

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ METODY UHPLC-ESI/MS/MS PRO STANOVENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK TYPU STILBENŮ

OLGA PŠENIČNAJA^a, ZORA KOTÍKOVÁ^a,
ALENA HEJTMÁNKOVÁ^a, JAROMÍR
LACHMAN^a, VLADIMÍR PIVEC^a, RADOMÍRA
STŘÁLKOVÁ^b a MARTIN DĚDINA^c

^a Katedra chemie, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6, ^b Výzkumná stanice vinařská Karlštejn, Karlštejn 98, 267 18 Karlštejn, ^c Výzkumný ústav zemědělské techniky, v.v.i., Drnovská 507/73, 161 00 Praha 6
psenicnaja@af.czu.cz

Došlo 15.8.16, přepracováno 30.1.17, přijato 1.2.17.

Klíčová slova: UHPLC-ESI/MS/MS, *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol, *trans*-piceid, *cis*-piceid, pokrutiny

Úvod

Polyfenoly jsou považovány za jednu z nejvíce zastoupených skupin rostlinných metabolitů. Jsou to látky různého charakteru, mono- oligo- či polymerní, mnohdy kombinované s jinými látkami biogenního původu. Polyfenoly jsou velmi sledovanou skupinou látek díky jejich fyziologické funkci. V rostlině mají stavební a strukturální funkce, zodpovídají za chuť, vůni a barvu. Kromě toho polyfenoly mají v rostlině obrannou funkci, chrání před škůdci, infekcemi, chladem, mechanickým poškozením a jinými škodlivými vlivy¹.

Společnou vlastností fenolických látek je jejich schopnost tvořit relativně stabilní radikály. Tato skutečnost je zapříčiněna interakcí hydroxylové skupiny a π -elektronů benzenového kruhu. V důsledku toho působí jako antioxidanty a začleňují se do různých oxidačních procesů zprostředkovaných radikály. Polyfenoly mají v organismu významnou biologickou roli².

Rostlinné fenoly a polyfenoly v potravinách jsou předmětem pokračujícího výzkumu. Ten v posledních letech umožnil zpřesnit znalosti o chemické struktuře a koncentraci těchto látek v potravě a potvrdil jejich, a to nikoliv pouze antioxidantní, účinky. Některé z nich, zejména díky jejich možnému blokování iniciační a progresní fáze karcinogeneze, jsou využívány ve výzkumu rakoviny a slibují využití nejen v prevenci, ale i v terapii této choroby³.

V současné době je velká pozornost věnována resveratrolu, jeho isomerům a derivátům (*trans*- a *cis*-resveratrol, *trans*- a *cis*-piceid, aj., obr. 1) a jejich biologickým účinkům.

Resveratrol je triviální název pro polyfenolickou látku 3,4',5-trihydroxystilben. Z jeho struktury je zřejmé, že mohou existovat dva geometrické isomery, *trans*- (*Ia*) a *cis*- (*Ib*) resveratrol. V rostlinném materiálu se obvykle vyskytuje směs obou isomerů, většinou převažuje *trans*-isomer. Resveratrol se vyskytuje rovněž ve formě glukosidů, β -glukosyloxy-skupina je vázána buď v poloze 3- (triviální název piceid) (*II*), nebo v poloze 4'- (resveratrolosid), od obou látek je znám *trans*- i *cis*-isomer. Kromě toho jsou v rostlinném materiálu přítomny oligomery (konkrétně dehydrooligomery) resveratrolu, tzv. konstitutivní stilbeny, ϵ -viniferin (*Ic*) tj. dimer resveratrolu a α -viniferin (*Id*) tj. trimer resveratrolu. Uvedené oligomery resveratrolu nejsou jediné, v poslední době byla popsána řada analogických oligomerů resveratrolu, např. amuresin H (*Ie*)⁴.

Resveratrol lze zařadit mezi fytoalexiny, sekundární metabolity rostlin, které se začínají tvořit ve zvýšené míře jako odpověď na stres (mechanické poškození, UV záření, ozon) nebo po napadení rostliny nepatogenními nebo avirulentními bakteriemi, viry či houbami. Některé fytoalexiny mají antibakteriální nebo antifungální účinnost, jiné jsou pro danou infekci neúčinné; nejsou tedy ekvivalentní protilátkám, které vyšší organismy tvoří po infekci⁴.

