

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### OBSAH RESVERATROLU V ZELENINĚ A OVOCI

IRENA KOLOUCHOVÁ<sup>a</sup>, KAREL MELZUCH<sup>a</sup>,  
JAN ŠMIDRKAL<sup>b</sup> a VLADIMÍR FILIP<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, <sup>b</sup> Ústav technologie mléka a tuků, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5 166 28 Praha 6  
irena.kolouchova@vscht.cz

Došlo 13.4.04, přepracováno 8.7.04, přijato 26.10.04.

Klíčová slova: resveratrol, zelenina, ovoce, antioxidanty, stanovení polyfenolů

#### Úvod

Polyfenolové sloučeniny představují významnou část sekundárních rostlinných metabolitů, které se běžně vyskytují u vyšších rostlin. Zvláště flavonoidy jsou účinnými antioxidanty díky své schopnosti reagovat s volnými radikály mastných kyselin a kyslíku.

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben) je přírodně se vyskytující fytoalexin produkovaný některými rostlinami klasifikovanými jako spermatofyty jako odpověď na biotický a abiotický stres, např. napadení patogeny, UV záření, expozice ozónem nebo mechanické poškození<sup>1-5</sup>. Resveratrol byl nalezen ve více než 72 rostlinných druzích, z nichž řada se uplatňuje i v lidské výživě<sup>6,7</sup>. Při podrobnějších výzkumech byl nalezen např. v révě vinné, podzemnici olejné, v mnoha léčivých rostlinách<sup>8</sup> a dalších.

Přípravky obsahující resveratrol byly využívány odedávna v japonské lidové medicíně (Kojō-kon) k léčbě opáření a spálenin, zánětlivých onemocnění (plísňových, bakteriálních), k léčbě aterosklerosy, poruch metabolismu tuků a pro celou řadu dalších terapeutických účelů<sup>9-12</sup>. Jedním z nejbohatších zdrojů je plevelná rostlina *Polygonum cuspidatum*, běžně se vyskytující v Asii, jejíž extrakty z kořenů hrají důležitou roli v orientální medicíně. Chemopreventivní účinky resveratrolu souvisí s inhibicí hydroperoxidasy a cyklooxygenasy, jejichž aktivita je spojována s inicializací nádorového bujení, a také se snižováním hladiny cholesterolu v krvi<sup>3,10,13-15</sup>.

Většinu chronických onemocnění (včetně srdečních) a mnoho typů rakoviny lze nepřímo ovlivnit konzumací potravin s antioxidantními vlastnostmi, včetně vitamínů C, E a β-karotenu. Potravinový rostlinného původu (např. zelenina, ovoce) jsou významným zdrojem antioxidantů a polyfenolových sloučenin, které se v organismu podílejí na

omezení oxidačních reakcí s možnými nepříznivými důsledky<sup>16</sup>.

Většina literatury se zabývá stanovením resveratrolu a vybraných antioxidantů ve vínech<sup>17-19</sup>, hroznech, případně slupkách nebo semenech hroznů<sup>5,20</sup> a jen malá část se zabývá jejich obsahem v ostatních zdrojích např. v brusinkách<sup>21</sup> a v pohance<sup>22</sup>. Mezi rostliny pozitivně testované na resveratrol můžeme řadit i ovoce a zeleninu (cibule, listová zelenina), čaj, morušu apod<sup>7</sup>. Resveratrol byl prokázán také v kořeni arašídů (*Arachis hypogaea*), v arašidech samotných a v arašídových produktech<sup>23,24</sup>. Pražené arašidy obsahovaly nižší množství resveratrolu a vyšší obsah byl ve vařených arašidech<sup>24</sup>.

Cílem práce bylo stanovit obsah resveratrolu a dalších vybraných fenolových látek v zelenině, arašidech a ovoci běžně dostupném v České republice. Byl stanovován obsah celkových polyfenolických látek (TP) a polyfenolů typu pyrokatecholu, resorcinolu a floroglucinu (CRP). Tyto markery odráží antioxidační aktivitu vzorků. Resveratrol a kvercetin byly stanovovány HPLC s elektrochemickou detekcí.

