

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Zuzana Neoralová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ
RESVERATROLU A JEHO DERIVÁTŮ**

Zuzana Neoralová

Bakalářská práce

2012

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

**ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION
OF RESVERATROL AND ITS DERIVATES**

Zuzana Neoralová

Bakalářská práce

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana Neoralová**
Osobní číslo: **C09143**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Analytické metody stanovení resveratrolu a jeho derivátů**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :


Vypracujte literární rešerši zabývající se stanovením resveratrolu a jeho derivátů v různých matricích.

1. Charakterizujte sloučeninu resveratrol. Vyhledejte a popište i deriváty resveratrolu, které se vyskytují společně s ním.
2. Vyhledejte, v jakých matricích (rostlinách, potravinách, nápojích) se resveratrol společně s deriváty nejčastěji vyskytuje.
3. Podrobně prostudujte analytické metody stanovení resveratrolu a derivátů a zaměřte se i na přípravu vzorku před vlastní analýzou v závislosti na matici i použité analytické metodě.


Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Blanka Beňová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. února 2012**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2012

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem k práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 19. 6. 2012

Zuzana Neoralová

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Blance Beňové, PhD., za cenné rady k vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům a blízkým přátelům za trpělivost a podporu v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá resveratolem, piceidem, piceatannolem a astringinem. První část práce je věnována charakteristice těchto látek, jejich účinkům na organismus a jejich výskytu v přírodě, především pak v potravinách.

V druhé části jsou popsány analytické metody, které slouží ke stanovení resveratrolu a jeho derivátů. Jsou zde uvedeny principy metod, popis příslušných aparatur a způsoby vyhodnocení výsledků.

Třetí část se zabývá konkrétními analýzami uvedených látek v potravinách. Jsou zde uvedeny analýzy různých vín, bobulí nebo bylin, ale i čokolády a chmelu. Ve všech případech je popsána úprava vzorků, podmínky analýzy i shrnutí výsledků.

Klíčová slova: Stilbeny, resveratrol, HPLC, víno, francouzský paradox

ANNOTATION

This thesis deals with resveratrol, piceid, piceatannol and astringin. The first part is devoted to the characteristics of these substances, their effects on the human organism and their occurrence in nature, especially in foodstuffs.

The second part describes the analytical methods used to determine resveratrol and its derivatives. There are presented the principles of methods, description of the apparatus and methods of evaluation results.

The third part deals with the concrete analysis of these substances in food. There are presented the analysis of different wines, berries or herbs, but also chocolate and hops. In all cases is described the sample preparation, analysis and summary of the results.

Keywords: Stilbenes, Resveratrol, HPLC, Wine, French Paradox

Obsah

1	Úvod	12
2	Resveratrol a jeho deriváty	13
2.1	Resveratrol	13
2.1.1	Výskyt v rostlinách	14
2.1.2	Účinky na organismus	15
2.1.3	Francouzský paradox	16
2.2	Piceid	16
2.3	Piceatannol	17
2.4	Astringin	18
2.5	Pinosylvin	18
2.6	Pterostilben	18
3	Analytické metody	20
3.1	Chromatografické separační metody	20
3.1.1.	Základní pojmy	20
3.1.2.	Chromatografie v plošném uspořádání	21
3.1.3.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	22
3.1.4.	Plynová chromatografie	24

3.1.5.	Kapilární elektroforéza	26
4	Konkrétní případy stanovení resveratrolu a jeho derivátů.....	27
4.1	Stanovení stilbenů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	27
4.1.1.	Stanovení stilbenů v pivě.....	27
4.1.2.	Stanovení stilbenů ve vínech	28
4.1.3.	Stanovení stilbenů v bylinkách.....	35
4.1.4.	Stanovení stilbenů v kakau a čokoládě.....	36
4.2	Stanovení stilbenů pomocí plynové chromatografie	37
4.3	Stanovení stilbenů pomocí kapilární elektroforézy	38
4.4	Stanovení resveratrolu pomocí planárních chromatografických technik	41
5	Závěr	43
	Literatura	44

Seznam zkratek

APCI	Elektrochemická ionizace za atmosférického tlaku, Atmospheric-Pressure Chemical Ionization
C18	Oktadecylsilan
CZE	Kapilární elektroforéza, Capillary Zone Electrophoresis
ECD	Detektor elektronového záchytu, Electron Capture Detector
DAD	Detektor diodového pole, Diode Array Detector
EI	Elektronová ionizace, Electron Ionization
ESI	Ionizace elektrosprejem, Electrospray Ionization
FID	Plamenový ionizační detektor, Flame Ionization Detector
GC	Plynová chromatografie, Gas Chromatography
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	Vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě, High Performance Thin Layer Chromatography
LC	Kapalinová chromatografie, Liquid Chromatography
MS	Hmotnostní spektrometrie, Mass Spectrometry
NP	Normální fáze, Normal Phase
RP	Reverzní fáze, Reverse Phase
SIM	Sledování vybraného iontu, Selected Ion Monitoring
SKE	Nasyčená kalomelová elektroda
SPE	Extrakce pevným sorbentem, Solid Phase Extraction
TCD	Tepelně-vodivostní detektor, Thermal Conductivity Detector

1 Úvod

Vzhledem ke zhoršujícímu se životnímu stylu lidí budí antioxidanty v dnešní době mnohem větší pozornost než dříve. Tato bakalářská práce se proto zabývá resveratrolem a jeho deriváty.

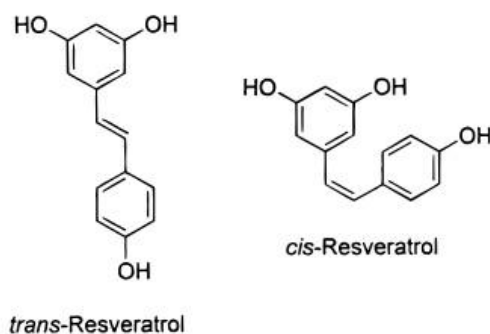
V dnešní době se setkáváme s mnoha antioxidanty, právě resveratrol a jeho deriváty však představují velice zajímavé téma. Resveratrol je totiž známý především díky přítomnosti ve víně. Tento nápoj je díky rostoucí kvalitě domácích vín stále častěji vyhledáván i lidmi v České republice. Konzumenty zajímá dopad na zdraví, který je v tomto případě velmi pozitivní. Důsledkem antioxidačního účinku resveratrolu je např. zánik škodlivých radikálů a zvýšená odolnost organismu proti stárnutí. Obzvláště ve Francii jsou vína pravidelnou součástí jídelníčku, což v kombinaci s lepším zdravotním stavem Francouzů vedlo k rozvoji studie tzv. „francouzského paradoxu“.

Antioxidanty jdou v dnešní době módní záležitostí, dají se tedy zakoupit ve formě různých preparátů. Kombinací vhodných potravin je však možné si jejich dostatečný přísun zajistit i každodenní stravou.

2 Resveratrol a jeho deriváty

2.1 Resveratrol

Resveratrol je triviální název pro polyfenolickou sloučeninu 3,4',5 –trihydroxystilben, jejíž struktura je znázorněna na obrázku 1. Z názvu vyplývá, že jde o derivát stilbenu. V přírodě se však často vyskytuje i ve formě glykosidů.



Obrázek 1- Chemická struktura isomerů resveratrolu [1]

Resveratrol se vyskytuje v obou isomerních formách, tedy jako *cis*- nebo *trans*-resveratrol. Aktivní formou je právě *trans*-resveratrol, který se vlivem tepla nebo UV-záření přeměňuje na *cis*- formu. Přeměna *cis*- formy na *trans*- je způsobena naopak nízkým pH, vysokou teplotou nebo působením viditelného světla. Resveratrol je pevná látka a jeho molekulová hmotnost je 228,243 g/mol. Jeho hustota je 1,36 g/cm³, tedy větší než hustota vody, a bod varu 261 °C.

Prekurzorem pro biosyntézu resveratrolu jsou glykosidy, ze kterých vzniká fenylalanin. Z toho po několika reakcích a díky působení resveratrol synthasy vzniká právě resveratrol. Izolace čistého resveratrolu je experimentálně náročná, protože je většinou doprovázen větším množstvím sloučenin podobné struktury.

Resveratrol byl poprvé izolován z kýchavice velkokvěté (*Veratrum grandiflorum*), později byl však nalezen ve více než 72 rostlinných druzích. Tento počet se ovšem stále zvyšuje. Některé z těchto rostlin jsou odjakživa součástí stravy člověka, jako např. vinná réva (*Vitis vinifera*) a víno, zelenina, ořechy a bylinky [2-5].

2.1.1 Výskyt v rostlinách

V rostlinách se většinou vyskytuje směs obou isomerů, v převaze však bývá *trans*-forma. Tato forma zároveň vykazuje vyšší antioxidační účinky na organismus. Rostliny produkují resveratrol především pokud jsou ve stresu, při vystavení UV- záření, nebo při napadení mikroorganismy, aby je ochránil. Například při napadení vinné révy plísněmi je dosaženo maximální koncentrace *trans*-resveratrolu 24–96 hodin po napadení, pak začne koncentrace klesat a asi po 16 dnech se vrátí na původní hodnotu. Obsah resveratrolu závisí na druhu a odrůdě rostliny, na podnebí a podmínkách během růstu. Liší se ovšem i v různých částech konkrétní rostliny. V místě napadení je jeho koncentrace nízká, v nejbližším okolí je maximální a s rostoucí vzdáleností od místa nákazy opět klesá. Obecně tedy platí, že čím příznivější podmínky pro růst rostlina má, tím je obsah resveratrolu v ní nižší. Rostliny však neprodukují resveratrol pouze jsou-li vystaveny nákaze, ale do jisté míry také preventivně.

Resveratrol se nachází především ve slupkách hroznů a grepu, v arašídech, černém rybízu, borůvkách, brusinkách, moruších a v bylinkách. Jeho vysoký obsah je však i v červeném zelí, řepě, brokolici, nebo růžičkové kapustě. V tabulce 1 jsou uvedeny některé potraviny obsahující resveratrol, včetně hodnot odpovídajících jedné porci.

Tabulka 1- Příklady potravin obsahujících resveratrol [6]

Food	<i>trans</i> -Resveratrol ($\mu\text{g/L}$ or $\mu\text{g/kg}$)	<i>cis</i> -Resveratrol ($\mu\text{g/L}$ or $\mu\text{g/kg}$)	Total resveratrol ($\mu\text{g/L}$ or kg)	Serving (g or mL)	Total resveratrol ($\mu\text{g/serving}$)
Red wine	1810	440	8470	150	1270
White wine	100	160	740	150	111
Grapes, not specified	1560	–	2230	100	223
Grape juice	100	tr	890	250	222
Peanuts, toasted	60	–	60	30	1.8
Pistachios, toasted	70	–	70	30	2.1
Berries, not specified	80	–	80	50	4.0
Tomatoes ^a	11	1.7	12.6	100	1.3
Chocolate, not specified ^b	692	–	3325	10–40	88
Beer, not specified ^c	9	3.1	14.7	330	4.8

Jedním z nejbohatších zdrojů resveratrolu jsou kořeny křídlatky kopinaté (*Polygonum cuspidatum*). Mezi další bohaté zdroje patří listy a kořínky kýchavice (*Veratrum grandiflorum*, *V. formosanum*). Všechny tyto rostliny se používají především v Japonsku a Číně, jako významné složky tradiční medicíny. V nižších koncentracích se resveratrol vyskytuje i ve chmelu a kakau.