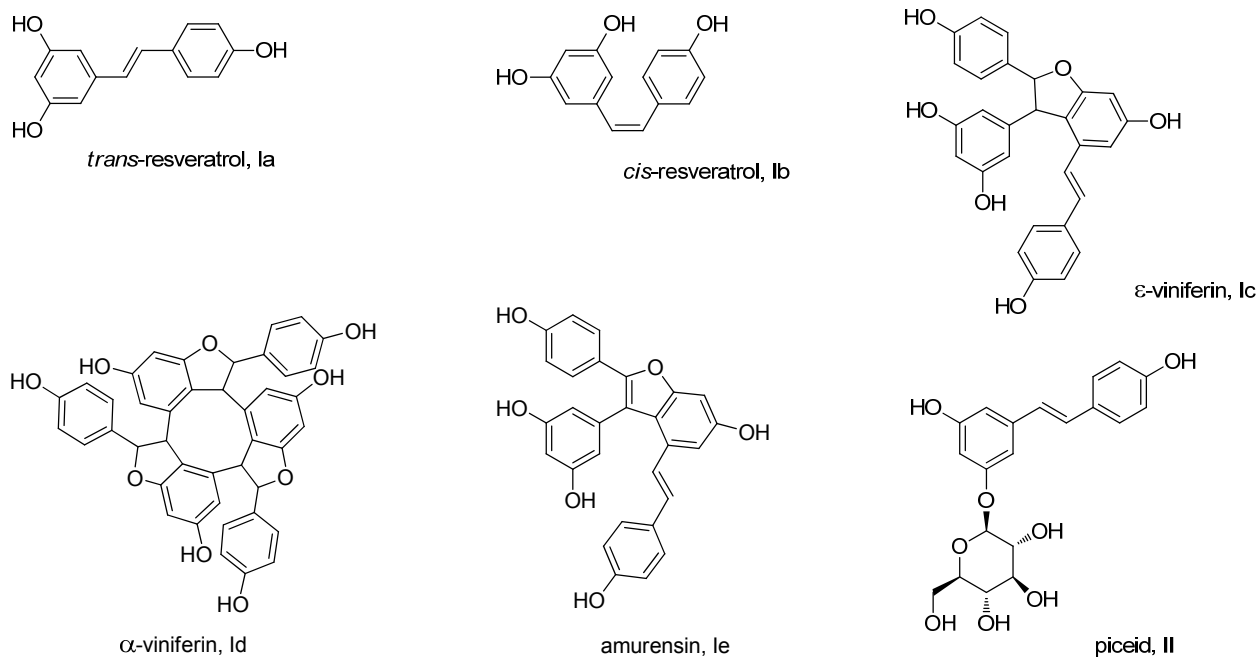
Resveratrol působí proti srážlivosti krve a potlačuje aktivitu cyklooxygenasy-1 (COX-1) a hyperoxidas. V běžné potravě jsou obsažena jen stopová množství resveratrolu, který v těchto dávkách k prevenci rakoviny nestačí. Při testech na laboratorních zvířatech byla zjištěna účinná denní dávka k prevenci rakoviny cca 500 μ g. Pro člověka by to bylo zhruba 500 mg na den úměrně jeho hmotnosti⁵.

Resveratrol se běžně v malém množství nachází v potravinách denní potřeby, viz tab. I.

Výzkum posledních několika let byl zaměřen též na stanovení resveratrolu nejen ve víně jako nápoji, ale i v rostlinném materiálu révy vinné (*Vitis vinifera* L.).

V roce 2004 Lachman a spol.⁶ analyzovali 12 odrůd révy vinné ze sklizně ročníku 2001–2002. Byl stanoven obsah *trans*-resveratrolu metodou HPLC/DAD. Průměrné roční obsahy *trans*-resveratrolu v letech 2001 a 2002 dosahovaly hodnot 0,82.10⁻² mg kg⁻¹ sušiny a 4,97.10⁻² mg kg⁻¹ sušiny ve slupkách hroznů a 52,7.10⁻² mg kg⁻¹ sušiny a 4,63.10⁻² mg kg⁻¹ sušiny v semenech, v moštu byl obsah *trans*-resveratrolu zanedbatelný. V obsazích *trans*-resveratrolu byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi ročníky.

