání H_2O_2 do systému (c_0 (H_2O_2)= 0.1 mol.dm^{-3}) ve vzorcích odrůdy Svatovavřinecké a Alibernet připravených z navážky 1,5 g. Jako reference byl použit čistý methanol.*

Ethanol - experimenty byly uskutečněny za identických podmínek jako u methanolu.

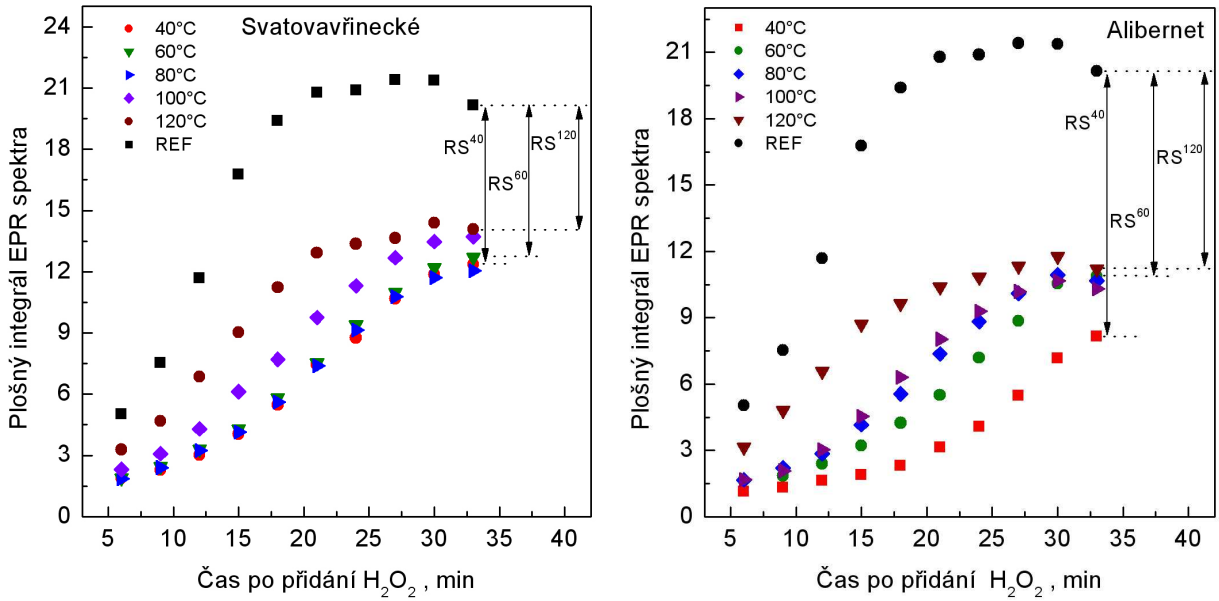
Podle očekávání v naměřených EPR spektrech podle simulační analýzy dominují adukty ˙DMPO–CH_2–CH_2–OH (a_N=1.59 mT, a_H=2.3 mT, g=2.0052) a detekovali jsme též adukty ˙DMPO–OH resp. rozkladné produkty ˙DMPO–CX [49, 50].

Podobně jako u methanolových extraktů vzorky obou odrůd vykazují výrazné antioxidační vlastnosti. Z výsledků experimentů je zřejmé, že vzrůstající teplota snižuje antioxidační schopnosti vzorků obou odrůd, tento trend však není tolik markantní jako u methanolových extraktů. Při porovnání jednotlivých odrůd je opět zřetelná lepší antioxidační aktivita odrůdy Alibernet proti Svatovavřineckému.

Kvantifikace antioxidační aktivity byla uskutečněna přepočtem na hodnoty RS % (rov. 1, obr. 14, tab. 2, [38]) - výsledky plně podporují uvedené závěry. Kvůli odezvě systému musely být vzorky odrůdy Alibernet zředěné. Hodnoty RS v tab. 2 však toto zředění nezohledňují vzhledem k nereálnosti získaných výsledků (RS> 100 %).