#### Experimentální část

##### Resveratrol

*trans*-Resveratrol v krystalické podobě (v čistotě větší než 99 %) byl připraven totální syntézou<sup>25</sup>. Standardní roztok *trans*-resveratrolu (10 mg l<sup>-1</sup>) v 40 % v/v vodném ethanolu byl uchováván v temnu, při 4 °C. *cis*-Resveratrol byl získán 10 h expozicí roztoku *trans*-resveratrolu ve vodném ethanolu rozptýlenému dennímu světlu. Za těchto podmínek 80 % *trans*-resveratrolu isomerovalo na *cis*-isomer.

##### Kvercetin

Standardní roztok kvercetinu (Sigma, USA) o koncentraci 25 mg l<sup>-1</sup> v 40 % v/v vodném ethanolu byl uchováván při 4 °C.

##### Stanovení resveratrolu a kvercetinu

*Trans*- a *cis*-resveratrol a kvercetin byly stanovovány pomocí přístroje pro HPLC (3500, TSP, USA) s použitím elektrochemického detektoru HP 1049 s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (Hewlett-Packard, USA) při potenciálu 0,75 V. Extrakty byly filtrovány přes mikrofiltr (0,2 μm, Millipore, U.S.A.) a permeát (20 μl) byl nastříkovan na kolonu Nucleosil (Supelco, USA) 120-5-C18 (250 × 4 mm, 5 μm) s předkolonou (10 × 4 mm) se stejnou stacionární fází. Byla použita isokratická eluce (mobilní fáze obsahovala: 25 % acetonitrilu, 0,1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a NaCl (*c* = 5 mmol l<sup>-1</sup>)) s průtokem 1,0 ml min<sup>-1</sup>. Identifikace a kvanti-

fikace resveratrolu a kvercetinů byla prováděna metodou standardního přídatku.

#### V z o r k y

Byly analyzovány vzorky zeleniny, arašídů a ovoce běžně dostupné na trhu v ČR. Šlo o vzorky čínské zelí, bílého a červeného zelí, květáku, růžičkové kapusty, kapusty, brokolice, česneku, žluté a červené cibule, čekanky, hlávkového, ledového salátu a salátu Lollo Rosso, špenátu, mrkve, petržele, červené řepy, podzemnice olejné, višně obecné, maliníku, ostružiníku, aronie černé, jeřábu moravského, borůvky, černého a červeného rybízu a angreštu.

#### Extrakce rostlinných materiálů

Čerstvé vzorky zeleniny, ořechů a ovoce byly po rozmělnění extrahovány v 80 % (v/v) ethanolu (za studena) po dobu 24 hodin. Poměr rostlinného materiálu k přidávanému extrakčnímu roztoku byl 1:3. Extrakce byla prováděna ve tmě a kapalná fáze byla po extrakci separována od tuhé filtrací (0,2  $\mu\text{m}$ , Millipore, U.S.A.). Získaná data byla přepočítána na sušinu původního vzorku.

#### Výsledky

##### Opakovatelnost, linearita, detekční limit analytu

Opakovatelnost byla stanovena metodou opakovaného nástřiku standardních roztoků *trans*-resveratrolu (10  $\text{mg l}^{-1}$ ) a kvercetinů (25  $\text{mg l}^{-1}$ ) za vybraných optimálních podmínek. Relativní standardní odchylka (RSD) byla pro *trans*-resveratrol 1,78 % pro výšku píku a 1,42 % pro retenční čas (13,5 min,  $n = 9$ ) a pro kvercetin byla RSD 2,05 % pro výšku píku a pro retenční čas 1,45 % (24,1 min,  $n = 9$ ).

Pro stanovení linearit metody, byla testována koncentrační řada *trans*-resveratrolu od 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  do 10  $\text{mg l}^{-1}$  a kvercetinů od 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  do 25  $\text{mg l}^{-1}$ . Kalibrační křivka *trans*-resveratrolu vykazovala linearitu v celém koncentračním rozsahu s korelačním koeficientem 0,9997 a kalibrační křivka kvercetinů vykazovala linearitu v koncentračním rozmezí 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  až 15  $\text{mg l}^{-1}$  s korelačním koeficientem 0,9986. Detekční limit *trans*-resveratrolu byl 8  $\mu\text{g l}^{-1}$  a kvercetinů 35  $\mu\text{g l}^{-1}$  (3 S/N).