Faitová a spol.⁷ ve stejném roce analyzovali 76 vzorků bílého vína odrůdy Ryzlink rýnský vyrobeného v České republice z různých vinařských oblastí a roků

Obr. 1. Chemická struktura isomerů resveratrolu a jeho derivátů⁴Tabulka I
Koncentrace resveratrolu v běžných druzích potravin⁴

Rostlina	Resveratrol ^a [mg kg ⁻¹ suš.]	Sušina [%]	Resveratrol ^b [mg kg ⁻¹ č.p.]	Množství [kg] obsahující 1 mg resveratrolu
Zelí čínské	9	5	0,5	2,2
Kapusta hlávková	7	14	1,0	1,0
Kapusta růžičková	15	17	2,6	0,4
Zelí červené	15	16	2,4	0,4
Zelí bílé	8	7	0,6	1,8
Brokolice	15	12	1,8	0,6
Čekanka	20	5	1,0	1,0
Petržel naťová	5	19	1,0	1,1
Mrkev karotka	4	10	0,4	2,5
Červená řepa	8	22	1,8	0,6
Česnek	2	29	0,6	1,7
Cibule žlutá	17	9	1,5	0,7
Cibule červená	12	9	1,1	0,9
Podzemnice olejná	2	94	1,9	0,5
Čajovník čínský	1	94	0,9	1,1

^a Resveratrol – obsah resveratrolu v sušině, ^b Resveratrol – obsah resveratrolu v čerstvé potravine, sušina – procento sušiny v potravine

sklizně. Byl stanoven obsah *trans*-resveratrolu metodou HPLC/DAD. Hodnoty *trans*-resveratrolu v českém regionu byly stanoveny v rozmezí 0,033–0,421 mg l⁻¹ (průměrný obsah 0,117 mg l⁻¹), v moravském regionu od 0,033 do 0,875 mg l⁻¹ (průměrný obsah 0,123 mg l⁻¹).

Rayne a spol.⁸ v roce 2008 odebrali k analýze vzorky stébel odrůdy Pinot Noir. Materiál byl po vysušení při teplotě 45 °C extrahován směsí ethanol:voda (80:20). Extrakt byl podroben analýze HPLC/DAD. Bylo stanoveno množství *trans*-resveratrolu 3,45 ± 0,04 mg v 1 g sušiny.

Analýzy rozmanitých vedlejších produktů vinohradnictví pokračují i nadále. Například pokrutiny jsou velmi důležitým vedlejším produktem výroby oleje z hroznových semínek a také obsahují určité množství resveratrolu.

Vedle běžně používané metody HPLC/DAD lze ke stanovení stilbenů využít kombinaci kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS nebo LC/TMS), která nabývá v posledních letech stále většího významu. Je to rychlá a vysoce citlivá metoda, pomocí níž lze stanovit i velmi nízké koncentrace analytů ve vzorcích. V tandemovém hmotnostním spektrometru jsou umístěny dva hmotnostní spektrometry, mezi nimi dochází k rozbití analyzovaného molekulárního iontu na fragmenty (kolizní cela). Podle spektra fragmentů lze pak potvrdit identitu dané látky.

Cílem práce bylo stanovení *trans*-/*cis*-resveratrolu a *trans*-/*cis*-piceidu v pokrutinách, což jsou pevné zbytky po vylisování oleje ze semínek hroznů. Jedná se o odpadní produkt ve vinohradnictví, zatím bez většího využití, který by mohl být využit pro extrakci (izolaci) resveratrolu, případně jako krmivo pro hospodářská zvířata.

Experimentální část

Rostlinný materiál

Vzorky pokrutin byly odebrány ze dvou vinařských oblastí České republiky – Mělníka a Prahy-Grébovky, ze sklizně v letech 2012 a 2013.

K produkci oleje a žisku pokrutin lisováním semen bylo zvoleno 7 odrůd, čtyři modré a tři bílé odrůdy: Rulandské modré, Svatovavřínecké, Zweigeltrebe, Dornfelder, Rulandské šedé, Hibernal a Ryzlink rýnský.