Zajímavé je porovnání vlivu navážky vzorku na antioxidační aktivitu (tab. 2). Z vypočítaných hodnot RS je zřetelné, že pro extrakty odrůdy Svatovavřinecké je v celém teplotním intervalu tato hodnota pro extrakty připravené z 1,0 g nižší než u extraktů z navážky 0,5 g. Uvedené rozdíly se pro nižší teploty extrakce pohybují na úrovni chyby měření, pro vyšší teploty jsou markantnější. Podobný trend byl pozorován i u methanolových extraktů připravených při 60, 100 a 120 °C.

V extraktech odrůdy Alibernet nebyl podobný jev pozorován v žádném z rozpouštědel.



Obr. 14: *Závislost plošného integrálu EPR spektra (relativní koncentrace ˙DMPO aduktů získaná dvojitou integrací EPR spekter naměřených během 33 minut od přidání H_2O_2 do systému (c_0 (H_2O_2)= 0.1 mol.dm^{-3}). ve vzorcích odrůdy Svatovavřinecké a Alibernet připravených z navážky 1.0 g. Jako reference byl použit čistý ethanol.*

Tab. 2: *Porovnání antioxidační aktivity vzorků v jednotlivých rozpouštědlech.*

Navážka [g]	Teplota [°C]	Antioxidační aktivita % RS methanol		% RS ethanol	
		SV	A*	SV	A*
0.5	40	42.9	59.9	42.4	40.1
1		66.0	88.6	38.7	59.6
1.5		85.4	90.8	–	–
0.5	60	37.7	47.9	42.7	34.2
1		26.9	63.7	37.1	46.0
1.5		82.3	84.2	–	–
0.5	80	12.2	50.8	47.5	39.3
1		31.9	39.7	40.2	47.1
1.5		40.3	81.4	–	–
0.5	100	31.3	48.2	42.7	34.5
1		23.2	24.0	32.0	48.9
1.5		34.7	34.6	–	–
0.5	120	32.1	22.3	47.0	32.5
1		8.6	0	30.1	44.5
1.5		12.2	0	–	–

*Pozn.: Extrakty odrůdy Alibernet v ethanolu byly ředěny ethanolem v poměru 1:2 (0.5 g) a 1:4 (1.0 g).

Pro uvedený jev v současnosti neexistuje jednoznačné vysvětlení, lze jen předopkládat, určitou změnu konformace jednotlivých polyfenolických struktur,

vzik dimerů, cyklických resp. polyaromatických sloučenin a dalších látek, vlivem rostoucí teploty extrakce, což by následně vedlo ke změně reaktivity těchto látek s hydroxylovými radikály.

Výsledky experimentů s DMPO jsou, co se týká vlivu teploty extrakce na antioxidační aktivitu extraktů, v přímém rozporu s testy antioxidačních vlastností ethanolových extraktů obou odrůd pomocí $ABTS^{\bullet+}$ a $^{\bullet}DPPH$ radikálů a dobře korelují s chováním extraktů v methanolu. Důvody jsou uvedeny v předcházejících částech a vyplývají především z reaktivity aktivních složek, především polyfenolů s přidanými, resp. generovanými oxidanty. Významným činitelem je hodnota redoxního potenciálu jednotlivých složek, která rozhodující měrou ovlivňuje jejich reaktivitu a v nezanedbatelné míře i efekt polarity a protických vlastností rozpouštědla.

Voda - analogická série experimentů byla uskutečněna s Fentonovým systémem i ve vodném prostředí. Výsledky experimentů se výrazně liší od výsledků pro extrakty v methanolu i v ethanolu - prezentovaných v předchozích částech.

S ohledem na specifický průběh EPR spekter nemá v tomto případě smysl vyjadřovat nějaké pro nebo anti oxidační chování jednotlivých extraktů. Fentonův systém produkující hydroxylové radikály se při posuzování antioxidačních vlastností extraktů z hroznových slupek obou odrůd, při použití vody jako extrakčního činidla, neosvědčil.