Díky vysokému obsahu resveratrolu v hroznech vinné révy jsou často předmětem analýz právě vína. V tomto případě je resveratrol během výroby extrahován ze slupek vinné révy, což vysvětluje rozdílný obsah v červených a bílých vínech. Červené víno se nechává kvasit i se slupkami, umožňuje tedy extrakci většího množství resveratrolu. Střední koncentrace resveratrolu v červených vínech je 2–6 mg/l, v bílých vínech je jeho koncentrace znatelně nižší, a to přibližně 0,2–0,8 mg/l.

V dnešní době je resveratrol k dostání i ve formě preparátů, které slouží jako doplňky stravy. Jejich výhodou proti rostlinným zdrojům je vysoká koncentrace resveratrolu. Na rozdíl od vína tyto preparáty neobsahují alkohol a pro získání požadovaného množství resveratrolu není tedy nutné zatěžovat zbytek organismu, především játra. Jejich nevýhodou je ovšem vysoká cena [2-5].

2.1.2 Účinky na organismus

Resveratrol je pro organismus prospěšný především díky svým silným antioxidačním vlastnostem, čímž chrání buňky před škodlivými kyslíkovými radikály. Po požití resveratrolu dochází k jeho vysoké absorpci, ale zároveň k velmi rychlému odbourání. Jeho antioxidační účinek je 20x silnější než u vitamínu C, 5x silnější než u beta karotenu a 50x silnější než u vitamínu E [5].

Resveratrol působí na jednotlivé buňky, čímž chrání celý organismus člověka. Dokáže až 13x zvýšit aktivitu určité skupiny proteinů, tzv. sirtuinů, čímž dojde k aktivaci enzymů, které následně chrání dědičnou informaci v buňkách před poškozením. Důležité geny pak vydrží déle a odolávají rakovinnému bujení. Resveratrol navíc dokáže zpomalovat degenerativní procesy v mozku při některých neurologických onemocněních. Dále podporuje imunitu a obnovu tkání, zabraňuje nadměrnému srážení krve a má příznivý vliv na kardiovaskulární systém. Má protizánětlivé účinky, při léčení rakoviny pak snižuje negativní účinky chemoterapie. Pozitivně působí i na plíce, ovlivňuje metabolismus lipidů

a zabraňuje usazování cholesterolu v cévách, čímž snižuje riziko embolie, infarktu a aterosklerózy. Resveratrol prokazatelně zvyšuje odolnost buněk proti stresu [2-5,7].

2.1.3 Francouzský paradox

V souvislosti s resveratolem se často mluví o tzv. francouzském paradoxu. Za tímto označením se skrývá fakt, že Francouzi trpí asi o 40% nižším výskytem kardiovaskulárních chorob, než jaký by odpovídal množství tuku, který konzumují v potravě. Na rozdíl od ostatních konzumentů tuků však Francouzi pijí ve zvýšené míře červené víno.

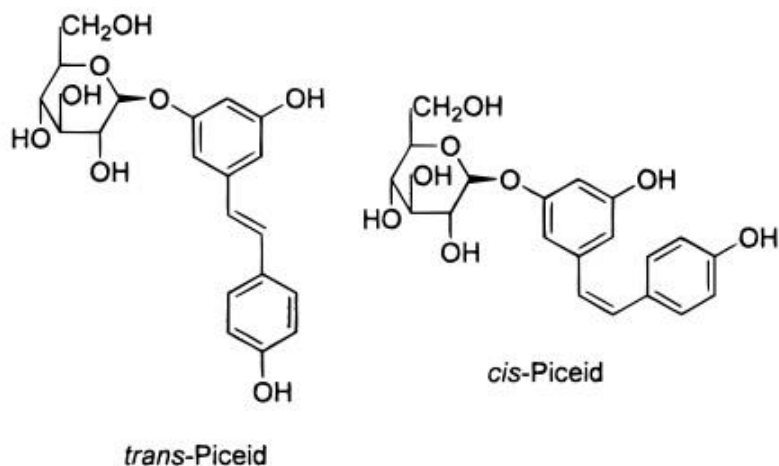
Každý Francouz vypije ročně průměrně 67 litrů vína, zatímco obyvatelé jiných států několikanásobně méně, např. na Američana připadá pouhých 6 litrů. Pravidelná konzumace vína vede k prokazatelným krevním změnám, které pozitivně ovlivňují celý oběhový systém. Tato skutečnost vedla k domněnce, že požívání vína může působit proti účinkům diety s vysokým obsahem tuků, a omezit tak možnost vzniku a rozsah onemocnění věnčitých tepen. Odborníci doporučují mužům pít dva až čtyři decilitry vína denně, ženám přibližně o polovinu méně. Čtyři decilitry červeného vína totiž obsahují v průměru 1 mg resveratrolu, což je z dlouhodobého hlediska účinné množství, které ovlivňuje zdraví člověka.

Za lepší kvalitu zdraví Francouzů však nezodpovídá jen pití vína, ale i další stravovací návyky. Francouzi jsou zvyklí jíst pomalu, menší porce a využívají kvalitní suroviny[4,8].

2.2 Piceid

Piceid je nejvýznamnějším derivátem resveratrolu, konkrétně jeho glykosidem (3-O- β -D-glukosid). Jeho struktura je znázorněna na obrázku 2. Vyskytuje se především v kůře smrku a v kořenech křídlatky. Piceid doprovází resveratrol, vyskytují se tedy ve stejných potravinách. Obě tyto látky mají podobné vlastnosti, piceid se tedy také podílí na ochraně organismu. Stejně jako u resveratrolu probíhá jeho syntéza ve slupkách hroznů. Vzhledem k technologickému postupu při výrobě vín je tedy i jeho obsah vyšší

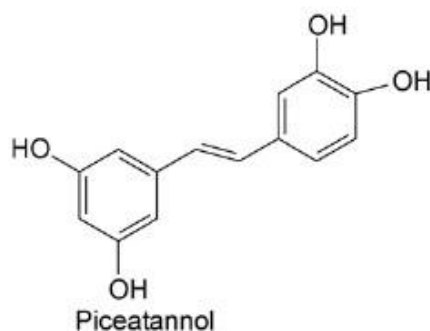
v červených vínech. Dalším zdrojem piceidu jsou arašídny, některé druhy rajčat a čokoláda. V jejich produktech je však jeho množství oproti vínu zanedbatelné [1,6,9].



Obrázek 2- Chemická struktura isomerů piceidu [1]

2.3 Piceatannol

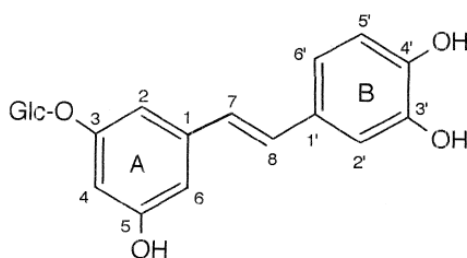
3',4',3,5-tetrahydroxy-*trans*-stilben, tedy piceatannol, je další fenolickou látkou. Svou strukturou je velmi podobný resveratrolu, jak je zřejmé z obrázku 3. Organismus chrání především proti rakovině, protože bojuje proti nádorovým buňkám. V tomto směru je piceatannol účinnější než resveratrol. V přírodě se však vyskytuje pouze v nízkých koncentracích, a to především v kořenech smrku a bylin. Dále však doprovází resveratrol například ve víně [10].



Obrázek 3- Chemická struktura piceatannolu [10]

2.4 Astringin

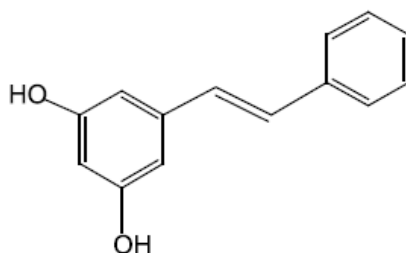
Astringin je další látkou ze skupiny stilbenů, konkrétně glykosid piceatannolu (3'-OH-piceid). Jeho struktura je znázorněna na obrázku 4. Astringin se vyskytuje společně s ostatními fenolickými látkami v hroznech a tedy i ve víně. Dále je v přírodě přítomen například v kůře smrku. Stejně jako resveratrol a piceid má díky svým antioxidačním schopnostem pozitivní vliv na organismus [11].



Obrázek 4- Struktura astringinu [11]

2.5 Pinosylvin

Pinosylvin je triviální název pro látku 3,5-dihydroxy-*trans*-stilben, jejíž struktura je znázorněna na obrázku 5. Patří mezi fungitoxiny a je produkován rostlinami jako prevence před nákazou, jeho obsah se však zvyšuje působením UV-záření. Nachází se především ve dřevě borovic, které chrání před plísňovou infekcí [3,12].

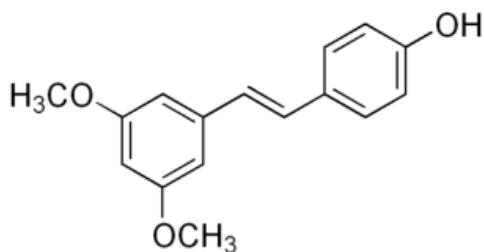


Obrázek 5- Struktura pinosylvinu [12]

2.6 Pterostilben

Pterostilben (*trans*-3,5-dimethoxy-4-hydroxystilben) je dalším derivátem resveratrolu a jeho struktura je znázorněna na obrázku 6. Stejně jako resveratrol má vysoké

antioxidační účinky, chrání organismus před stárnutím a pomáhá snižovat hladinu cholesterolu a cukru v krvi. Oproti resveratrolu se však pterostilben pomaleji metabolizuje, takže je jeho doba antioxidačního působení delší. Nachází se v hroznech a borůvkách a je produkován jako ochrana před nákazou [3,13].



Obrázek 6- Struktura pterostilbenu [3]

3 Analytické metody

3.1 Chromatografické separační metody

Chromatografie patří mezi separační metody používané k analýze složitých směsí, obsahujících látky podobných chemických a fyzikálních vlastností. Základním principem těchto separací je odlišná interakce analytů se stacionární a mobilní fází. Analyty se po přechodu do stacionární fáze snaží dosáhnout termodynamické rovnováhy, která je ovšem narušována průtokem mobilní fáze. Tvorba této rovnováhy je tedy mnohonásobně opakována. Distribuce analytu mezi dvě fáze je popisována distribuční konstantou K_D , kterou rozumíme poměr rovnovážných koncentrací této složky v obou fázích. Nejdéle jsou v koloně zadržovány ty látky, které mají nejvyšší hodnotu K_D (silně se poutají ke stacionární fázi). Naopak jako první opouští kolonu látky, které se stacionární fází reagují méně. Chromatografie umožňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu směsi.