Použité chemikálie

Pro extrakci a chromatografickou separaci vzorků byly použity následující chemikálie: ethylacetát p.a. (99,7%, Lach-Ner s.r.o. Česká republika), methanol p.a. (99,5%, Lach-Ner s.r.o. Česká republika), methanol HPLC Gradient grade (99,9%, Fisher Scientific, Velká Británie), acetonitril HPLC Super gradient (99,9%, POCH S.A. Polsko), ledová kyselina octová (99,5–100,5%, Sigma-Aldrich, USA), resveratrol: 3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilben, HPLC (99,7%, Sigma-Aldrich, USA), piceid: 3,4',5-trihydroxystilben-3-*O*-β-D-glukopyranosid, HPLC (95%, Extrasynthese, Francie), deionizovaná voda (Millipore Simplicity UV, Francie).

Zvolený postup extrakce rostlinného materiálu vychází z publikované metody Liu a spol.⁹

Bylo naváženo 0,2 g suchého rozemletého vzorku do plastových uzavíratelných kyvet, ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml extrakční směsi methanol:ethylacetát (1:1). Vzorky byly ponechány v extrakční směsi k samovolné extrakci do druhého dne. Následovně byly vzorky umístě-

Tabulka II
Podmínky HPLC analýzy

Parametr	Hodnota
Kapalinový chromatograf	UltiMate 3000 RS (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, USA)
Analytická kolona	Pinnacle DB C18 (50 × 2,1mm, 1,9 μm, RESTEK, USA)
Mobilní fáze	acetonitril (A), 0,1% kyselina octová (B)
Eluce	gradientová 0,0–0,2 min 5 % A, 95 % B (isokrat.) 0,2–5,0 min 65 % A, 35 % B (lin.gr.) 5,0–5,2 min 90% A, 10 % B (lin.gr.) 5,2–6,5 min 90% A, 10 % B (isokrat.) 6,5–7,0 min 5% A, 95 % B (lin.gr.) 7,0–9,0 min 5% A, 95 % B (isokrat.)
Průtok	0,35 ml min ⁻¹
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Objem nástřiku	1 μl
Doba analýzy	9 min

ny na 10 min do ultrazvukové lázně (Notus Powersonic s.r.o., Vrable, Slovensko) k podpoře rozpouštění látek, dále byly odstředěny po dobu 5 min v centrifuze Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo), ($G = 11,5$).

Supernatant byl převeden do 50ml odparných baněk a celý postup extrakce byl dvakrát opakován s 5 ml směsi methanol:ethylacetát (1:1). Spojené extrakty byly odpařeny do sucha na vakuové rotační odparce při 40 °C (Buchi, Švýcarsko) a odparek byl rozpuštěn v 5 ml methanolu.

Extrakt byl přefiltrován přes mikrofiltr PVDF 0,22 μm do tmavých vialek a byl podroben UHPLC-ESI/MS/MS analýze dle podmínek uvedených v tab. II.

Detekce

Byl použit hybridní trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí (3200 QTRAP; AB Sciex, Foster City, USA), zdroj ESI (electro-spray ionisation). Podmínky ve zdroji jsou uvedeny v tab. III. Parametry metody viz tab. IV. Vyhodnocení dat bylo provedeno programem Analyst 1.4 Software.

Tabulka III
Podmínky ve zdroji

Parametr	Hodnota
Ochranný plyn	30 psi
Kolizní plyn	střední
Napětí zdroje	−4500 V
Teplota	600 °C
Zmlžovací plyn	50 psi
Turboplyn	30 psi

Tabulka IV
Parametry metody pro stanovení

Analyt	přechod	MRM negativní iontový mód ^a							
		Q1 hmota [Da]	Q3 hmota [Da]	čas [ms]	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
<i>cis</i> -, <i>trans</i> - piceid	kvantifikační	389,0	227,1	100	−45	−10	−20	−40	−3
	konfirmační	389,0	185,0	100	−45	−10	−20	−25	−3
<i>cis</i> -, <i>trans</i> - resveratrol	kvantifikační	226,9	143,0	100	−40	−10	−20	−30	−3
	konfirmační	226,9	185,1	100	−40	−10	−20	−50	−3

^a DP – deklasterační potenciál; EP – vstupní potenciál; CEP – vstupní potenciál do cely; CE – kolizní energie; CXP – vstupní potenciál z cely

Výsledky a diskuse

Identifikace a kvantifikace

Identifikace analytů ve vzorcích byla provedena porovnáním retenčního času analytů a retenčních časů standardů. Potvrzení identity bylo provedeno srovnáním kvantifikačního a konfirmačního přechodu separovaných analytů a standardů.