4.8 Porovnání vlastností extraktů z hroznových slupek a vína

Pro úplnost byly porovnány vlastnosti extraktů z hroznových slupek a finální víno, připravené z totožných odrůd Svatovavřinecké a Alibernet klasickým postupem. Byl sledován obsah polyfenolů, $TEAC_{ABTS}$, $TEAC_{DPPH}$ a % RS. Obsah polyfenolů byl kvůli společné kalibrační křivce porován s vodnými extrakty. Ostatní sledované parametry byly s ohledem na složení vína a přítomnost ethanolu porovnány s hodnotami stanovenými pro ethanolové extrakty.

Z porovnání obsahu polyfenolů (tab. 3) je zřejmé, že v obou případech se hodnoty GAE pohybují nad nejvyššími hodnotami stanovenými pro vodné extrakty. Stanovené hodnoty pro víno jsou v obou případech porovnatelné s hodnotami stanovenými pro methanolové extrakty.

Tab. 3: *Porovnání charakterizujících parametrů stanovených ve vzorcích vín.*

Víno	GAE	$ABTS^{\bullet+}$		$^{\bullet}DPPH$		% RS*
	[mg/100 g]	k‘, min^{-1}	TEAC	k‘, min^{-1}	TEAC	
Svatovavřinecké	185.9	0.2134	15.9	0.1835	4.0	53.2
Alibernet	286.8	0.2919	21.9	0.3009	5.4	15.8

* Hodnoty RS jsou přepočítány na zředění vína 10x.

Oba vzorky vín projevují výrazné schopnosti terminovat kation-radikál $ABTS^{\bullet+}$ i $^{\bullet}DPPH$. V obou experimentech se podle očekávání a v souladu s experimenty s extrakty z hroznových slupek ukázal jako lepší antioxidant vzorek vína odrůdy Alibernet. Lepší antioxidační vlastnosti vyplývají z hodnot formálních rychlostních konstant zániku $ABTS^{\bullet+}$ a $^{\bullet}DPPH$, jakož i z hodnot TEAC vypočítaných pro oba reakční systémy (tab. 3).

Hodnoty TEAC jsou vyšší než pro různé vzorky ovocných šťáv a vín v porovnání s prací Pellegrini a kol. [51], ale jsou v dobré korelaci s hodnotami uvedenými v práci Staško a kol. [52], ve které byly antioxidační vlastnosti likérů porovnávány s vlastnostmi bílých a červených vín. Hodnoty TEAC stanovené v extraktech hroznových bobulí jsou výrazně nižší.

Výsledky experimentů v systému $DMPO/Fe^{2+}/H_2O_2$ rovněž prokázaly schopnost vín terminovat radikály generované v systému, avšak efektivnější je v tomto případě odrůda Svatovavřinecké, což potvrzují hodnoty % RS (tab. 3) - což je v rozporu s výsledky dosaženými pro extrakty z hroznových slupek.

5. ZÁVĚR

Pomocí dostupné experimentální techniky a statistických metod byly charakterizovány extrakty dvou červených odrůd *Vitis vinifera* (Svatovavřinecké a Alibernet), připravené extrakcí rozpouštědlem (methanol, ethanol) za zvýšené teploty a tlaku (PFE) a extrakcí stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE). Byly použity tři navážky vzorku lyofilizovaných hroznových slupek (0,5 g, 1 g a 1,5 g) v teplotním intervalu 40–120 °C.

Bylo sledováno pH, obsah polyfenolů, trichromatické souřadnice, obsah jednotlivých anthokyanů a vliv parametrů extrakce na radikál-zhášející resp. antioxidační aktivitu vzorků, která byla sledována ve třech různých systémech ($ABTS^{\bullet+}$, $^{\bullet}$DPPH a Fentonův systém a využitím synového lapače DMPO). Byl sledován vliv podmínek přípravy vzorků (navážka, teplota extrakce, rozpouštědlo). Statistickými metodami byly vypočteny vzájemné korelace mezi sledovanými veličinami.