Chromatografická separace probíhá v chromatografu. Grafický výstup z chromatografu se nazývá chromatogram, který zaznamenává závislost signálu z detektoru na čase. Každému analytu odpovídá na chromatogramu jeden pík, jehož vrchol definuje jeho retenční čas (t_R), který je za stejných podmínek konstantní. Identifikace směsi analytů na chromatogramu se tedy provádí porovnáním jejich retenčních časů s údaji z analýzy standardů.

Chromatografické techniky rozdělujeme dle principu dělení (adsorpční, rozdělovací, iontově-výměnná, gelová, afinitní), dle skupenství mobilní fáze (kapalinová, plynová) a dle uspořádání stacionární fáze (kolonová, kapilární, na tenké vrstvě, na papíře) [14-16].

3.1.1. Základní pojmy

- Mobilní fáze: Jako mobilní fáze bývá označována ta fáze, která se v chromatografickém systému pohybuje. Tato fáze vnáší do kolony vzorek a následně odnáší separované složky k detektoru. V plošné chromatografii se mobilní fáze nazývá vyvíjecí činidlo, v plynové pak nosný plyn.

- Stacionární fáze: Jako stacionární fáze bývá označována ta fáze, která je v systému nepohyblivá. Může ji tvořit jak pevná látka, tak film kapaliny zakotvený na povrchu pevné látky.
- Retenční čas: Retenční čas (t_R) je doba, za kterou se analyt dostane k detektoru za kolonou. Někdy bývá nahrazen retenčním objemem (V_R), což je objem mobilní fáze, která proteče kolonou za retenční čas. Vztah mezi těmito veličinami je definován vzorcem $V_R = t_R \cdot F_m$, kde F_m je objemový průtok mobilní fáze.
- Retardační faktor: Pojem retardační faktor (R_F) se používá u plošných technik chromatografie. Tato hodnota vyjadřuje poměr vzdálenosti čela od startu a vzdálenosti středu skvrny sledované látky od startu a pohybuje se od 0 (látky při daných podmínkách stojí na startu) až po 1 (látky jsou unášeny s čelem).

3.1.2. Chromatografie v plošném uspořádání

Tenkovrstvá a papírová chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) se spolu s papírovou chromatografií (PC) řadí mezi chromatografické techniky v plošném uspořádání. Principem těchto metod je rozdělení látek v závislosti na jejich odlišné pohyblivosti v systému 2 fází. Mohou být prováděny ve vzestupném nebo sestupném uspořádání, v druhém případě je však migrace podpořena gravitací. Pro zachování konstantních podmínek, a tedy možnost porovnání získaných dat, jsou vždy stanovovány vzorky i standardy zároveň na jedné destičce. Tenkovrstvá chromatografie se provádí na tenké vrstvě sorbentu (silikagel, oxid hlinitý), která je nanášena na vhodnou destičku (sklo, kovová fólie). Na této destičce je označen start, kam se nanáší vzorky zároveň se standardy. Po zaschnutí nanesených roztoků je destička umístěna do vyvíjecí komory s rozpouštědlem (mobilní fáze) tak, aby vzorky nebyly ponořeny. Separace je ukončena když se čelo začne blížit okraji destičky. V tu chvíli se chromatogram vyndá z vyvíjecí komory, vysuší se a provede se detekce. Pro zvýraznění látek na chromatogramu se používá především metoda obarvení vhodným

činnidlem, které s přítomnými látkami vytvoří barevný komplex. Dále je možné použít fluorescenční barviva, která jsou přítomnými látkami zhasena. Po ozáření UV lampou se proto přítomné látky projeví jako tmavé skvrny. Identifikace přítomných látek se provádí porovnáním retardačních faktorů, kvantifikace pomocí měření absorbance, fluorescence nebo denzitometricky.

Modifikací TLC je vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC), která je výhodnější především díky své miniaturizaci a díky sníženým požadavkům na množství použitých látek. Při jedné analýze je tak možné sledovat až pětkrát více vzorků než u TLC.

Při papírové chromatografii dochází k dělení látek při průchodu chromatografickým papírem, který je vyrobený z velmi čisté celulózy. Papír slouží jako nosič zakotvené fáze, kterou je většinou voda. V tomto případě se zakotvená fáze označuje jako komplex voda-celulóza, protože jde o vlhkost vázanou celulózu. Papír však může být impregnovaný, díky čemuž je možné v něm zakotvit i jiná nevodná polární (formamid) nebo nepolární rozpouštědla (petrolej, parafinový olej). Princip nanášení vzorků, separace a vyhodnocení je u papírové chromatografie stejný jako u tenkovrstvé chromatografie [14-17].

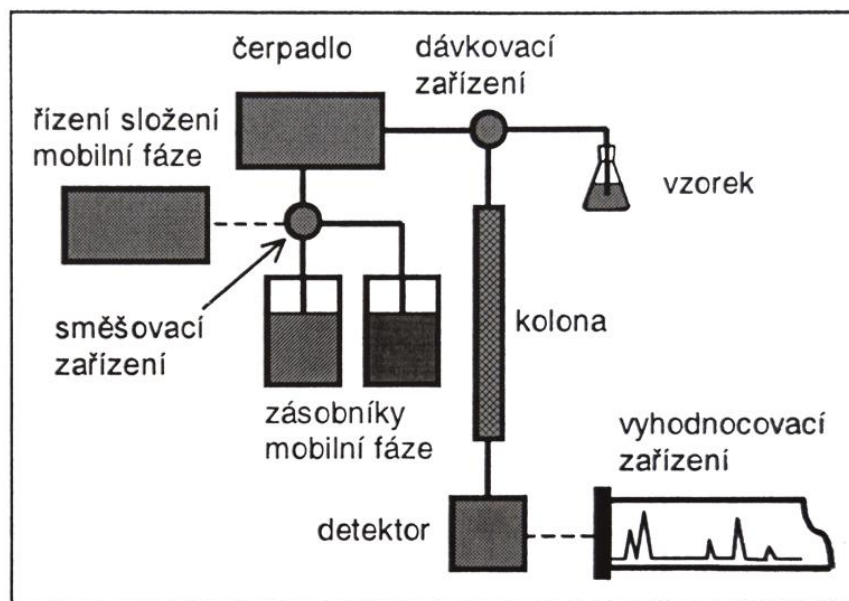
3.1.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Mobilní fázi v kapalinové chromatografii (LC) tvoří kapalina. Separace závisí nejen na stacionární, ale i mobilní fázi. Dle povahy separovaných látek může být použita chromatografie na normálních (NP) nebo reverzních fázích (RP), která je vhodná k dělení polárních látek. Při NP-HPLC slouží jako stacionární fáze polární látka, nejčastěji silikagel. Mobilní fáze je pak nepolární (pentan, hexan, heptan). Naopak u RP-HPLC je stacionární fáze nepolární a nejčastěji ji tvoří silikagel s navázaným vhodným ligandem (např. oktadecylsilan C18). Mobilní fáze je v tomto případě polární a nejčastěji ji tvoří směs vody a organických rozpouštědel (acetonitril, methanol). Silně polární analyty málo reagují se stacionární fází, a proto opouští kolonu jako první. Platí tedy, že s klesající polaritou dělených látek roste jejich retenční čas.

Vzhledem k časové náročnosti separace málo polárních látek bývá separace prováděna v režimu gradientové eluce. Ta díky změně složení během analýzy umožní urychlení eluce slabě polárních látek. Kolonou může mobilní fáze procházet stále ve

stejném složení (izokratická eluce), nebo se může její složení měnit s časem (gradientová eluce).

Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku 7, skládá se ze zásobníků mobilní fáze, čerpadla, zařízení pro dávkování vzorku (autosampler, injekční stříkačka), kolony a zařízení pro detekci látek.



Obrázek 7- Schéma kapalinového chromatografu [15]

Kolony tvoří nejčastěji ocelová, skleněná nebo plastová trubice, naplněná drobnými částicemi sorbentu, který slouží jako stacionární fáze. Kolony mají délku většinou 10, 15 nebo 25 cm, vnitřní průměr 2 až 4 mm. Obvyklý průtok eluentu je většinou do 1 ml/min. Jako ochrana před nečistotami bývá zapojena před analytickou kolonou ochranná kolonka [14,15,18,19].

Detektory v kapalinové chromatografii

V HPLC se používají spektrofotometrické a fluorescenční detektory, hmotnostní spektrometry (MS), elektrochemické detektory, ale i refraktometrické detektory [15,16,20].

- **Spektrofotometrické detektory** měří absorbcí eluátu, který opouští kolonu. Jednoduché detektory měří při jedné vlnové délce v UV oblasti.

Naopak detektory s diodovým polem (DAD, PDA) měří celé absorpční spektrum v rozmezí daných vlnových délek.

- **Fluorescenční detektory** využívají schopnosti látek absorbovat UV záření a následně emitovat záření o vyšší vlnové délce. Tento detektor je vysoce selektivní a citlivý.
- **MS** měří hmotnostní spektrum iontů analytů. Vstupující eluát je ionizován (elektronová ionizace EI, chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI, ionizace elektrosprejem ESI), vzniklé ionty jsou pak rozděleny podle poměru m/z a nakonec dochází k vlastní detekci. Vyhodnocení se provádí především v režimu sledování vybraného iontu (SIM) [21].

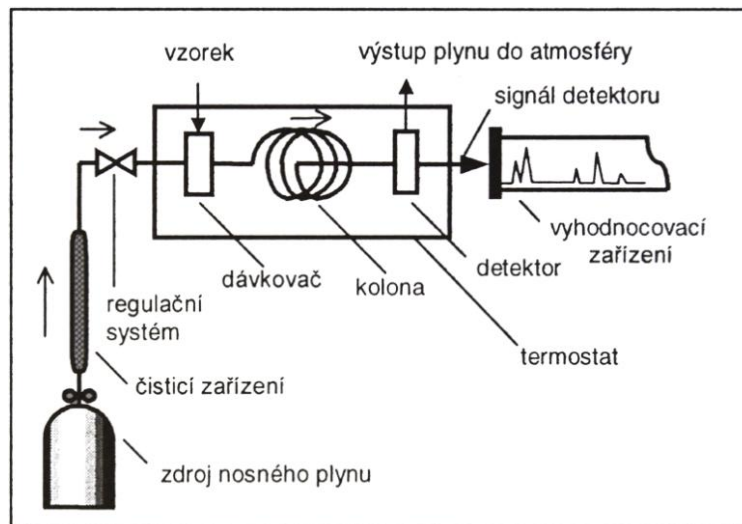
3.1.4. Plynová chromatografie

V plynové chromatografii (GC) slouží jako mobilní fáze plyn. Výhodou této metody je její rychlost, potřeba malého množství vzorku a relativně jednoduchá aparatura. Plynová chromatografie je velmi vhodná pro těkavé složky, její využití je však omezeno pro tepelně málo stabilní látky.