Kvantifikace analytů byla provedena metodou externí kalibrace. Do 10ml odměrné baňky byl připraven kalibrační roztok směsného standardu *trans*-piceidu a *trans*-resveratrolu o koncentraci 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Z části kalibračního roztoku byla vytvořena kalibrační sada pro *trans*-formy o koncentracích 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 a 2,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Zbylá část kalibračního roztoku byla umístěna na 90 min pod UV lampu ($\lambda=365$ nm). Po 90 min expozice bylo 85 až 88 % *trans*-forem převedeno na *cis*-formy, další expozice UV záření se již koncentrace *cis*-forem v roztoku nezvyšovala. Z tohoto roztoku byla vytvořena alternativní kalibrační sada pro *cis*-formy piceidu a resveratrolu. Přesná koncentrace *cis*-forem byla vypočítána z poklesu ploch chromatografických píků příslušných *trans*-forem obou analytů.

Určení limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ)

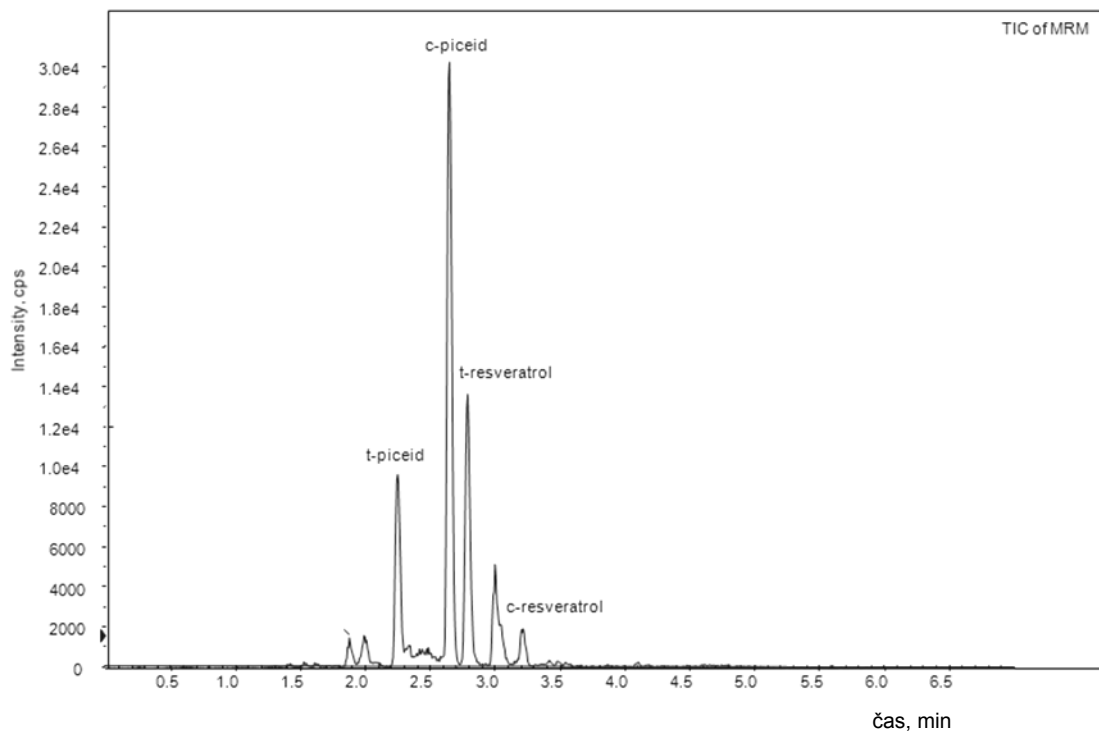
Detekční (LOD) a kvantifikační limity (LOQ) byly určeny na základě postupu, který byl popsán v rámci mezinárodní konference o harmonizaci¹⁰. Metoda je založena na stanovení třech různých koncentrací, nacházejících se blízko k limitu detekce (koncentrace *trans*- a *cis*-piceidu a *cis*-resveratrolu 0,005 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 0,0025 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 0,001 $\mu\text{g ml}^{-1}$; *trans*-resveratrolu 0,01 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 0,005 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 0,0025 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Každá koncentrace standardního roztoku byla dávkována do HPLC pětkrát za účelem získání pěti kalibračních přímk. Z pěti průměrných hodnot směrnice přímk (S) a směrodatných odchylek průsečíků na ose Y (σ) byly vypočteny příslušné hodnoty LOD a LOQ limitů pomocí vzorců $3,3 \cdot \sigma/S$ resp. $10 \cdot \sigma/S$ (tab. V).

