



Michal Gross, Pavel Diviš, Michaela Šumberová
Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

Highlights

Charakterizace jakostních přívlastkových vín odrůdy Ryzlink rýnský původem z Moravské vinařské oblasti na základě obsahu jednoduchých fenolických látek.

Spolehlivá metoda HPLC pro stanovení 7 fenolických látek s využitím DAD nebo MS detektoru s validací opakovatelnosti a lineárního rozsahu. Triviální příprava vzorku před analýzou.

Nejvíce zastoupenou fenolickou látkou ve vzorcích vín ryzlinku gallová kyselina. Její obsah významně korelován s celkovým obsahem fenolických látek (TPC).

Zjištěné obsahy resveratrolu (ca. 30 µg/L) z nutričního hlediska nepřilíží významně.

Úvod

Detailní, rychlá a přesná analýza komponent vína je jedním trendů a výzev analytické chemie potravin dneška. Vína konkrétní provenience, ročníku či odrůdy si nesou svůj chemický "otisk prstu" ve svém látkovém složení – těkavých, fenolických nebo např. minerálních látek. Profílce typických obsahů těchto látek je proto užitečným nástrojem jak v boji proti různým praktikám falšování vína, tak v otázce základního výzkumu a obecné charakterizace pěstovaných odrůd vinné révy. Fenolické látky jsou více charakteristické pro červená vína, u bílých vín není jejich analýza natolik rozšířená.

Ryzlink rýnský je starobylá, ceněná moštová odrůda révy vinné, poskytující kvalitní bílá vína. Pěstuje se především ve střední Evropě. V současné době se do popředí zájmu pěstitelů révy dostávají rezistentní, tzv. PIWI odrůdy, jejichž většina ve své genealogii Ryzlink rýnský nese (z mateřské strany např. odrůda Johanniter, z otcovské pak Kerner či Aurelius).



Obr. 1: Ryzlink rýnský – hrozen a list

Metodika

Vzorky

Reprezentativní sada 20 jakostních přívlastkových vín byla pořízena v běžné tržní síti, po pěti vzorcích z každé z vinařských podoblastí, ročníky 2019 – 2021.

Celkový obsah fenolických látek (TPC)

TPC byl stanoven spektrofotometricky využitím Folin-Ciocalteuova činidla z hodnoty absorbance při 760 nm. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny jako miliekvivalenty gallové kyseliny k objemu vína (mGAE ~ mg(GA)/L).

Obsah vybraných fenolických látek

Vybrané fenolické látky byly stanoveny pomocí kapalinové chromatografie s DA a MS detekcí (Agilent Infinity 1260). Separace byla provedena na koloně Kinetex 5µm EVO C18 100 Å 250 × 4,6 mm pomocí gradientové eluce (1% kys. mravenčí : methanol = 90:10, gradient 20 min. do poměru 10:90, průtok 1 ml/min) při teplotě 35 °C. Detekce pomocí DAD na vlnových délkách 280 a 320 nm a MS na příslušných poměrech m/z (viz Tab. 2). Předúprava vzorků byla provedena pouze ředěním 1:1 mQ vodou a filtrací přes PTFE stříkačkový filtr.

Výsledky

Tab. 1: Popisná statistika TPC dle podoblastí, hodnoty uvedeny v mGAE.

Podoblast	Prům	Med	Min	Max	Odch
Mikulovská	260,1	264,6	174,2	330,8	37,4
Velkopavlovická	234,2	226,6	180,1	303,3	44,2
Slovácká	310,6	300,7	214,8	381,0	23,9
Znojemská	259,7	231,2	219,6	341,8	38,1