Jako stacionární fáze může v plynové chromatografii sloužit jak pevná látka, kdy je separace založena na adsorpci analytu, tak kapalina, kdy separace závisí na rozdělení látek mezi obě fáze. Mobilní fáze se v plynové chromatografii nazývá nosný plyn a nejčastěji ji tvoří dusík, helium nebo argon. V systému bývá přítomen regulační systém, který udržuje konstantní průtok nosného plynu i při změně teploty nebo tlaku. Nástřik vzorku se provádí pomocí injekční stříkačky přes septum, oddělující injektor od okolního prostředí. V případě náplňových kolon se nástřik provádí přímo do kolony (on column), v případě kapilárních kolon pak pomocí děliče toku (split injection) nebo bez děliče toku (splitless injection).

V plynové chromatografii se používají jak náplňové, tak kapilární kolony. Náplňové kolony bývají především skleněné, mají průměr 2–3 mm a délku až několik metrů. Bývají naplněny sorbentem (silikagel, oxid hlinitý) nebo zakotvenou kapalnou fází. U kapilárních kolon slouží jako nosič stacionární fáze přímo stěna kapiláry, které bývají převážně křemenné. Průměr kapiláry je přibližně 0,1–0,6 mm a délka až 150 m. Povrch

kolony bývá pokryt vrstvou polyimidu, který ji chrání před poškozením. Kolona je umístěna v termostatu, který je temperován na danou teplotu. Schéma plynového chromatografu je znázorněno na obrázku 8 [14-16].



Obrázek 8- Schéma plynového chromatografu [15]

Detektory v plynové chromatografii

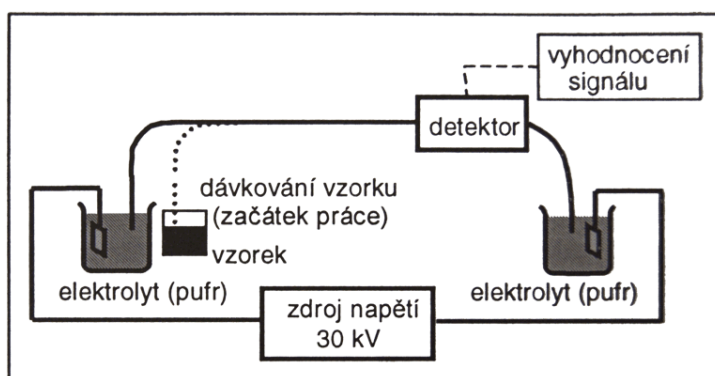
Jako detektory pro plynovou chromatografii se nejčastěji používají tepelně-vodivostní detektor (TCD), plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD) a hmotnostní spektrometr (MS) [14-16].

- **Tepelně-vodivostní detektor** je složený ze žhaveného odporového vlákna, které je ochlazováno přicházejícím plynem. Přítomnost analytu se projeví změnou vodivosti odporového vlákna. Detektor bývá většinou vybavený dvěma vlákny, jejichž odpor se porovnává. Přes jedno vlákno proudí čistý nosný plyn a přes druhé plyn vycházející z kolony. Tento detektor je univerzální.
- **Plamenový ionizační detektor** funguje na principu zavádění plynu z kolony do kyslíkovodíkového plamene, čímž dojde k ionizaci částic. Tyto molekuly pak vedou proud, jehož nárůst detektor sleduje. FID je velmi citlivý na uhlovodíky, ale naopak neumožňuje detekci anorganických par a plynů.

- **Detektor elektronového záchytu** je selektivní detektor pro halogenované látky. Využívá β -záření, které ionizuje molekuly nosného plynu a vyvolává tak ionizační proud. Atomy halogenů zachycují pomalé elektrony, což způsobí pokles proudu, který je detekován.

3.1.5. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CZE) funguje na principu rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Separace probíhá v křemenné kapiláře o průměru okolo 50 μm a délce desítek cm, která je pokryta ochrannou vrstvou polyimidu. Silanolové skupiny ze stěny kapiláry při kontaktu s roztokem o vysokém pH disociují, čímž se vytvoří záporný náboj. Ten pak přitahuje kladné ionty z elektrolytu a vzniká elektrická dvojvrstva. Po vložení napětí migrují kationty ke katodě, což vyvolá tok celého roztoku. Nejrychleji putují kationty, které dorazí k detektoru jako první. Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který bývá tvořen roztokem pufru. Oba její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, ve kterých jsou zároveň ponořeny i elektrody. Koncem kapiláry, který je vzdálenější od detektoru, se nasaje vzorek. Vzorek může být nadávkován tlakem, elektrokineticky nebo díky rozdílné výšce hladin. Poté se kapilára vrátí do zásobníku s elektrolytem a po vložení vysokého napětí mezi elektrody je zahájena separace. Jako detektor slouží především UV-VIS detektor, který je napojen přímo na kapiláru. Uspořádání kapilární elektroforézy je znázorněno na obrázku 9. Jako výstup získáme elektroforegram, který je podobný chromatogramu [14-16,22].



Obrázek 9- Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu [15]

4 Konkrétní případy stanovení resveratrolu a jeho derivátů

4.1 Stanovení stilbenů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Pro stanovení stilbenů se nejčastěji používá systém RP-HPLC v režimu gradientové eluce. Kapalinové chromatografii často předchází SPE extrakce. Nejčastějším předmětem analýz jsou vína, bobule a byliny.

4.1.1. Stanovení stilbenů v pivě

Výskyt resveratrolu a piceidu byl potvrzen v některých odrůdách chmelu, které se využívají pro výrobu piva. Pro ověření, zda se při výrobě do piva přenesou, byly provedeny analýzy zahrnující techniku extrakce SPE a následně separaci pomocí LC-ESI-MS/MS [6].

K analýze bylo použito 110 piv z celého světa (52 ležáků, 20 svrchně zkvašených piv, 15 opatských piv, 11 kvasničných ležáků, 7 silných piv a 5 piv bez alkoholu). Obsah alkoholu ve všech vzorcích byl mezi 0,05–14% (v/v).

Všechna piva byla analyzována ihned po otevření. Vzorky byly na 4 minuty umístěny do ultrazvuku. Všechny operace byly provedeny na ledu, bez přítomnosti světla a v atmosféře dusíku, aby se zabránilo oxidaci fenolických látek. Pro získání maximální citlivosti analýzy byl optimalizován způsob extrakce a vyhodnocen matricový efekt. Optimalizace extrakce proběhla na základě analýzy s různými parametry, např. objem piva (1 a 5 ml) a předčištění vzorků. Předčištění piv před SPE se skládá z čištění piv toluenem následovaným dvojitou extrakcí cyklohexanem.

Extrakce

Vzorky (1 ml odplyněného piva zředěného ultračistou vodou pro snížení obsahu alkoholu na méně než 5%) s vnitřním standardem (ethyl-galát) byly umístěny do 96-jamkové destičky (Waters Oasis HLB), která byla kondicionována 1 ml methanolu a zneutralizována pomocí 1 ml kyseliny octové ve vodě. Použitá kyselina octová měla koncentraci 2 mol/l. Vzorky byly promyty 1 ml kyseliny octové ve vodě a 1 ml kyseliny

octové ve směsi voda/methanol (85/15; v/v). Několikastupňová eluce proběhla nejprve pomocí 0,5 ml kyseliny octové v methanolu a poté 2x 0,75 ml kyseliny octové v ethylacetátu. Extrakt byl odpařen do sucha v mírném proudu dusíku. Zbytek byl rozpuštěn ve 100 µl kyseliny octové v methanolu s přidavkem 1,64 µmol/l taxifolinu.

Vlastní analýza

Analýzy byly provedeny pomocí systému Agilent 1100. K získání spektrometrických dat byl použit hmotnostní spektrometr. K chromatografické separaci byla použita kolona C18 Phenomenex Luna (50 × 2 mm; 5µm). Na gradientové eluci se podílela zředěná kyselina octová (mobilní fáze A) a směs acetonu, acetonitrilu a kyseliny octové (mobilní fáze B). Teplota separace byla 40 °C, objem nástřiku byl 15 µl a průtok mobilní fáze 0,5 ml/min.

Celkem byly stilbeny nalezeny v detekovatelném množství v 92 vzorcích, a to v rozmezí 1,99–81,22 µg/l. Nejčastěji a v nejvyšších koncentracích byl nalezen *trans*-resveratrol. Ze 110 analyzovaných piv jich 88 obsahovalo volný resveratrol, zatímco pouze 38 vzorků obsahovalo piceid v detekovatelném množství. 59 piv obsahovalo *trans*-resveratrol v koncentraci mezi 3,68–66,74 µg/l a 69 piv obsahovalo *cis*-resveratrol v rozmezí 1,34–22,65 µg/l. 6 piv obsahovalo *trans*-piceid mezi 1,80 a 9,31 µg/l a 38 piv obsahovalo *cis*-piceid v rozmezí koncentrací 1,80–24,24 µg/l. Pivo s nejvyšším obsahem stilbenů (opatské pivo, Belgie) obsahovalo 66,74 µg/l *trans*-resveratrolu, 10,31 µg/l *cis*-resveratrolu a 4,17 µg/l *cis*-piceidu.

4.1.2. Stanovení stilbenů ve vínech

Stanovení *trans*-resveratrolu

Ke studii [23] bylo dodáno 58 lahvových červených vín, ročník 1999, pocházejících ze sedmi oblastí Kanárských ostrovů, a zároveň šest bílých vín.

Vlastní analýza

SPE kolonky byly nejdříve kondicionovány 4 ml methanolu a poté 4 ml vody. Poté bylo aplikováno 5 ml vína, kolonka byla vysušena proudem dusíku a nakonec byly sloučeniny eluovány pomocí 3 ml methanolu. Tento roztok byl po přefiltrování přes 0,45 μm filtr analyzován.

Pro analýzu byl použit systém HPLC, vybavený UV detektorem a detektorem skenujícím fluorescenci. Byla použita analytická kolona C18 Waters Nova-Pak (150 \times 3,9 mm; 4 μm) a předkolonka stejného typu. Jako mobilní fáze A byla použita směs methanolu, kyseliny octové a vody (10/2/88; v/v/v) a jako mobilní fáze B stejná směs (90/2/8; v/v/v).