##### V ý t ě ŝ n o s t

Výtěžnost a reprodukovatelnost stanovení za optimálních podmínek byla provedena vyhodnocením přesnosti a správnosti metody. Správnost metod byla ověřena Studentovým t-testem. Výsledky ukázaly, že na hladině významnosti 95 % poskytují metody správné výsledky. Výtěžnost stanovení *trans*-resveratrolu a kvercetinů ve vzorcích zeleniny, zeleného čaje, chmele a ořechů za optimálních podmínek byla stanovena metodou standardního přídatku ( $n = 5$ ). Relativní standardní odchylka (RSD) ve všech reálných vzorcích u *trans*-resveratrolu i kvercetinů při  $n = 5$  byla v rozmezí 1,1–2,1 %.

#### A n a l ý z a v z o r k ů

Ve všech analyzovaných vzorcích zeleniny byla zaznamenána alespoň stopová množství resveratrolu (tab. I). Větší množství obsahovaly červená řepa a červená cibule a nejvyšší koncentrace byla stanovena u špenátu (až 0,02  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$ ). Stanovené hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,005 až 0,02  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$ . Stanovené koncentrace kvercetinů se pohybovaly od stopových množství do 0,76  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$ , tato maximální koncentrace byla zjištěna u vzorku hlávkové kapusty. Většina hodnot se pohybovala od 0,02 do 0,14  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$ . Nejmenší obsah analyzovaných látek byl kromě vzorku ledového salátu zjištěn také u česneku, u nichž stanovené koncentrace resveratrolu i kvercetinů byly podprůměrné. Bylo zjištěno, že z hlediska obsahů celkových polyfenolů (TP) se hodnoty pohybují v rozmezí 5  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$  (mrkev) a 30  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$  (červené zelí), u látek typu pyrokatecholu, resorcinolu a floroglucinu (CRP) v rozmezí 0,02 (mrkev) až 0,08  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$  (červená řepa a petržel).

U burských oříšků bylo zjištěno, že koncentrace resveratrolu v analyzovaných vzorcích ořechů byla celkově nižší (tab. II). Nalezené hodnoty se pohybovaly mezi 0,002 a 0,0015  $\text{mg/g}_{\text{suš}}$ . Větší množství resveratrolu sice bylo nalezeno v červenohnědých slupkách, ale ani tato koncentrace nepotvrdila očekávané hodnoty<sup>25</sup>. Nejvyšší obsah

Tabulka I

Nalezený obsah resveratrolu a kvercetinů ve vzorcích zeleniny ( $\text{mg/g}_{\text{suš}}$ )

Zelenina	Resveratrol			Kvercetin
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	celkem	
Čínské zelí	0,0092	stopy <sup>a</sup>	0,0092	0,073
Bílé zelí	0,0076	stopy <sup>a</sup>	0,0076	0,12
Červené zelí	0,011	0,0041	0,015	0,14
Květák	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	0,031
Růžičková kapusta	0,015	stopy <sup>a</sup>	0,015	0,10
Kapusta	0,0035	0,0035	0,0070	0,76
Brokolice	0,010	0,0046	0,015	0,040
Česnek	0,0021	0,0016	0,0040	0,023
Žlutá cibule	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	0,040
Červená cibule	0,0038	0,0034	0,0070	0,034
Čekanka	0,012	stopy <sup>a</sup>	0,012	stopy <sup>a</sup>
Salát hlávkový	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>
Ledový salát	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>	stopy <sup>a</sup>
Salát Lollo Rosso	0,0068	stopy <sup>a</sup>	0,0070	0,043
Špenát	0,010	0,0061	0,016	0,038
Mrkev	0,0038	stopy <sup>a</sup>	0,0040	0,030
Petržel	stopy <sup>a</sup>	0,0047	0,0047	0,064
Červená řepa	0,0075	stopy <sup>a</sup>	0,0075	0,017

<sup>a</sup> Hodnota pod mezí stanovitelnosti

Tabulka II

Nalezený obsah resveratrolu a kvercetinů ve vzorcích burských oříšků (mg/g<sub>suš</sub>)

Část	Resveratrol			Kvercetin
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	celkem	
Jádro	0,0004	0,0020	0,0024	0,023
Vnější slupka	0,0079	0,0014	0,0092	0,11
Skořápka	0,012	0,0028	0,015	5,9

Tabulka III

Nalezený obsah resveratrolu a kvercetinů v ovoci (mg/g<sub>suš</sub>)