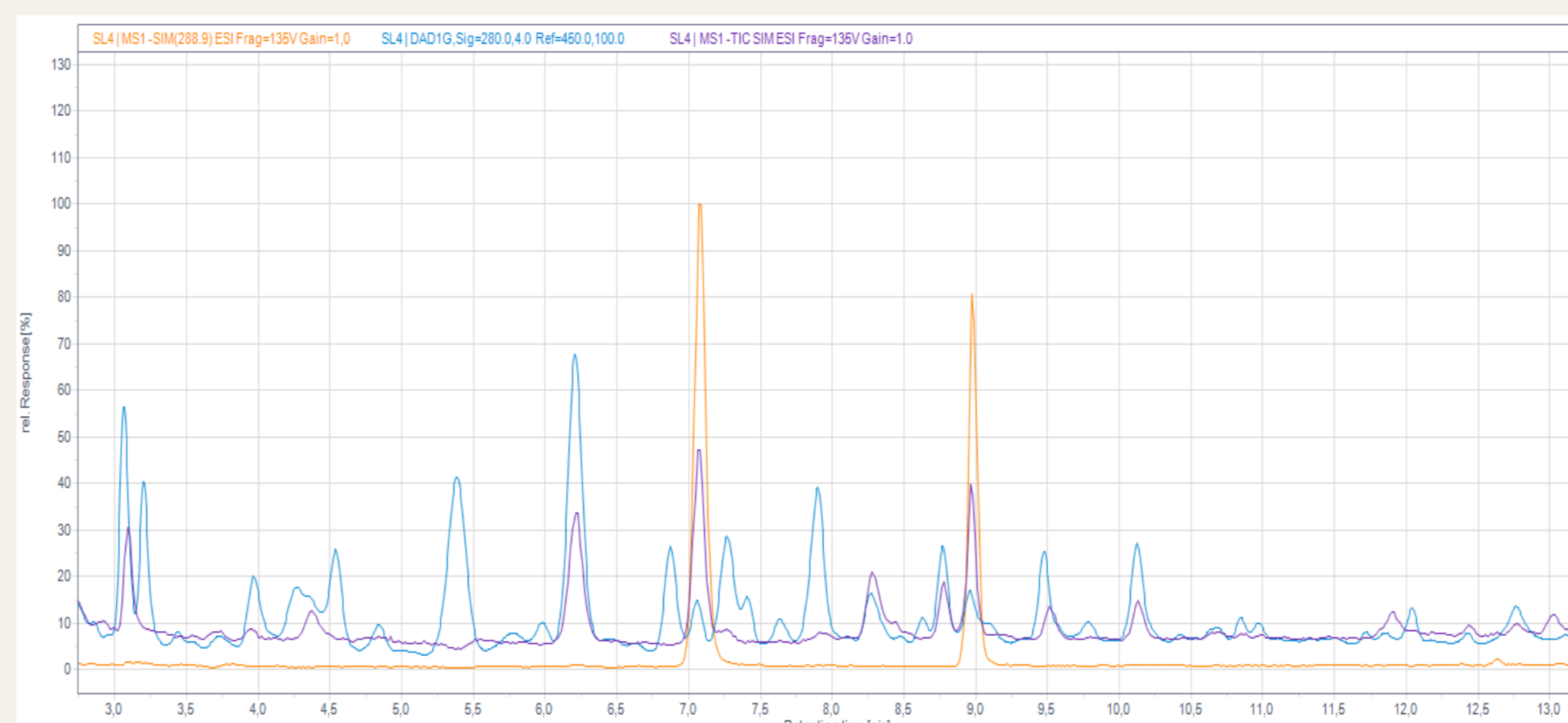
Celkový obsah fenolických látek ve vínech nabýval hodnot od 174 do 381 mGAE, souhrn TPC uvádí Tab. 1. Zjištěné hodnoty odpovídají měřením Valáška a kol. (2019) s hodnotami 194-281 mGAE, resp. 175-465 mGAE u studie Faitové a kol. (2004).

Výsledky validace ukazují vynikající opakovatelnost a kalibrovatelnost stanovení při použití detektoru diodového pole, hlavní výhodou hmotnostně spektrometrické detekce je pak vedle velmi dobrého lineární proložení kalibrace řádově větší rozsah stanovení a větší citlivost. Ukázkou separace a přítomnosti dalších neidentifikovaných analytů v reálném vzorku uvádí Obr. 2.

Tab. 2: Popisné a validační parametry jednotlivých analytů (RT – retenční čas [min], m/z – snímaná hmota pomocí MS, RSD – opakovatelnost stanovení vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou 7 opakování [%], R² – koeficient spolehlivosti lineárního proložení kalibrace, LR – lineární rozsah [mg/l])

Analyt	RT	m/z	RSD	R ²	LR
Gallová kys.	3,1	169	7	0,9984	0,001-10
Katechin	7,0	289	4	0,9949	0,001-5
Kávovalá kys.	8,2	179	19	0,9997	0,01-10
Epikatechin	8,9	289	7	0,9965	0,001-5
Kumarová kys.	10,1	119	3	0,9993	0,005-10
Sinapová kys.	11,1	208	5	0,9997	0,005-10
Resveratrol	12,8	227	11	0,9986	0,005-5

Analyt	RT	λ	RSD	R ²	LR
Gallová kys.	3,1	280	3	1,0000	0,1-10
Katechin	7,0	280	4	0,9999	0,1-10
Kávovalá kys.	8,2	320	2	0,9999	0,1-10
Epikatechin	8,9	280	1	1,0000	0,1-10
Kumarová kys.	10,1	320	1	1,0000	0,1-10
Sinapová kys.	11,1	320	1	0,9999	0,1-10
Resveratrol	12,8	320	1	0,9997	0,1-10



Obr. 2: Ukázkou chromatografické separace (modře: signál DAD při 280 nm; fialové: signál MS v režimu TIC; žluté: signál MS pro m/z 289 s piky katechinu a epikatechinu)

Z výše validovaných analytů bylo kvantifikováno 6 fenolických látek: 3 fenolické kyseliny, 2 flavonoidy a resveratrol jako zástupce stilbenů. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3. Sinapová kyselina byla nalezena nad mezí kvantifikace pouze ve 3 případech a byla proto ze souhrnných dat vypuštěna. Nejvyšších hodnot ze stanovených látek nabývala ve vzorcích vín gallová kyselina, průměrně 4,7 – 13,2 mg/l, tyto hodnoty odpovídají zavedeným pozorováním Waterhouse (2002), který za běžný obsah této kyseliny v bílých vínech považuje hodnotu 10 mg/l. Katechiny jsou pokládány za vhodné analyty při autentifikaci vín (Pavloušek a kol. 2013), ve vzorcích ryzlinku dosahovaly průměrných koncentrací 0,1 – 2,0 mg/l u katechinu, resp. 0,1 – 0,9 mg/l u epikatechinu, což přibližně odpovídá typickému poměru 2:1 těchto látek ve vínech. Za nanejvýš vyrovnané napříč podoblastmi je možné označit obsahy resveratrolu, které nabývaly hodnot 0,03 mg/l (jeho obsah v červených vínech dosahuje o 1-2 řády vyšších hodnot).