Separace proběhla s využitím třístupňového lineárního gradientu při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 280 nm. Fluorescenční detektor pracoval při $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 374 \text{ nm}$

Porovnáním záznamů z obou detektorů se ukázalo, že fluorescenční detektor je pro stanovení resveratrolu citlivější. Detekční limit pro fluorimetrickou detekci byl 0,003 mg/l, zatímco pro UV-VIS detekci 0,02 mg/l. Všechna analyzovaná vína obsahovala *trans*-resveratrol a 82% z nich mělo jeho obsah mezi 1,5–4,5 mg/l. Červená vína mají vyšší obsah než bílá. Obsah *trans*-resveratrolu ve vínech z Kanárských ostrovů je podobný jako ve vínech z Francie [24] a centrální Evropy a vyšší než ve vínech z Kalifornie, Austrálie, Itálie, Španělska a Portugalska a jižní Ameriky.

Stanovení resveratrolu a piceidu

K analýze [25] bylo dodáno 22 komerčně dostupných červených vín, ročník 2002. Všechna vína byla uchována v temnu při teplotě 4 °C a otevřena těsně před analýzou. Před HPLC analýzou byl zfiltrován 1 ml vzorku přes 0,45 μm filtr.

Vlastní analýza

Analýzy byly provedeny pomocí systému Shimadzu, vybaveným PDA detektorem a MS detektorem, vybaveným ESI rozhráním. K separaci byla použita kolona C18 Supelco Discovery (150 \times 2,1 mm; 5 μm) a předkolonka stejného typu. Mobilní fáze A byla

kyselina mravenčí ve vodě a mobilní fáze B kyselina mravenčí v acetonitrilu. Analýza byla provedena při laboratorní teplotě a při průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min. Do kolony bylo nadávkováno 5 μ l vzorku vln.

Na obrázku 10 je chromatogram HPLC-PDA s detekcí při 278 nm, který znázorňuje píky 24 fenolických látek. Při této vlnové délce však nebyly všechny látky dokonale odděleny, a pro analytické stanovení byly proto pořízeny chromatogramy při vlnových délkách, které odpovídaly absorpčním maximům všech látek. Pro identifikaci píků byla provedena detekce dle hodnot m/z, odpovídajících molekulové hmotnosti fenolických látek. ESI/MS analýzy byly provedeny v negativním ionizačním režimu se dvěma různými hodnotami napětí, aby bylo možné rozdělit fenolické látky na fragmenty vhodné k detekci.

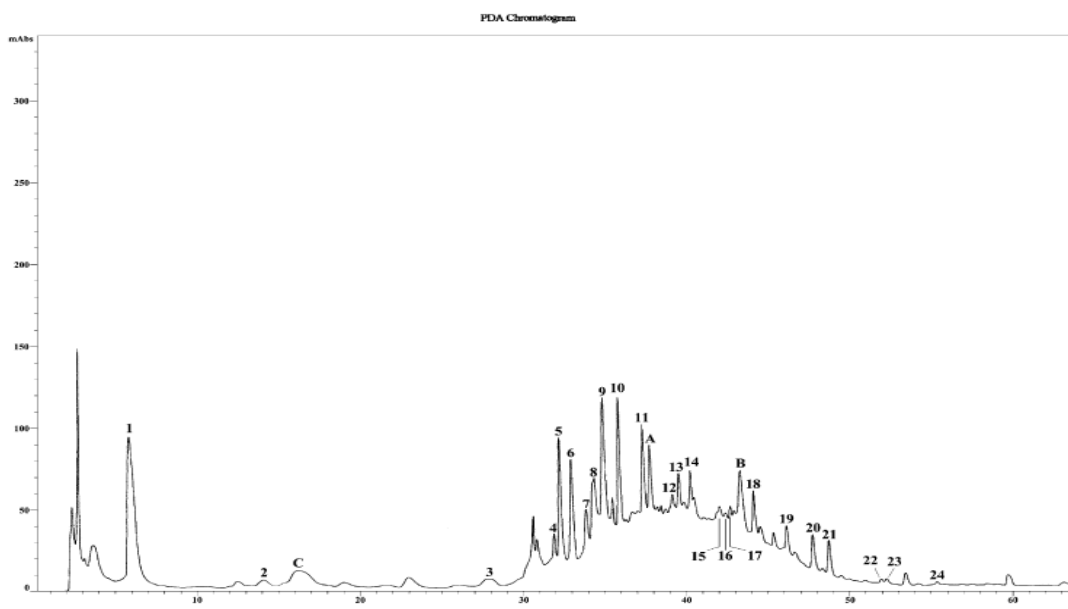


Fig. 2. HPLC-PDA chromatogram of a wine sample detected at 278 nm. Peak identification: 1, gallic acid; 2, protocatechuic acid; 3, tyrosol; 4, vanillic acid; 5, procyanidin B1; 6, (+)-catechin; 7, caffeic acid; 8, syringic acid; 9, procyanidin B2; 10, (-)-epicatechin; 11, ethylgallate; 12, ferulic acid; 13, rutin; 14, isoquercitrin; 15, kaempferol-3-O-glucoside; 16, isorhamnetin-3-O-glucoside; 17, *p*-coumaric acid; 18, myricetin; 19, *trans*-resveratrol; 20, quercetin; 21, *cis*-resveratrol; 22, kaempferol; 23, isorhamnetin; 24, rhamnetin; A, *trans*-piceid; B, *cis*-piceid; C, caftaric acid.

Obrázek 10- Chromatogram HPLC-PDA vzorku vína ze Sicílie při 278 nm [25]

Píky na chromatogramu byly identifikovány porovnáním jejich retenčních časů s údaji ze směsi standardů, dále pak pomocí dat z PDA detektoru a nakonec porovnáním ESI-MS dat pro jednoznačné označení látek s podobnými UV-VIS spektry.

Nejvyšší obsah *trans*- a *cis*-resveratrolu byl nalezen ve vínech z hroznů Merlot, a to průměrně 1,37 a 0,75 mg/l. Ve vínech z hroznů Nero d'Avola byl jejich obsah 0,35 a 0,11 mg/l a v ostatních vínech 0,35 a 0,13 mg/l.

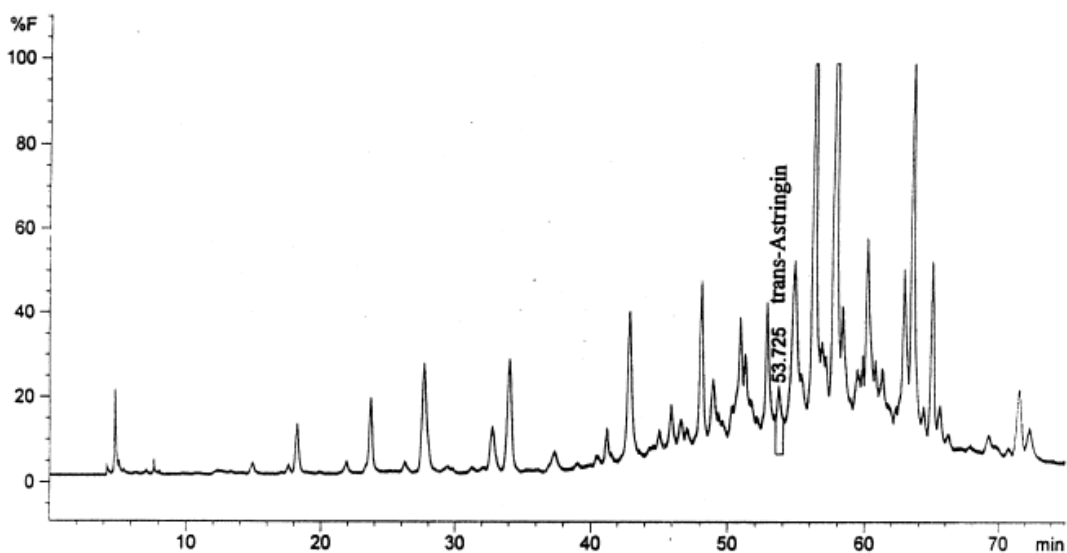
Maximální obsah *trans* a *cis*-piceidu byl nalezen opět ve vínech z hroznů Merlot, 3,74 mg/l a 0,36 mg/l.

Stanovení *trans*-astringinu

K analýze [11] bylo dodáno 5 bílých a 5 červených vín z jižní Francie. Vzorky byly zředěny dvakrát destilovanou vodou v poměru 1:3 a zfiltrány.

Separace proběhla pomocí systému HPLC, vybaveným fluorescenčním detektorem pracujícím při $\lambda_{ex} = 298$ nm $\lambda_{em} = 400$ nm, na koloně C18 Hewlett-Packard (250 × 4 mm; 5 μ m). Mobilní fáze A byla tvořena vodným roztokem kyseliny octové a mobilní fáze B methanolem. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min.

Obsah *trans*-astringinu v červených vínech byl v rozmezí koncentrací 0,09 mg/l–0,29 mg/l, v bílých vínech pak 0,1 mg/l–0,22 mg/l. Rozdíl mezi obsahem *trans*-astringinu v bílých a červených vínech je tedy minimální. Získaný chromatogram je na obrázku 11.



Obrázek 11-Chromatogram vzorku vína se zvýrazněním astringinu [11]

Stanovení resveratrolu, piceidu a astringinu

K analýze [26] bylo dodáno 12 červených vín z Brazílie. Vzorky pocházely ze všech vinařských oblastí Rio Grande Do Sul a ze sklizní 1999–2003. Všechna vína byla před analýzou zfiltrována přes 0,45 µm filtr.

Separace proběhla v systému HPLC, vybaveném DAD, na koloně C18 Hewlett-Packard (250 × 4 mm; 5 µm). Detektor byl nastaven na 280, 286, 306 a 321 nm a separace proběhla při laboratorní teplotě. Mobilní fáze A byla tvořena kyselinou octovou ve vodě (pH = 2,4), mobilní fáze B obsahovala z 20% mobilní fázi A, a z 80% acetonitril. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min.

Porovnáním celkového obsahu stilbenů bylo zjištěno, že jejich nejvyšší obsah je v odrůdě Merlot (52 mg/l). Naopak nejnižší obsah je ve vínech Tannat (2 mg/l).

Trans-astringin byl nalezen pouze ve 4 vzorcích, a to především v odrůdách Merlot. Rozmezí nalezených koncentrací *trans*-astringinu bylo 4,35–25,72 mg/l. *Trans*-piceid byl nalezen v 7 vzorcích v rozmezí koncentrací 5,30–20 mg/l. Nejvyšší obsah byl nalezen v odrůdě Merlot. *Cis*-resveratrol byl nalezen ve všech vzorcích, a to v rozmezí koncentrací 1,70–23,23 mg/l. *Trans*-resveratrol byl nalezen v 8 vínech v rozmezí koncentrací 1,77–5,34 mg/l.

Stanovení resveratrolu a piceidu pomocí fotochemické derivatizace

Analyzována byla 2 červená vína, 1 bílé víno a 1 bílé víno z botrytického sběru. Jako botrytický sběr se označují vína napadená ušlechtilou plísní *Botrytis cinerea*, která pro svůj růst využívá vodu z hroznů [27]. Obsah vody v hroznech tedy klesá až na polovinu původní hodnoty. Všechny vzorky pro analýzu [28] byly zakoupeny v běžných obchodech, uchovány při 4 °C a ochráněny před přímým světlem. Před analýzou byly vzorky zfiltrovány přes 0,2 µm fluoropolymerový membránový filtr.

Analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu, vybaveném spektrofotometrickým detektorem DAD a fluorescenčním detektorem. Separace látek proběhla na analytické koloně C18 Nova-Pak (150 × 3,9 mm; 4 µm). Teplota separace byla regulována na 15 °C pomocí spirály s cirkulující vodou. Fotoreaktor za chromatografickou kolonou, složený z fluoropolymerové trubice (PTFE, 3 m × 0,3 mm i.d. × 1,6 mm e.d.),

stočené okolo 4 W xenonové žárovky, byl umístěn mezi DAD a fluorescenční detektor. Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitrilu a kyseliny fosforečné. Její složky byly před použitím zfiltrány přes 0,22 μm nylonový membránový filtr a odplyněny pomocí ultrazvuku. Průtok mobilní fáze byl 0,9 ml/min. Detektor fluorescence pracoval při $\lambda_{\text{em}} = 364 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, DAD pak v rozmezí 200–500 nm.

Červená vína obsahovala 1,2 $\mu\text{g/ml}$ a 6,5 $\mu\text{g/ml}$ *trans*-piceidu, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ a 2,9 $\mu\text{g/ml}$ *cis*-piceidu. Obsah *trans*-resveratrolu byl 0,07 $\mu\text{g/ml}$ a 1,4 $\mu\text{g/ml}$ a obsah *cis*-resveratrolu 0,06 $\mu\text{g/ml}$ a 0,21 $\mu\text{g/ml}$. Bílé víno obsahovalo 0,099 $\mu\text{g/ml}$ *trans*-piceidu, 0,42 $\mu\text{g/ml}$ *cis*-piceidu, 0,054 $\mu\text{g/ml}$ *trans*-resveratrolu a 0,068 $\mu\text{g/ml}$ *cis*-resveratrolu. Bílé víno z hroznů s ušlechtilou plísní obsahovalo vyšší hladiny stilbenů než klasické bílé víno, plíseň *B. cinerea* tedy pozitivně ovlivňuje jejich produkci. Obsah *trans*-piceidu v tomto víně byl 0,29 $\mu\text{g/ml}$, *cis*-piceidu 0,70 $\mu\text{g/ml}$, *trans*-resveratrolu 0,07 $\mu\text{g/ml}$ a *cis*-resveratrolu 0,064 $\mu\text{g/ml}$.

Stanovení resveratrolu

K analýze [29] bylo dodáno 8 výrobků z brusinek a hroznů (Ocean Spray) ve formě šťáv, koncentrátů nebo prášků. Hroznová šťáva byla zakoupena v obchodě s potravinami. Brusinková šťáva byla připravena hydraulickým lisováním zmražených brusinek, smíchaných s rýžovými slupkami pro usnadnění procesu. Dále bylo analyzováno 7 různých červených italských vín.

10 ml každého vzorku vína bylo pro odstranění ethanolu odpařeno pomocí vakua. Zbytek byl naředěn 6 ml deionizované vody a upraven pomocí 0,1 M NaOH tak, aby hodnota pH byla 6,0. Do všech roztoků bylo přidáno 30 mg β -D-glukosidasy, a poté byly ponechány inkubovat 18 hodin při 37 °C. Po enzymatické hydrolýze byly vzorky 4x extrahovány 7 ml ethylacetátu nasyceného vodou. Směs extraktů byla odpařena do sucha pomocí vakua a zbytek byl poté rozpuštěn ve 250 μl směsi methanol/voda (6/4; v/v).

0,1 g každého vzorku prášku bylo naředěno 1 ml deionizované vody, zamícháno na wortexu, a poté doplněno 20 ml methanolu. Stejný objem methanolu byl přidán i ke každému vzorku šťávy. Směs byla míchána přes noc, a poté proběhla 5 minut centrifugace. Po odebrání supernatantu byl pevný zbytek promyt pomocí 10 ml methanolu a znovu

odstředěn. Po smíchání supernatantů byl roztok pro odstranění methanolu odpařen na rotační odparce. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml deionizované vody. Nakonec byl každý extrakt naředěn 2 ml směsí methanol/0.5% kyselina mravenčí (3/7; v/v).

Vlastní analýza

Separace látek proběhla na koloně C18 Hypersil ODS (100 × 2,1 mm; 5 μm) při teplotě 25 °C. Mobilní fáze byla tvořena směsí methanolu a kyseliny mravenčí ve vodě a její průtok byl 250 μl/min. Teplota nástřiku vzorku byla 4 °C. Jako detektor sloužil hmotnostní spektrometr pracující v režimu APCI v pozitivním módu. Výsledky byly zaznamenány pomocí SIM.

Vzorky vín obsahovaly *cis*-resveratrol v rozmezí koncentrací 1,26–3,65 mg/l, obsah *trans*-resveratrolu byl 0,72–3,18 mg/l. Brusinková a hroznová šťáva obsahovaly přibližně stejné množství resveratrolu (1,07 a 1,56 nmol/g). Obsah resveratrolu zůstává zachován i v prášcích, které se používají na výrobu šťáv. V některých byl dokonce nalezen obsah odpovídající červeným vínům. Konkrétní výsledky analýz produktů z hroznů a brusinek jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2-Obsah *trans*-, *cis*-resveratrolu a celkového resveratrolu v produktech z hroznů a brusinek [29]

Table 2. Resveratrol in Grape and Cranberry Samples

sample	<i>trans</i> - resveratrol (nmol/g)	<i>cis</i> - resveratrol (nmol/g)	total resveratrol (nmol/g)
1. Concord grape powder	1185.00	216.92	1401.92
2. Concord grape powder	108.63	46.16	154.79
3. Concord grape powder	69.96	16.20	86.16
4. Concord grape powder	2.35	2.69	5.04
5. Concord grape concentrate	4.89	3.05	7.94
6. Concord grape extract	1.91	1.87	3.78
7. cranberry raw juice	0.93	0.14	1.07
8. Concord grape juice	1.13	0.43	1.56

4.1.3. Stanovení stilbenů v bylinkách

K analýze byly použity čerstvé vzorky thunbergovy révy (*Vitis thunbergii*) a loubince krátkostopečného (*Ampelopsis brevipedunculata*), posbírané v kampusu National Chiayi University. Obě tyto rostliny jsou na Tchaj-wanu používány jako léčivé byliny. K analýze [10] byly použity jejich kořeny, stonky i listy. Dále byly analyzovány komerčně dostupné suché kořeny křídlatky, révy a loubince.

Na základě analýzy podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*) a thunbergovy révy bylo zjištěno, že pro stanovení stilbenů je nejvhodnější úpravou vzorku ponoření do kapalného dusíku a následná extrakce rozpouštědlem. Vzorky tedy byly před analýzou ponořeny do tekutého dusíku a rozemlety na jemno. Extrakce vzorků obsahujících chlorofyl (listy révy) proběhla smícháním 0,5 g vzorku s 2,5 ml 100% methanolu. SPE kolonka C18 s tímto extraktem byla promyta 1 ml směsí methanol/voda (60/40; v/v) a získaný eluát byl odebrán. Všechny eluáty byly smíchány a doplněny 60% vodným roztokem methanolu na 10 ml.

Pro vzorky neobsahující chlorofyl (podzemnice) nebylo předčištění před HPLC analýzou nutné. Vzorek byl rozmělněn a smíchán s methanolem, zfiltrován, a poté ještě 2x extrahován 2 ml methanolu. Získané extrakty byly smíchány a doplněny methanolem na objem 5 ml. Všechny operace byly vzhledem k nízké stabilitě stilbenů na světle provedeny pod fluorescenční lampou.

Vlastní analýza

Pro analýzu byl použit systém HPLC, vybavený UV-VIS a fluorescenčním detektorem. Separace proběhla na koloně C18 Mightysil (250 × 4,6 mm). UV-VIS detektor byl nastaven na vlnovou délku 306 nm, detektor fluorescence pracoval při $\lambda_{\text{ex}} = 343$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 395$ nm. Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitrilu a deionizované vody, která měla předem upravené pH kyselinou mravenčí na 2,1. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. K analýze bylo použito 20 μ l vzorku.

Z čerstvých rostlin byl nejvyšší obsah piceatannolu a resveratrolu v thunbergově révě. V jejích kořenech byl obsah piceatannolu okolo 5 μ g/g čerstvého vzorku a obsah resveratrolu 314 μ g/g. Naopak nejnižší obsah byl nalezen v loubinci. Porovnáním obsahu

piceatannolu a resveratrolu v různých částech rostlin bylo zjištěno, že jejich nejvyšší obsah je právě v kořenech. Naopak například ve stoncích loubince nebyl nalezen žádný resveratrol ani piceatannol.

Obsah piceatannolu v sušených kořenech byl od 17 $\mu\text{g/g}$ (loubinec, réva) do 66 $\mu\text{g/g}$ suchého vzorku (křídlatka). Obsah resveratrolu byl od 0,5 mg/g (loubinec, réva) do více než 1 mg/g suchého vzorku (křídlatka).

4.1.4. Stanovení stilbenů v kakau a čokoládě

Ve studii [4] byla analyzována hořká čokoláda a kakaový likér z Pobřeží slonoviny (Belcolade-Puratos Group, Belgie).

Před analýzou byly ze vzorků nejprve odstraněny tuky. Tmavá čokoláda byla rozdrcena na prášek, stejně jako kakaový likér, a vložena do extrakční vialky. Delipidizace proběhla při laboratorní teplotě mírným mícháním s 50 ml toluenu (3x) a s 50 ml cyklohexanu (3x), vždy v desetiminutových intervalech. Po každém kroku byla směs odstředěna. Nakonec byly supernatanty vysušeny pomocí vakua a zbaveny zbytků rozpouštědel. Vzorky zbavené tuků byly třikrát extrahovány 40 ml 80% ethanolu, vždy 10 minut při 60 °C za mírného míchání. Po extrakci byl vzorek odstředěn 10 minut a poté byl odebrán supernatant. Ten byl zfiltrován a získané filtráty byly odpařeny na odparce při 35 °C do sucha. Odparek byl nakonec rozpuštěn ve 2 ml 50% ethanolu.

Vlastní analýza

Analýzy byly provedeny na koloně C18 Prevail (150 × 2,1 mm; 2 μm) s lineární gradientovou elucí sestavující se z mobilní fáze A (voda s 1% acetonitrilem a 0,1% kyselinou octovou) a mobilní fáze B (acetonitril). Průtok mobilní fáze byl 200 $\mu\text{l/min}$. 10 μl vzorku bylo nadávkováno na kolonu. Teplota separace byla 30°C a jako detektor sloužil hmotnostní spektrometr vybavený zdrojem APCI.