Stručně je možné shrnout dosažené výsledky následovně:

- Potvrdilo se, že extrakce rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku (PFE) a extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE) je vhodná na přípravu vzorků s využitím v potravinářství.
- Byl prostudován vliv rozpouštědla na jednotlivé charakteristiky. Použití solventů s různou polaritou výrazně ovlivňuje antioxidační chování vzorků, z důvodu ovlivnění proton-donorové aktivity antioxidantů rozpouštědlem [53].
- Byl stanoven HPLC profil jednotlivých anthokyanů, přičemž bylo dosaženo dobré shody s UV/VIS experimenty, nikoliv však s EPR experimenty.
- Vliv pH na antioxidační vlastnosti systému je bez ohledu na druh použitého rozpouštědla zanedbatelný.
- Byl potvrzen významný vliv navážky vzorku na hodnoty sledovaných parametrů, nejlepší odezvu vykazovaly extrakty připravené z 1,0 g lyofilizovaných hroznových slupek.
- Významným faktorem, ovlivňujícím většinu parametrů, byla teplota extrakce, její vliv se liší podle použitého rozpouštědla.

Ve všeobecnosti je možné konstatovat, že z hlediska výtěžnosti (obsah anthokyanů) se jako optimální jeví teplota 40 °C pro methanol a 80 °C pro ethanol a vodu. Ostatní parametry (celkový obsah polyfenolů a antioxidační charakteristiky) vykazují nejlepší vlastnosti odlišně jen pro ethanol a vodu a to při 120–140 °C. Další růst teploty (nad 140 °C) způsobuje degradaci vzorků, což se projevuje postupným zhoršováním všech sledovaných vlastností.

Slupky hroznových bobulí jsou významným zdrojem antioxidantů, odkud se v procesu výroby dostávají do vína.

Co se týká zhodnocení nejlepšího vzorku z hlediska antioxidačních vlastností, není možné tyto výsledky generalizovat, protože každý vzorek je ve všeobecnosti biologický systém a má specifickou odezvu na podmínky oxidačního stresu. Významným parametrem je redoxní potenciál složek, jejich vzájemné koncentrační poměry a možné synergické působení. V neposlední řadě jsou důležitými faktory způsob přípravy vzorku, použité experimentální podmínky a metodika vyhodnocení.

Byly potvrzeny výrazné antioxidační vlastnosti všech extraktů a to ve všech sledovaných rozpouštědlech. Nejlepší odezva systému byla dosažena pro extrakty v methanolu > vodě > ethanolu. S ohledem na uvažované využití extraktů pro potravinářské účely se jako nejpřijatelnější alternativa jeví extrakty ve vodě připravené při vyšších teplotách (120–140 °C).

V porovnání s extrakty z hroznových slupek jsou antioxidační vlastnosti vína lepší, v úzké korelaci s obsahem polyfenolických látek. Nezanedbatelným parametrem v této souvislosti je vliv fermentace, respektive výrobní technologie na kvalitu a vlastnosti vína.

Z obou studovaných odrůd byla jako vhodnější zdroj pro extrakci anthokyanů a jejich následné využití v potravinářském průmyslu určena odrůda Alibernet. Tato odrůda měla asi 3krát vyšší obsah anthokyanů, nežli odrůda Svatovavřinecké a měla také lepší antioxidační vlastnosti.

Pro separaci anthokyanů byl použit nový typ kolony C_{12} Max-RP (Phenomenex). Tato kolona byla vyrobena speciálně pro separaci anthokyanů. Při použití kolony C_{12} Max-RP byl zaznamenán vysoký dělící účinek anthokyanů oproti často používaným kolonám typu C_{18}.