Ovoce	Resveratrol			Kvercetin
	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -	celkem	
Višeň obecná	0,0060	stopa <sup>a</sup>	0,0060	0,0065
Maliník obecný	stopa <sup>a</sup>	stopa <sup>a</sup>	stopa <sup>a</sup>	0,0044
Ostružiník	0,0008	stopa <sup>a</sup>	0,0008	0,022
Aronie černá	0,031	0,0011	0,032	0,035
Jeřáb moravský	0,0009	stopa <sup>a</sup>	0,0009	0,011
Borůvka černá	stopa <sup>a</sup>	stopa <sup>a</sup>	stopa <sup>a</sup>	0,0096
Černý rybíz	0,015	0,0009	0,016	0,012
Červený rybíz	0,0012	stopa <sup>a</sup>	0,0012	0,0082
Angrešt	stopa <sup>a</sup>	stopa <sup>a</sup>	stopa <sup>a</sup>	0,0035

<sup>a</sup> – Hodnota pod mezí stanovitelnosti

resveratrolu byl obsažen v dřevitých skořápkách ořechů, což bylo naopak předpokládáno<sup>24</sup>. Při srovnání nalezených hodnot kvercetinů byl zvýšený obsah opět nalezen v dřevitých skořápkách (6 mg/g<sub>suš</sub>). Největší množství TP bylo v hnědočervených slupkách arašídů (3 mg/g<sub>suš</sub>). Při srovnání jednotlivých částí z hlediska obsahu látek typu CRP byl největší obsah potvrzen ve vnitřních slupkách (~ 6 mg/g<sub>suš</sub>).

K problematice obsahu resveratrolu v ovoci nebyl nalezen žádný odpovídající materiál, a proto naše výsledky nelze s ničím porovnat. Byly prováděny analýzy resveratrolu v bobulovém ovoci a v některých peckovinách (tab. III). Většina analyzovaného ovoce obsahovala stopová množství resveratrolu a pouze černý jeřáb (aronie) a černý rybíz měly významnější množství resveratrolu (0,032 mg/g<sub>suš</sub> a 0,016 mg/g<sub>suš</sub>). Z peckovin byla nejvyšší koncentrace zjištěna u višně (0,006 mg/g<sub>suš</sub>), u ostatních peckovin byla nalezena stopová množství nebo množství pod mezí detekce. Bylo překvapením, že ani borůvky neměly obsah resveratrolu nad mezí stanovitelnosti.

## Diskuse

Průměrné poměry mezi obsahy resveratrolu, kvercetinů, TP a CRP (zelenina, ořechy a ovoce) lze číselně vyjádřit jako 1 : 50 : 1000 : 10.

Svého druhu je prezentovaná studie jedinečná, protože porovnáním obsahů těchto látek, které se uvádějí jako významné pro lidské zdraví a prevenci chorob, se žádá z publikací nezabývala. A také předložené výsledky vyvracejí některé dávné mýty např. o obsahu polyfenolových látek v česneku, kdy se námi naměřené hodnoty jeví jako podprůměrné. Naopak ve srovnání s ostatními druhy zeleniny bylo značné množství těchto látek zjištěno např. v zelí a naťové petrželi. Nejvyšší množství resveratrolu bylo stanoveno v červeném zelí a špenátu.

## LITERATURA

- Schubert R., Fischer R., Hain R., Schreier P. H., Bahnweg G., Ernst D., Sandermann H.: *Plant Mol. Biol.* 34, 417 (1997).
- Grimming B., Schubert R., Fische R., Hain R., Schreier P. H., Betz Ch., Ernst D., Sandermann H.: *Acta Physiol. Plant.* 19, 467 (1997).
- Frémont L.: *Life Sci.* 66, 663 (2000).
- Sorheeswaran S., Pasupathy V.: *Phytochemistry* 32, 1083 (1993).
- Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M.: *Clin. Biochem.* 30, 91 (1997).
- Arce L., Tena M. T., Rios A., Valcárcel M.: *Anal. Chim. Acta* 359, 27 (1998).
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing k. V., Thomas C. F., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M.: *Science* 275, 218 (1997).
- Oleszek W., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizzi C., Cheeke P.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 747 (2001).
- Lamuela-Raventós R. M., Romero-Pérez A. I., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M. C.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 281 (1995).
- Belguendouz L., Fremont L., Linard A.: *Biochem. Pharmacol.* 53, 1347 (1997).
- Trela B. C., Waterhouse A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 1253 (1996).
- Gao L., Chu Q., Ye J.: *Food Chem.* 78, 255 (2002).
- Kawada N., Seki S., Inoue M., Kuroki T.: *Hepatology* 27, 1265 (1998).
- Romero-Pérez A. I., Lamuela-Raventós R. M., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M.C.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 2124 (1996).
- Savouret J. F., Quesne M.: *Biomed. Pharmacother.* 56, 84 (2002).
- Weisburger J.H.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 943 (1999).
- Leško J., Kakalíková L., Bobeková V., Lešková L.: *Vinohrad* 4, 75 (1998).
- Romero-Pérez A. I., Lamuela-Raventós R. M., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M.C.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 2124 (1996).
- Lamuela-Raventós R. M., Romero-Pérez A. I., Waterhouse A. L., de la Torre-Boronat M. C.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 281 (1995).
- Okuda T., Yokotsuka K.: *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 93 (1996).