V extraktu tmavé čokolády i v kakaovém likéru byl nalezen *trans*-resveratrol a *trans*-piceid. Extrakt tmavé čokolády obsahoval 2 ppm *trans*-resveratrolu a 5 ppm *trans*-piceidu. Extrakt kakaového likéru obsahoval 1,3 ppm *trans*-resveratrolu a 3 ppm *trans*-piceidu. Původní vzorek tmavé čokolády tedy obsahoval nejméně

0,4 ppm *trans*-resveratrolu a 1 ppm *trans*-piceidu a původní likér 0,5 ppm *trans*-resveratrolu a 1,2 ppm *trans*-piceidu. Na obrázku 12 je chromatogram RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS, znázorňující analýzu standardů a vzorků.

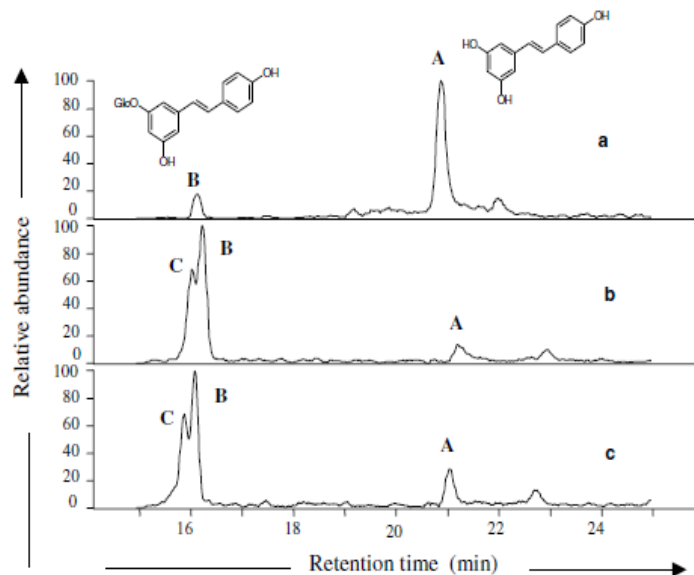


Fig. 2. RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS chromatogram (a) of a 5 ppm standard solution of *trans*-piceid (retention time = 16.04) and *trans*-resveratrol (retention time = 20.87), (b) of the cocoa liquor extract and (c) of the dark chocolate extract. A, *trans*-resveratrol; B, *trans*-piceid; C, unknown.

Obrázek 12 – Chromatogram RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS [4]

4.2 Stanovení stilbenů pomocí plynové chromatografie

Plynová chromatografie patří mezi méně časté metody, používané ke stanovení stilbenů. Jako detektor většinou slouží hmotnostní spektrometr.

K analýze [30] byly použity vzorky různých bobulí z rodu brusnic (*Vaccinium*) z Kanady a USA, posbírané jak volně rostoucí, tak komerčně vypěstované. Bobule byly umístěny do chlazených kontejnerů pro transport a poté lyofilizovány. Před vlastní analýzou byly všechny tyto vzorky 6 měsíců uchovány při 4 °C.

Extrakce bobulí z oblastí v USA: 1 g lyofilizovaných bobulí byl smíchán s 10 g přečištěného písku a vložen do ASE extrakční kolonky. Extrakce proběhla 100 ml směsí methanol/acetón/voda/kyselina octová (40:40:20:0.1; v/v/v/v) při teplotě 40 °C a za tlaku 1000 psi. Extrakt byl odpařen pomocí vakua, aby se zbavil rozpouštědel.

Výsledný vodný roztok byl třikrát extrahován 1 ml ethylacetátu a poté vysušen proudem dusíku do sucha.

Extrakce bobulí z oblastí v Kanadě: 50 g zmražených bobulí bylo smícháno se třemi objemy směsi methanol/acetón/voda/kyselina mravenčí (40:40:20:0.1; v/v/v/v), a ponecháno 30 minut v klidu. Poté byla směs rozemleta pomocí homogemizátoru. Extrakt byl zfiltrován, poté opět 30 minut extrahován 60 ml extrakčního rozpouštědla, rozemlet a zfiltrován. Zbývající vodná část byla lyofilizována, suspendována v 10 ml vody a poté přivedena do SPE kolonky C18 Waters, kde byla eluována 50 ml směsi methanol/acetón/voda/kyselina mravenčí (40:40:20:0.1; v/v/v/v). Organická fáze byla odpařena pomocí vakua, vodná fáze byla lyofilizována.

1 mg extraktu byl derivatizován 100 μ l směsi *bis*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid/dimethylformamid/methanol (3,5/1/0,5; v/v/v) ve 2 ml vialce. Vialka byla poté uzavřena a zahřívána 1 hodinu při 70 °C. Po ochlazení vialky na laboratorní teplotu byly odebrány 2 μ l vzorku pro vlastní analýzu.

Analýza vzorků

Separace proběhla v kapilární koloně Phenomenex (3m \times 0,25 mm; 0,25 μ m). Jako nosný plyn sloužilo helium a jeho průtok byl 1 ml/min. Separace proběhla za teplotního gradientu 150–320 °C, teplota nástřiku a detektoru byla 250 °C. Detektor pracoval v režimu SIM.

Resveratrol byl nalezen ve všech analyzovaných vzorcích bobulí, a to v rozmezí koncentrací 7–5884 ng/g suchého vzorku. Nejvyšší obsah resveratrolu byl nalezen v brusinkách. Na rozdílný v obsahu resveratrolu v bobulích mohlo mít vliv především UV-záření, mikrobiální infekce nebo doba sklizně.

Piceatannol byl nalezen pouze ve 4 vzorcích v rozmezí 138–422 ng/g suchého vzorku.

4.3 Stanovení stilbenů pomocí kapilární elektroforézy

Pokud je kapilární elektroforéza zapojena v systému s elektrochemickou detekcí, dosahuje velmi nízkých detekčních limitů a je tedy velice citlivá. Její další výhodou je opakovatelnost a rychlost.

Analýza *trans*-resveratrolu ve vínech a bylinkách

K analýze [31] byla dodána 4 červená vína, 1 bílé víno a křídlatka kopinatá z lékárny v Šanghaji.

Vzorky vín byly zfiltrvány přes 0,22 µm nylonový filtr. Poté bylo odebráno 1,5 ml filtrátu, který byl naředěn borátovým pufrem (0,1 mol/l, pH = 9,24) na objem 2 ml. 1 g suché křídlatky byl rozemlet na prášek a přesně zvážen. Zvážený vzorek byl 40 minut extrahován 25 ml bezvodého ethanolu a borátového pufru v ultrazvukové lázni. Nakonec byly všechny vzorky zfiltrvány nejprve přes papírový filtr, poté přes 0,22 µm stříkačkový filtr a doplněny na objem 10 ml. Získané roztoky vzorků byly před analyzováním uchovány v temnu.

Vlastní analýza

Analýza proběhla pomocí systému CZE-ECD. K udržení napětí mezi konci kapiláry, umožňující separaci, sloužil zdroj vysokého napětí (± 30 kV). Na konci kapiláry, kde docházelo k nasátí vzorku, byl udržován kladný potenciál. Druhý konec kapiláry byl uzemněn. Separace proběhla v křemíkové kapiláře Phoenix (65 cm \times 25 µm i.d. \times 360 µm e.d.). Jako pracovní elektroda sloužila uhlíková disková elektroda o průměru 300 µm. Před použitím byl její povrch obroušen smirkovým papírem a sonikován v deionizované vodě. Nakonec byla elektroda umístěna naproti výstupnímu konci kapiláry. CZE byla zapojena jako 3-elektrodový systém, složený z uhlíkové diskové elektrody (pracovní), platinové elektrody (pomocná) a nasycené kalomelové elektrody SKE (referentní). Tento systém byl doplněn amperometrem. Všechny vzorky byly vstříknuty elektrokineticky za použití napětí 10 kV po dobu 6 sekund.

Analýza prokázala přítomnost *trans*-resveratrolu v červených vínech, a to v rozmezí koncentrací 1,084–3,156 mg/l. Stejně tak byl *trans*-resveratrol nalezen i v křídlatce (1,556 mg/g). Naopak ve vzorku bílého vína nebyl *trans*-resveratrol detekován.

K další analýze [32] byla dodána 3 červená vína z obchodu v Šanghaji, vyrobená z různých odrůd a pocházející z různých sklizní.

Z každého vzorku byl odebrán 1 ml, ten byl zneutralizován pomocí roztoku NaOH a poté zředěn borátovým pufrem na objem 2 ml. Takto upravené vzorky byly po zfiltrování přes 0,22 µm nylonový filtr připraveny k analýze.

Analýza vzorků

Podmínky analýzy byly stejné jako v předchozím případě, pouze s použitím jiné kapiláry. Separace proběhla v křemíkové kapiláře Phoenix (70 cm × 25 µm i.d. × 360 µm e.d.). Analýza proběhla v borátovém pufru při napětí 12 kV. Potenciál pracovní elektrody byl 0,85 V (vs. SKE).

Přítomnost *trans*-resveratrolu byla prokázána ve všech vzorcích, a to v rozmezí koncentrací 2,12–2,5 µg/ml.

Podobných výsledků bylo dosaženo i v další analýze [33]. K té bylo dodáno 7 bílých a 3 červená vína různých odrůd z Francie. Všechna vína byla chráněna před světlem.

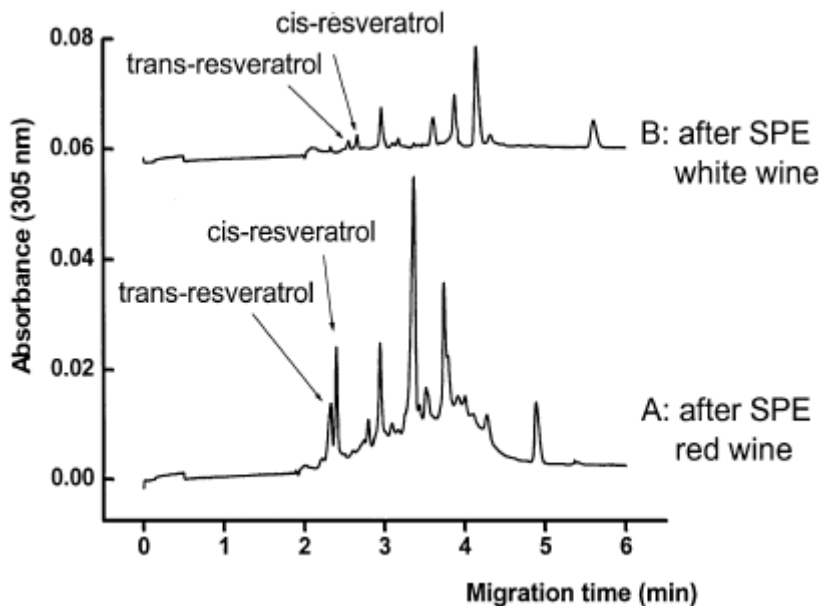
Analýza vzorků

K SPE extrakci sloužily kolonky typu C18. Kolonky byly kondicionovány 2 ml 100% methanolu a 2 ml vody. Poté byly aplikovány 2 ml vzorku vína a promyty 4 ml vody. Nakonec byl resveratrol eluován 0,3 ml 100% methanolu a tento extrakt byl následně použit k analýze.