Také off-line spojení technik PFE (PHWE) a EPR se ukázalo jako velice přínosné a je dosud jedinečné. Výsledky prokázaly, že PFE (PHWE) je vhodnou metodou potenciálně použitelnou pro výrobu různých produktů využitelných v potravinářství.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$ABTS^{\bullet+}$	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny
CDA	kánonická diskriminační analýza
$^{\bullet}CH_3$	methylový radikál
CIE Lab	trichromatické souřadnice
CO_2	oxid uhličitý
DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem
De-3-glc	delfinidin-3-*O*-glukosid
DMPO	(5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid)
$^{\bullet}$DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
Fe^{2+}	železnatý kation
GAE	ekvivalenty kyseliny gallové
H_2O_2	peroxid vodíku
$HOO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$	hydroperoxylový a alkoxylový radikál
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
Ky-3-glc	kyanidin-3-*O*-glukosid
Mv-3-glc	malvidin-3-*O*-glukosid
$O_2^{-\bullet}$	superoxidový aniónový radikál
$^{\bullet}OH$	hydroxylový radikál
PCA	analýza hlavních komponent
PFE, PSE, ASE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
Pg-3-glc	pelargonidin-3-*O*-glukosid
Pn-3-glc	peonidin-3-*O*-glukosid
PHWE	extrakce kapalnou horkou stlačenou vodou
Pt-3-glc	petunidin-3-*O*-glukosid
$RO_2^{\bullet}$	peroxylový radikál
RSE	radikál-zhášejíci efekt
SO_2	oxid siřičitý
TEAC	přepočtená antioxidační aktivita na ekvivalenty Troloxu
TPC	celkový obsah polyfenolů
Trolox	(6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, voděrozpustný analog vitamínu E)

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] Ju, Z., Y., Howard, L., R.: Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolic from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, roč. 51, č. 18, s. 5207–5213.

[2] Cantos, E., Espín, J., C., Tomás-Barberán, F., A.: Varietal differences among the polyphenol profile of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, roč. 50, č. 20, s. 5691–5696.

[3] Czyzowska, A., Pogorzelski, E.: Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part I. Total polyphenols and phenolics acids, *European Food and Research Technology*, 2002, roč. 214, s. 148–154.

[4] Longo, L., Vasapollo, G.: Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. *Food Chemistry*, 2006, roč. 94, s. 226–231.

[5] Garcia-Alonso, M., Rimbach, G., Sasai, M., Nakahara, M., Matsugo, S., Uchida, Y., Rivas-Gonzalo, J., C., De Pascual-Teresa, S.: Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2005, roč. 49, č. 12, s. 1112–1119.

[6] Guadalupe, Z., Ayestarán, B.: Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L.Cv. "Tempranillo" during vinification and aging. *European Food Research and Technology*, 2008, roč. 228, s. 29–38.

[7] Oficiální výukové stránky Farmaceutické fakulty Veterinární a farmaceutické univerzity Brno [online]. [cit.2009-08-05]. Dostupné z: http://faf.vfu.cz/html/txts/anthokyany.html

[8] Davídek, J., Janíček, G., Pokorný, J.: *Chemie potravin*. 1.vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury (SNTL), 1983. 632 s.

[9] Velíšek, J.: *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.

[10] Laho, L., Minárik, E., Navara, A.: *Vinárstvo chémia, mikrobiológia a analytika vína*. 1.vyd. Bratislava: Príroda, 1970. 426 s.

[11] Minárik, E., Navara, A.: *Chémia a mikrobiológia vína*. 1.vyd. Bratislava: Príroda, 1986. 560 s.

[12] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2.vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[13] Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B.: Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis Vinifera* L. during ageing in the bottle, *European Food and Research Technology*, 2005, roč. 220, s. 607–614.

[14] Cortell, J., M., Halbleib, M., Gallagher, A., V., Righetti, T., L., Kennedy, J., A.: Influence of Vine Vigor on Grape (Vitis vinifera L. Cv. Pinot Noir)