21. Wang Y., Catana F., Yang Y., Roderick R., van Breen R. B.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 431 (2002).
22. Quian J.-Y., Mayer D., Kuhn M.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 9, 343 (1999).
23. Chen R.-S., Wu P.-L., Chiou Y.-Y.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 1665 (2002).
24. Sobolev V. S., Cole R. J.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 1435 (1999).
25. Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I.: *Chem. Listy* 95, 602 (2001).
26. Sobolev V.S.: *J. AOC Int.* 78, 1177 (1995).

**I. Kolouchová<sup>a</sup>, K. Melzoch<sup>a</sup>, J. Šmidrkal<sup>b</sup>, and V. Filip<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering*, <sup>b</sup> *Department of Dairy and Fat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **The Content of Resveratrol in Vegetables and Fruit**

Resveratrol and other polyphenolic compounds are currently in the limelight all over the world due to their beneficial effects on the human body. This work describes the occurrence and determination of *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol and quercetin in various vegetables and fruits. An HPLC method with electrochemical detection is used for the determination. The concentrations of resveratrol were found to range from trace quantities up to 0.03 mg per g of dry weight of *trans*-resveratrol and 0.006 mg/g of *cis*-resveratrol. The highest known concentration was found in red cabbage and spinach, while a surprisingly low concentration was found in garlic. The quercetin content ranged from 0.003 mg/g to 5.9 mg/g. At the same time, we determined the total contents of polyphenolics and materials of the benzenediol type: their concentrations were found to range from 2 to 550 and from 0.005 to 6 mg/g, respectively.

**Česká společnost chemická,  
Ústav chemie a technologie sacharidů VŠCHT Praha  
a Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR**

pořádají

**konferenci „Struktura a biologické účinky polysacharidů a jejich derivátů“**

*11.11.2005, 8,30 až 16,00 h na Novotného lávce 5, Praha 1*

Předběžný program konference:

- Čopíková J.: Úvodní přednáška
- Synytsya A.: Deriváty pektinu
- Marounek M.: Metabolismus pektinu a fyziologické účinky jeho derivátů
- Jablonský I.: Glukany v bazidiomycetách a jejich specifika
- Maryška M.: PM polysacharidů a dalších přírodních materiálů
- Erban V.: Testování polysacharidů jako prebiotika
- Spěváček J.: Strukturální charakterizace  $\beta$ -glukanů <sup>13</sup>C NMR spektroskopii pevného stavu
- Šimánek V.:  $\beta$ -Oligofruktany z jakonu (*Smallanthus sonchifolius*) jako prebiotika v doplňcích stravy
- Větvíčka V.
- Posterová sekce

Vložené 500 Kč zahrnuje CD s plnými texty přednášek. Abstrakta budou publikována v Chemických listech č. 9/2005.

Je možné zajistit ubytování na kolejích na Jižním městě. Předpokládá se i zájem pasivních účastníků bez odborného příspěvku.

**Posunutá uzávěrka přihlášek a zaslání abstraktů příspěvků je 29. července 2005.**

Bližší informace na adrese <http://www.multiweb.cz/polysacharidy> .

Kontaktní adresa: Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1, tel.: 221 082 370, tel/fax: 222 220 184, e-mail: [chem.listy@csvts.cz](mailto:chem.listy@csvts.cz)