Vyvinutá UHPLC-MS/MS metoda stanovení polyfenolických látek typu stilbenů byla použita pro stanovení

Tabulka V

Meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) stanovení studovaných analytů metodou UHPLC–ESI/MS/MS

Analyt	LOD [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	LOD [$\mu\text{g g}^{-1}$ suš.]	LOQ [$\mu\text{g g}^{-1}$ suš.]
<i>trans</i> -piceid	0,001	0,003	0,025	0,075
<i>cis</i> -piceid	0,001	0,003	0,025	0,075
<i>trans</i> -resveratrol	0,003	0,009	0,075	0,225
<i>cis</i> -resveratrol	0,001	0,004	0,025	0,075

Obr. 2. Chromatogram sledovaných analytů (*trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol) v odrůdě Zweigeltrebe

cis- a *trans*-resveratrolu a *cis*- a *trans*-piceidu v pokrutinách získaných po vylisování oleje ze semen různých odrůd révy vinné sklizené v letech 2012 a 2013. Chromatogram sledovaných analytů v odrůdě Zweigeltrebe je uveden na obr. 2.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány ve třech paralelních opakováních (tab. VI a VII) s průměrnou relativní směrodatnou odchylkou *trans*-piceidu 5,74 %, *trans*-resveratrolu 8,20 %, *cis*-piceidu 4,30 % a *cis*-resveratrolu 11,62 %.

Na základě provedených analýz lze konstatovat, že největší zastoupení v pokrutinách všech odrůd má *trans*-resveratrol, následovaný pro většinu odrůd *trans*-piceidem. *cis*-Formy jsou až na výjimky (Rulandské modré a Svato-vavřínecké) zastoupeny minoritně. V pokrutinách některých odrůd ze sklizně v roce 2012 byly obsahy *cis*-forem dokonce pod mezí detekce. Obsah jednotlivých analytů je odrůdově závislý. Nejvyšší obsahy *cis*- a *trans*-resveratrolu byly stanoveny v pokrutinách odrůd Ruland-

ské modré (*trans*-resveratrol $17,1 \pm 1,68 \mu\text{g g}^{-1}$ resp. $24,4 \pm 1,59 \mu\text{g g}^{-1}$; *cis*-resveratrol $3,28 \pm 0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ resp. $6,43 \pm 0,29 \mu\text{g g}^{-1}$) a Zweigeltrebe (*trans*-resveratrol $15,4 \pm 0,21 \mu\text{g g}^{-1}$ resp. $14,8 \pm 1,51 \mu\text{g g}^{-1}$; *cis*-resveratrol $2,14 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ resp. $2,12 \pm 0,24 \mu\text{g g}^{-1}$) pěstovaných v Mělníku. Nejvyšší obsah *trans*-piceidu byl stanoven v pokrutinách odrůdy Hibernal ($3,97 \pm 0,17 \mu\text{g g}^{-1}$) ze sklizně v roce 2013. Nejvyšší obsah *cis*-piceidu byl stanoven v pokrutinách odrůdy Dornfelder ($2,49 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$) pěstované v Praze-Grébovce opět v roce 2013.

Významný vliv na obsah *cis*- a *trans*-resveratrolu a piceidu bude mít pravděpodobně i pěstební lokalita. Pokrutiny z odrůdy Rulandské modré pěstované v Mělníku i Praze-Grébovce mají několikanásobně vyšší obsah *cis*- a *trans*-resveratrolu pokud jsou původem z vinné révy z lokality Mělník, obsahy *cis*- a *trans*-piceidu jsou však srovnatelné. Na základě dosažených výsledků lze rovněž předpokládat, že i v jiných odrůdách pěstovaných