Anthocyanins. 1. Anthocyanin Concentration and Composition in Fruit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, roč. 55, s. 6575–6584.
[15] Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., Heinonen, M.: Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, roč. 83, s. 1403–1411.
[16] Minussi, R., C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G., M., Duran, N.: Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, 2003, roč. 82, s. 409–416.
[17] Lambri, M., Jourdes, M., Glories, Y., Saucier, C.: High performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of red wine pigments. *Journal of Planar Chromatography*. 2003, roč. 16, s. 88–94.
[18] Postecu, I., D., Tatomir, C., Chereches, G., Brie, I., Damian, G., Petrisor, D., Hosu, A., M., Miclaus, V., Pop, A.: Spectroscopic characterization of some grape extracts with potential role in tumor growth inhibition, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2007, roč. 9, č. 3, s. 564–567.
[19] Karasek, P., Planeta, J., Ostra, E., V., Mikesova, M., Golias, J., Roth, M., Vejrosta, J.: Direct continuous supercritical fluid extraction as a novel method of wine analysis. Comparison with conventional indirect extraction and implications for wine variety identification, *Journal of Chromatography A*, 2003, roč. 1002, s. 13–23.
[20] Ju, Z., Y., Howard, L., R.: Subcritical Water and Sulfurured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin, *Journal of Food Science*, 2005, roč. 70, č. 4, s. S270–S276.
[21] He, J., Santos-Buelga, C., Mateus, N., de Freitas, V.: Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 2006, roč. 1134, s. 215–225.
[22] Mateus, N., Silva, M. S. A., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C., de Freitas, V.: A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, roč. 51, č. 7, s. 1919–1923.
[23] De Villiers, A., Vanhoenacker, G., Majek, P., Sandra, P.: Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of Chromatography A*, 2004, roč. 1054, s. 195–204.
[24] Brenna, O., Buratti, S., Cosio, M. S., Mannino, S.: A new HPLC Metod for the determination of polyphenols in wines based on the use of less aggressive eluents and a coupled revelation system. *Electroanalysis*, 1998, roč. 10, č. 17, s. 1204–1207.
[25] García-Beneytez, E., Revilla, E., Cabello, F.: Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *European Food Research and Technology*, 2002, roč. 215, s. 32–37.

[26] Revilla, E., Ryan, J. M., Martín-Ortega, G.: Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 1998, roč. 46, č. 11, s. 4592–4597.
[27] Luque-Rodríguez, J., M., de Castro, M., D., L., Pérez-Juan, P.: Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from grape skin of winemaking residues. *Bioresource Technology*, 2007, roč. 98, s. 2705–2713.
[28] Alonso, A., M., Guillén, D., A., Barroso, C., G., Puertas, J., B., Garcia, A.: Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, roč. 50, s. 5832–5836.
[29] Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A.: Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts, *Bioresource Techology,* 2003, roč. 87, s. 41–44.
[30] Gonzáles-Paramás, A., M., Rivas-Gonzalo, J., C., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S.: Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, roč. 52, s. 234–238.
[31] Falchi, M., Bertelli, A., Lo Scalzo, R., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., Cui, J., Das, D., K.: Comparison of Cardioprotective Abilities between the Flesh and Skin of Grapes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, roč. 54, č. 18, s. 6613–6622.
[32] Arvanitoyannis, I., S., Ladas, D., Mavromatis, A.: Potential uses and applications of treated wine waste: a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 2006, roč. 41, s. 457–487.
[33] Moure, A., Cruz, J., M., Franco, D.: Natural antioxidants from residual sources (review), *Food Chemistry*, 2001, roč. 72, s. 145–171.
[34] Lugasi, A., Hóvári, J.: Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages, *Nahrung/Food*, 2003, roč. 47, č. 2, s. 79–86.
[35] Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J., C., Camara, J., S.: Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines, *Food Chemistry*, 2007, roč. 105, s. 204–214.
[36] Staško, A., Liptáková, M., Malík, F., Mišík, V.: Free Radical Scavenging Activities of White and Red Wines. An EPR Spin Trapping Study, *Applied Magnetic Resonance*, 2002, roč. 22, s. 101–103.
[37] Polovka, M.: EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods, *Journal of Food and Nutrition Research*, 2006, roč. 45, č. 1, s. 1–11.
[38] Staško, A., Polovka, M., Brezová, V., Biskupič, S., Malík, F.: Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study), *Food Chemistry*, 2006, roč. 96, s. 185–196.
[39] Petrisor, D., Damian, G., Simon, S., Chmutzer, G., Hosu, A., Miclaus, V.: EPR investigation of antioxidant characteristics of some irradiated natural

extracts, *Journal of Optolelectronic and Advanced Materials*, 2007, roč. 9, č. 3, s. 760–763.