Separace proběhla v křemíkové kapiláře (43 cm × 75 µm i.d., efektivní délka 36,5 cm). Kapilára byla kondicionována 5 minut pomocí 0,1 M NaOH, poté dvakrát 5 minut destilovanou vodou a nakonec 5 minut pufrem. Systém byl vybavený UV-VIS detektorem, pracujícím v rozmezí vlnových délek 190–600 nm. Jako základní elektrolyt sloužil tetraborát sodný (hodnota pH = 9,5) a teplota separace byla 25 °C.

Obsah *trans*-resveratrolu v testovaných vínech byl v rozmezí koncentrací 0,05–2,93 µg/ml. Výrazně vyšší obsah byl ve vínech červených (1,85–2,93 µg/ml), zatímco nejvyšší nalezený obsah v bílém víně byl 0,34 µg/ml. Obsah *cis*-resveratrolu nebyl prokázán v jednom vzorku bílého vína, v ostatních vzorcích byl v rozmezí koncentrací

0,05–2,68 $\mu\text{g/ml}$. Vyšší obsah byl opět v červených vínech. Na obrázku 13 je znázorněn získaný elektroforegram.



Obrázek 13- Elektroforegram červeného a bílého vína [33]

4.4 Stanovení resveratrolu pomocí planárních chromatografických technik

K analýze [34] byly dodány 3 různé extrakty kořenů křídlatky kopinaté, 3 tablety a 2 kapsle s *trans*-resveratrolem.

Do 100 ml odměrné nádoby, obsahující 50 ml methanolu, bylo přidáno 50 mg bylinkového extraktu. Směs byla 10 minut sonikována a poté doplněna methanolem na 100 ml a zfiltrována přes papírový filtr. K analýze bylo použito 5 μl tohoto filtrátu.

Pro určení průměrné hmotnosti bylo zváženo 20 tablet (kapslí), které byly následně rozemlety na jemný prášek. Dávka prášku, odpovídající množství resveratrolu uvedenému na tabletách, byla přidána k 50 ml methanolu ve 100 ml odměrné nádobě. Po 10-ti minutové sonikaci byla směs doplněna methanolem na objem 100 ml. Po zfiltrování bylo k analýze použito 5 μl filtrátu.

Analýza vzorků

Vzorky byly nanесeny ve formě proužků na hliníkovou destičku potaženou silikagelem (20 × 10 cm; tloušťka 250 μm). Destička byla před použitím promyta methanolem a aktivována 5 minut při 60 °C. Separace proběhla ve skleněné komoře a jako mobilní fáze byla použita směs chloroformu, ethylacetátu a kyseliny mravenčí (2,5/1/0,1; v/v/v). Čelo bylo ve výšce 8 cm. Po separaci byly TLC destičky vysušeny vzduchem a proběhlo vyhodnocení za pomoci denzitometru při 313 nm.

Ve všech vzorcích byla potvrzena přítomnost *trans*-resveratrolu. V extraktech křídlatky byl stanoven jeho obsah v rozmezí koncentrací 53,3–56,5 mg/100 mg extraktu. V tabletách byl obsah *trans*-resveratrolu 4,56–18,93 mg a v kapslích 9,7 a 14,14 mg. Tyto hodnoty byly téměř shodné s údaji uvedenými na obalech.

5 Závěr

Cílem této práce bylo poskytnout informace o resveratrolu, piceidu, astringinu a piceatannolu. Rešerše tedy zahrnuje popis struktury, vlastností i výskytu těchto látek. Vzhledem k analytickému zaměření práce, jsou zde dále popsány používané metody planární chromatografie, vysokoúčinné kapalinové chromatografie, plynové chromatografie a kapilární elektroforézy.

V hlavní části jsou pak zpracovány konkrétní analýzy těchto látek, rozdělené podle aplikované metody a podle analyzovaných potravin. Práce je zaměřena na popis přípravy vzorku k analýze, podmínky vlastních analýz a souhrn výsledků.

Resveratrol a jeho deriváty jsou nejčastěji stanovovány ve vínech, a právě na ty je zaměřena většina uvedených analýz. Mezi naměřenými hodnotami jsou patrné rozdíly, produkce resveratrolu tedy závisí na mnoha faktorech. Vyšší obsah mají vína z botrytického sběru a vína z hroznů, rostoucích při nepříznivých podmínkách. Dále pak platí, že vyšší obsah resveratrolu mají červená vína, protože při jejich výrobě je mošt déle v kontaktu se slupkami, ve kterých dochází k syntéze resveratrolu. Dále je popsáno stanovení resveratrolu a jeho derivátů v křídlatce kopinaté, loubinci krátkostopečném, kýchavici velkokvěté a thunbergově révě. Tyto byliny jsou běžně používány v Číně a Japonsku jako součást lidové medicíny a nejvyšší obsah resveratrolu je v jejich kořenech. Resveratrol se vyskytuje i v mnoha bobulích, ze kterých se dostává do šťáv, nebo ve chmelu, ze kterého se při výrobě extrahuje do piva. Je však přítomen i v kakaových bobech, ze kterých se pak dostává do čokolády.

Literatura

- [1] A. I. ROMERO-PÉREZ, M. IBERN-GÓMEZ, R. M. LAMUELA-RAVENTÓS, M. C. DE LA TORRE-BORONAT. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 1999, 1533–1536
- [2] Resveratrol - účinný pomocník proti předčasnému stárnutí
Dostupné z: <http://www.prirodnicestou.cz/resveratrol-ucinny-pomocnik-proti-predcasnemu-starnuti>, staženo 4. 6. 2012
- [3] J. ŠMIDRKAL, V. FILIP, K. MELZUCH, I. HANZLÍKOVÁ, D. BUCKIOVÁ, B. KŘÍSA. Resveratrol. *Chemické Listy* 95, 2001, 602-609
- [4] C. COUNET, D. CALLEMIEN, S. COLLIN. Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chemistry* 98, 2006, 649–657
- [5] Resveratrol - klíč k tajemství dlouhověkosti
Dostupné z: <http://empatia.cz/resveratrol-klic-k-tajemstvi-dlouhovekosti> staženo 18.6.2012
- [6] G. CHIVA-BLANCH ET AL. Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 2011, 698-705
- [7] SIRT1 je velmi důležitý pro naši paměť
Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/sirt-je-velmi-dulezity-pro-nasi-pamet/>, staženo 18.6.2012
- [8] Reasons and Explanations Of French Paradox
Dostupné z: <http://www.healthassist.net/food/french/french-paradox.shtml>, staženo 18.6.2012
- [9] H. SCHMANDKE, Resveratrol und Piceid in Weintrauben und Erdnüssen sowie daraus hergestellte Produkte. *Ernährungs-Umschau* 49, 2002, 349-352
- [10] L. LIN, C. LIEN, Y. CHENG, K. KU. An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 853, 2007, 175–182

- [11] S. CARANDO, P.L. TEISSEDE, P. WAFFO-TÉGUO, J.C. CABANIS, G. DEFFIEUX, J.M. MÉRILLON. High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of *trans*-astringin in wine. *Journal of Chromatography A* 849, 1999, 617–620
- [12] S.K. LEE ET AL. Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia* 76, 2005, 258–260
- [13] Pterostilben: resveratrol příští generace
Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/pterostilben-resveratrol-pristi-generace.aspx>, staženo 18.6.2012
- [14] Z. HOLZBECHER, J. CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: SNTL/ALFA, 1987.
- [15] P. KLOUDA. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003.
- [16] O. MIKEŠ. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL- Nakladatelství technické literatury, 1980
- [17] J. GASPARIČ, J. CHURÁČEK. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981
- [18] T. HANAI. *HPLC A Practical Guide*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999.
- [19] HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
Dostupné z: http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/hplc-_vysokoucinnna-kapalinova-chromatografie_.html, staženo 16.6.2012
- [20] M. DOUŠA:HPLC
Dostupné z: <http://hplc.cz/>, staženo 13.5.2012
- [21] M. HOLČAPEK, P. JANDERA. SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (HPLC/MS). *Chemické listy* 92, 1998, 278 - 286
- [22] V. KASIČKA. TEORETICKÉ ZÁKLADY A SEPARAČNÍ PRINCIPY KAPILÁRNÍCH ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD. *Chemické listy* 91, 1997, 320 - 329
- [23] M. A. RODRÍGUEZ-DELGADO, G. GONZÁLEZ, J.P. PÉREZ-TRUJILLO, F.J. GARCÍA-MONTELONGO. *Trans*-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 76, 2002, 371–375

- [24] D. M. GOLDBERG ET AL. A Global Survey of *Trans*-Resveratrol Concentrations in Commercial Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 1995, 159-165.
- [25] G. L. LA TORRE, M. SAITTA, F. VILASI, T. PELLICANO, G. DUGO. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chemistry* 94, 2006, 640–650
- [26] X. VITRAC ET AL. Determination of Stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2005, 5664-5669
- [27] Botrytis cinerea
Dostupné z: <http://www.winedefinitions.com/learningcenter/articles/botrytiscinerea.htm>,
staženo 19.6.2012
- [28] I. DURÁN-MERÁS, T. GALEANO-DÍAZ, D. AIRADO-RODRÍGUEZ. Post-column on-line photochemical derivatization for the direct isocratic-LC-FLD analysis of resveratrol and piceid isomers in wine. *Food Chemistry* 109, 2008, 825-833
- [29] Y. WANG, F. CATANA, Y. YANG, R. RODERICK, R. B. VAN BREEMEN. An LC-MS Method for Analyzing Total Resveratrol in Grape Juice, Cranberry Juice, and in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2002, 431-435
- [30] A. M. RIMANDO, R. CODY. Determination of Stilbenes in Blueberries. *LC-GC North America* 23 (11), 2005, 1192-1200
- [31] L. GAO, Q. CHU, J. YE. Determination of *trans*-Resveratrol in wines, herbs and health food by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry* 78, 2002, 255-260
- [32] Y. PENG, Q. CHU, F. LIU, J. YE. Determination of Phenolic Constituents of Biological Interest in Red Wine by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2004, 153-156
- [33] Z. DOBIÁŠOVÁ, J. PAZOUREK, J. HAVEL. Simultaneous determination of *trans*-resveratrol and sorbic acid in wine by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 23, 2002, 263–267

[34] S. K. BABU, K. V. KUMAR, G. V. SUBBARAJU. Estimation of *trans*-Resveratrol in Herbal Extracts and Dosage Forms by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53(6), 2005, 691—693