Výsledky (pokr.)

Tab. 3: Popisná statistika koncentrací vybraných analytů dle podoblastí, hodnoty uvedeny v mg/L.

Obl.	Analyt	Prům	Med	Min	Max	Odch
Mik	Gallová kyselina	11,78	12,27	0,41	21,47	9,25
	Katechin	0,13	0,10	0,00	0,30	0,11
	Kávovalá kyselina	0,26	0,22	0,00	0,64	0,22
	Epikatechin	0,12	0,11	0,00	0,27	0,07
	Kumarová kyselina	1,24	0,99	0,74	2,52	0,66
VP	Resveratrol	0,03	0,03	0,02	0,04	0,01
	Gallová kyselina	4,74	5,21	0,85	7,69	3,35
	Katechin	0,35	0,35	0,05	0,65	0,28
	Kávovalá kyselina	0,80	0,51	0,14	2,05	0,86
	Epikatechin	0,21	0,20	0,03	0,42	0,17
SI	Kumarová kyselina	1,72	1,35	0,63	3,56	1,31
	Resveratrol	0,03	0,03	0,01	0,03	0,01
	Gallová kyselina	13,20	8,85	0,81	30,86	12,84
	Katechin	1,97	0,21	0,09	7,44	3,15
	Kávovalá kyselina	0,41	0,37	0,14	0,84	0,26
Zn	Epikatechin	0,91	0,12	0,05	4,14	1,81
	Kumarová kyselina	1,00	0,70	0,41	1,70	0,62
	Resveratrol	0,03	0,03	0,00	0,04	0,02
	Gallová kyselina	9,67	3,71	1,12	34,99	14,27
	Katechin	0,72	0,18	0,14	2,40	0,97
Zn	Kávovalá kyselina	0,55	0,41	0,00	1,94	0,80
	Epikatechin	0,56	0,16	0,13	1,80	0,71
	Kumarová kyselina	1,70	1,57	0,30	4,04	1,52
	Resveratrol	0,03	0,03	0,02	0,04	0,01

Z výsledků Kruskal-Wallisova testu rozptylu nevyplýval žádný statisticky významný rozdíl v obsahích stanovených látek napříč podoblastmi. Korelační analýza ukázala tři významné pozitivní korelace: korelaci 77,8 % TPC a obsahu gallové kyseliny, 96,2% korelaci mezi obsahy izomerů katechinu a 84,5% korelaci koncentrací kávovalé a kumarové kyseliny. Na závěr provedená klastrová analýza a analýza hlavních komponent neposkytly žádné racionální rozdělení vzorků mezi podoblastmi.

Závěr

Problematika autentifikace vína patří mezi aktuální problémy, spojení instrumentální analytické chemie a chemometrie má potenciál přijít s možnými řešeními. Sledování obsahu fenolických látek je již zavedenou metodou pro kontrolu pravosti červených vín, fingerprint těchto látek v bílých vínech se však zdá být příliš slabý, bude zřejmě potřeba důkladněji prozkoumat kvalitativní složení a stanovit další, pokud možno specifické analyty. V uvedené práci byly validovány parametry jednoduché a poměrně rychlé metody stanovení fenolických látek, která vykazuje výbornou opakovatelnost i citlivost.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Standardním projektem specifického výzkumu No. FCH-S-23-8330.

Reference

- Faitová, K., A. Hejtmánková, J. Lachman, V. Pivec a J. Dudjak. The contents of total polyphenolic compounds and trans-resveratrol in white Riesling originated in the Czech Republic. Czech Journal of Food Sciences. 2004, 22(6), 215-221. ISSN 12121800.
- Pavloušek, P. a M. Kumšta. 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. ISSN 12121800.
- Valášek, P., J. Miček, A. Adámková, Milada Křivánková, P. Valášek Jr., M. Adámek a E. Sedláčková. Comparison of Contents of Selected Esters, Higher Alcohols and Total Content of Polyphenolic Substances in Wines of the Varieties 'Chardonnay' and 'Riesling' by vintage. Mitteilungen Klosterneuburg. 2019, 69(2), 115-123. ISSN 0007-5922.
- Waterhouse, A. L. Wine Phenolics. Annals of the New York Academy of Sciences. 2002, 957(1), 21-36. ISSN 00778923.

Kontakt

Ing. Michal Gross
Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
michal.gross@vut.cz