[40] Polovka, M., Brezová, V., Staško, A.: Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy, *Biophysical Chemistry*, 2003, roč. 106, s. 39–56.

[41] Brezová, V., Polovka, M., Staško, A.: The influence of additives on beer stability investigated by EPR spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A*, 2002, roč. 58, s. 1279–1291.

[42] Chaovanalikit, A., Wrolstad, R., E.: Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. *Journal of Food Science*, 2004, roč. 69, č. 1, s. FCT73–FCT83.

[43] Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F.: Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 2003, roč. 133, s. 2812–2819.

[44] Zhuang, Q., Scholz, F., Pragst, F.: The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. *Electrochemistry Communications*, 1999, roč. 1, č. 9, s. 406–410.

[45] Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L., R., Gardner, P., T., Heinonen, M., I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambert, P., McPhail, D., Skibsted,L., H., Tijburg, L.: Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food and Research Technology*, 2001, roč. 212, č. 3, s. 319–328.

[46] Scott, S., L., Chen, W., J., Bakac, A., Espenson, J., H.: Spectroscopic parameters, electrode-potentials, acids ionization-constants, and electron-exchange rates of the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *Journal of Physical Chemistry*, 1993, roč. 97, č. 25, s. 6710–6714.

[47] Li, A., S., W., Cummings, K., B., Buettner, G., R., Roethling, P., H., Chignelq, C., F.: A spin-trapping database implemented on the IBM PC/AT. *Journal of Magnetic Resonance*, 1988, roč. 79, č. 1, s. 140–142.

[48] National Institute of Environmental Health Services – National Institutes of Health, N.I.E.H.S. [online]. [cit.2009-08-21]. Dostupné z: http://tools.niehs.nih.gov/stdb

[49] Valdez, L., B., Goretta, L., A., Boveris, A.: Polyphenols in Red Wines Prevent NADH Oxidation Induced by Peroxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, roč. 957, s. 274–278.

[50] Kovács, Z., Dinya, Z., Antus, S.: LC-SSI-MS techniques as efficient tools for characterization of nonvolatile phenolic compounds of a special Hungarian wine. *Journal of Chromatographic Science*, 2004, roč. 42, č. 3, s. 125–129.

[51] Pellegrini, N., Simonetti, P., Gardina, C., Brenna, O., Brighenti, F., Pietta, P.: Polyphenol Content and Total Antioxidant Activity of *Vini Novelli* (Young Red Wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, roč. 48, č. 3, s. 732–735.

[52] Staško, S., Brezová, V., Biskupič, S., Rapta, P.:Antioxidant properties of liqueurs – an EPR study. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2007, roč. 46, č. 4, s. 145–149

[53] Avila, D., V., Ingold, K., U., Lusztyk, J., Green, W., H., Procopio, D., R.: Dramatic solvent effects on the absolute rate constants for abstraction of the hydroxylic hydrogen atom from tert-butyl hydroperoxide and phenol by the cumyloxyl radical. The role of hydrogen-bonding. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, roč. 117, č. 10, s. 2929–2930.

8. PUBLIKČNÍ ČINNOST

Publikace v CC časopisech

1. **Šťavíková, L**., Polovka, M., Hohnová B., Zemanová, J. Multi-experimental Characterization Of Grape Skin Extracts. Czech J. Food Sci. 26 Special Issue, s43-s48 (2008).
2. Hohnová, B., **Šťavíková, L**., Karásek, P. Determination of Anthocyanins in Red Grape Skin by Pressurized Fluid Extraction and HPLC. Czech J. Food Sci. 26 Special Issue, s39-s42 (2008).
3. **Šťavíková, L**., Polovka, M. Antioxidant properties of grape skins extracts investigated by EPR and UV-VIS spectroscopy, Chemické listy, vol. 102, pp. 797-799, (2008).
4. **Šťavíková, L**., Hrstka M. The impact of fermentation process on amino acids profile of Grüner Veltliner white wine, Chemické listy, vol. 102, pp. 800-802, (2008).