Tabulka VI
Obsah analytů [$\mu\text{g g}^{-1}$] ve vzorcích z roku 2012 a 2013

Pokrutiny ^a	Rok	t-pic ^b	t-res ^c	c-pic ^d	c-res ^e
Rulandské modré <i>G</i>	2012	2,14 ± 0,11	2,91 ± 0,37	0,59 ± 0,02	0,17 ± 0,01
Rulandské modré <i>G</i>	2013	3,48 ± 0,12	1,85 ± 0,45	0,62 ± 0,02	0,06 ± 0,03
Svatovavřínecké <i>M</i>	2012	2,64 ± 0,23	2,69 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,11 ± 0,02
Svatovavřínecké <i>M</i>	2013	2,66 ± 0,08	12,2 ± 0,41	2,45 ± 0,09	3,09 ± 0,14
Rulandské šedé <i>G</i>	2012	1,96 ± 0,11	1,04 ± 0,09	<LOD	<LOD
Rulandské šedé <i>G</i>	2013	3,74 ± 0,00	2,64 ± 0,06	1,48 ± 0,06	0,14 ± 0,01
Zweigeltrebe <i>M</i>	2012	3,16 ± 0,76	15,4 ± 0,21	1,08 ± 0,05	2,14 ± 0,08
Zweigeltrebe <i>M</i>	2013	2,51 ± 0,17	14,8 ± 1,51	1,90 ± 0,22	2,12 ± 0,24
Dornfelder <i>G</i>	2012	2,13 ± 0,06	3,96 ± 0,41	0,52 ± 0,02	0,32 ± 0,04
Dornfelder <i>G</i>	2013	2,86 ± 0,20	7,36 ± 0,84	2,49 ± 0,06	0,84 ± 0,03
Rulandské modré <i>M</i>	2012	1,80 ± 0,03	17,1 ± 1,68	0,83 ± 0,04	3,28 ± 0,11
Rulandské modré <i>M</i>	2013	2,53 ± 0,21	24,4 ± 1,59	1,25 ± 0,08	6,43 ± 0,29
Hibernal <i>G</i>	2012	1,03 ± 0,02	5,28 ± 0,13	<LOD	<LOD
Hibernal <i>G</i>	2013	3,97 ± 0,17	8,80 ± 0,35	1,44 ± 0,01	0,20 ± 0,03
Ryzlink Rynský <i>M</i>	2012	0,58 ± 0,01	3,51 ± 0,03	<LOD	<LOD
Ryzlink Rynský <i>M</i>	2013	1,98 ± 0,14	10,8 ± 2,44	0,60 ± 0,01	0,15 ± 0,03

^a G – Praha-Grébovka, M – Mělník; ^b t-pic – *trans*-piceid, ^c t-res – *trans*-resveratrol, ^d c-pic – *cis*-piceid, ^e c-res – *cis*-resveratrol; LOD v [$\mu\text{g ml}^{-1}$]: t-pic=0,001, c-pic=0,001, t-res=0,003, c-res=0,001

Tabulka VII
Specifikace výběrového souboru dat z tab. VI

Pokrutiny ^a	Rok	Min ^b [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Max ^c [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Průměr ^d [$\mu\text{g g}^{-1}$]	σ ^e [$\mu\text{g g}^{-1}$]	s_r ^f [%]
t-pic	2012	0,58	3,16	1,93	0,82	42,7
t-pic	2013	1,98	3,97	2,97	0,69	23,3
t-res	2012	1,04	17,1	6,49	6,17	95,0
t-res	2013	1,85	24,4	10,36	7,21	69,6
c-pic	2012	0,00	1,08	0,45	0,41	91,8
c-pic	2013	0,60	2,49	1,53	0,73	47,5
c-res	2012	0,00	3,28	0,75	1,25	166
c-res	2013	0,06	6,43	1,63	2,23	137

^a t-pic – *trans*-piceid, t-res – *trans*-resveratrol, c-pic – *cis*-piceid, c-res – *cis*-resveratrol; ^b min – minimální hodnota, ^c max – maximální hodnota, ^d průměr – průměrná hodnota, ^e σ – směrodatná odchylka, ^f s_r – relativní směrodatná odchylka

v Mělníku je možné očekávat vyšší obsahy *cis*- a *trans*-resveratrolu.

Obsahy analytů v pokrutinách většiny odrůd z roku 2013 jsou mírně vyšší ve srovnání s rokem 2012, což může souviset s vlivem počasí během pěstování, výskytem chorob a škůdců v daném roce. Vinařský ročník 2012 byl extrémně suchý, na rozdíl od roku 2013, který patřil k jednomu z nejlepších vinařských ročníků dle průběhu počasí.