Plné texty příspěvků z konferencí

1. Hohnová, B., **Šťavíková, L**., Karásek, P. Determination of anthocyanins in red grape skin by pressurized fluid extraction and HPLC, Kvalita moravských a českých vín a jejich budoucnost, Lednice, 11.- 12. 9. 2008, pp. 1-7. ISBN 978-80-7376-208-8.
2. **Šťavíková, L**., Polovka, M., Hohnová, B**.** Multi-experimental characterization of grape skin extracts, Kvalita moravských a českých vín a jejich budoucnost, Lednice, 11.- 12. 9. 2008, pp. 1-12. ISBN 978-80-7376-208-8.
3. **Šťavíková, L**., Polovka, M., Hohnová, B., Zemanová, J. Characterization of Grape Skins´ Ethanolic Extracts. Studentská odborná konference Chemie a společnost, Brno, 4.12.2008. ISBN 978-80-214-3920-7.

Příspěvky ve sbornících abstraktů z konferencí

1. **Šťavíková, L**., Omelková, J, Breierová, E. The influence of the mode of preservation on the physiological properties of *Sporobolomyces Salmonicolor*, 35 th Annual Conferenc on Yeasts, Smolenice, Slovensko 16.–18.5.2007, ISSN 1336-4839.
2. Hohnová, B., **Šťavíková, L.**, Karásek, P. Effect of solvent and temperature on pressurized fluid extraction of anthocyanins from red grape skin, 32 nd International Symposium on Capillary Chromatography and 5 th GCxGC Symposium, Riva del Garda, Italy, 26.-30.5.2008, pp. 443-443.

3. **Šťavíková, L**., Polovka, M., Hohnová, B. Antioxidační vlastnosti extraktů ze slupek hroznových bobulí, XXXIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 26.-28.5. 2008., pp. 13-13.
4. Hohnová, B., **Šťavíková, L**. Stanovení anthokyanů ve slupkách červených hroznů pomocí extrakce za zvýšené teploty a tlaku a HPLC, Kvalita moravských a českých vín a jejich budoucnost, Lednice, 11.- 12. 9. 2008, pp. 38-38.
5. **Šťavíková, L.,** Polovka, M., Hohnová, B. Charakterizace vlastností extraktů z hroznových bobulí, Kvalita moravských a českých vín a jejich budoucnost, Lednice, 11.- 12. 9. 2008, pp. 47-47.
6. **Šťavíková, L**., Polovka, M. Antioxidant properties of grape skins extracts investigated by EPR and UV-VIS spectroscopy, 4th meeting on Chemistry and Life 2008, Brno, 9.-11.9.2008, pp. 2.118, ISBN 978-80-214-3715-9.
7. **Šťavíková, L**., Hrstka M. The impact of fermentation process on amino acids profile in Veltlínské zelené, 4th meeting on Chemistry and Life 2008, Brno, 9.-11.9.2008, pp. 2.119, ISBN 978-80-214-3715-9.
8. **Šťavíková, L**., Polovka, M., Hohnová , B. The influence of extraction conditions on the characteristics of grape skins water extracts. 5th Conference by Nordic Separation Science Society, 26.-29.8.2009, Tallinn, Estonia, pp. 135, ISBN 978-9985-59-930-3.
9. Hohnová B., **Šťavíková L**., Vespalcová M., Karásek P. Extraction and determination of selected flavonoids from plant materiále by pressurized solvents and HPLC-methanol versus water. 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, 2.-4.9.2009, Maďarsko, pp.187, ISBN 978-963-06-7878-0.
10. **Šťavíková, L**., Polovka, M., Hohnová, B., Roth, M. The influence of extraction conditions on total phenolic content and anthocyanins profile of grape skins. 25th International Symposium on Microscale BioSeparations MSB 2010, 21.-25.3.2010, Praha, pp. 91-92, ISBN 978-80-254-6631-5.