Závěr

V této práci byla vyvinuta a testována metoda UHPLC-ESI/MS/MS pro stanovení *cis*- a *trans*-resveratrolu a piceidu v pokrutinách ze semen révy vinné. Metoda je vhodná pro stanovení těchto analytů v koncentraci nejméně 0,009 $\mu\text{g ml}^{-1}$ extraktu. Průměrná relativní směrodatná odchylka 3 paralelních stanovení

nepřesáhla 12 %. Touto metodou byly stanoveny obsahy *cis*- a *trans*-resveratrolu a piceidu v pokrutinách získaných lisováním semen různých odrůd révy vinné pěstované ve dvou různých lokalitách. První výsledky naznačují, že obsahy sledovaných analytů jsou odrůdově závislé a zároveň jsou ovlivněny i ročníkem a lokalitou pěstování révy vinné.

Poděkování MZe, 111B107 NAZV, Výzkum získávání a využití biologicky aktivních látek (BAL) ze semen vinných hroznů pro zlepšení metabolismu hospodářských zvířat jako podklad pro návrh nejlepší dostupné techniky (BAT) a MZe čj. 20139/2006-13020, Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity.

LITERATURA

- Harmatha J.: Chem. Listy 99, 622 (2005).
- Parr A. J., Bolwell G. P.: J. Sci. Food Agr. 80, 985 (2000).
- Zloch Z.: Voj. Zdrav. Listy 5, 226 (2003).
- Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., Buckiová D., Křisa B.: Chem. Listy 95, 602 (2001).
- Melzoch K., Hanzlíková I., Filip V., Buckiová D., Šmidrkal J.: Agric. Conspec. Sci. 66, 53 (2001).
- Lachman J., Šulc M., Hejtmánková A., Pivec V., Orsák M.: Hort. Sci. (Prague) 31, 63 (2004).
- Faitová K., Hejtmánková A., Lachman J., Pivec V., Dudjak J.: Czech J. Food Sci. 22, 215 (2004).
- Rayne S., Karacabey E., Mazza G.: Ind. Crops Prod. 2008, 335.
- Liu C., Wang L., Wang J., Wu B., Liu W., Fan P., Liang Z., Li S.: Food Chem. 136, 643 (2013).
- International Conference on Harmonization (ICH): Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, Geneva, 6th November 1996.

O. Pšeničnaja^a, Z. Kotíková^a, A. Hejtmánková^a, J. Lachman^a, V. Pivec^a, R. Střalková^b, and M. Dědina^c
^a Department of Chemistry, Czech University of Life Sciences Prague, ^b Viticulture Research Station, Karlštejn, ^c Research Institute of Agricultural Engineering, Prague):
The Use of UHPLC-ESI/MS/MS Method for the Determination of Stilbene Type Polyphenols

This paper deals with the determination of *cis*-/*trans*-resveratrol and piceid in the cake formed from the grape seeds by introducing and testing of the UHPLC-ESI/MS/MS method. The cake is a solid residue remaining after pressing oil from grape seeds. It is a waste product in viticulture, which can be used for the extraction (isolation) of resveratrol, or as a dietary supplement for cattle. Samples were selected from the harvests of 2012 and 2013 from two different locations in the Czech Republic: Prague-Grébovka and Mělník.

First results indicate that the concentrations of analytes are varietal dependent and affected also by the location and the year of the harvest. The highest levels of *cis*- and *trans*-resveratrol were found in the cake of Pinot Noir and Zweigeltrebe variety. The values of *trans*-resveratrol obtained for 2012 and 2013 in Pinot Noir variety were $17.1 \pm 1.7 \mu\text{g g}^{-1}$ and $24.4 \pm 1.6 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively, in *cis*-resveratrol $3.3 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ and $6.4 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively. The values of *trans*-resveratrol obtained for 2012 and 2013 in Zweigeltrebe variety were $15.4 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ and $14.8 \pm 1.5 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively, in *cis*-resveratrol $2.1 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ and $2.1 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. Both varieties have grown in Mělník.

The highest content of *trans*-piceid was found in the cake of Hibernál variety ($3.9 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$) from the harvest of 2013. The highest content of *cis*-piceid was determined in the cake of Dornfelder variety ($2.5 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$) grown in Prague-Grébovka in 2013.