

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### STANOVENÍ VOLNÉHO A CELKOVÉHO KVERCETINU V MORAVSKÝCH ČERVENÝCH VÍNECH

EVA DADÁKOVÁ<sup>a</sup>, NADĚŽDA VRCHOTOVÁ<sup>b</sup>, JAN TRÍSKA<sup>b</sup> a MARIE KYSELÁKOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Katedra chemie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích a <sup>b</sup>Ústav ekologie krajiny, Akademie věd České republiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, <sup>c</sup>Ústav posklizňové technologie zahradnických produktů, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 691 44 Lednice

e-mail: dadakova@zf.jcu.cz, nada@uek.cas.cz, triska@uek.cas.cz, kyselm@zf.mendelu.cz

Došlo 2.4.03, přepracováno 10.4.03, přijato 19.4.03.

Klíčová slova: červená vína, kvercetin, HPLC, kapilární elektroforéza

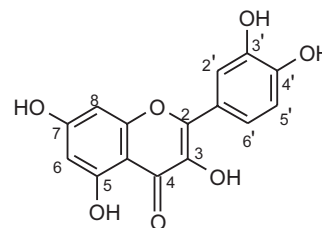
### Úvod

Flavonoidy jsou početně bohatou a pestrá skupinou přírodních polyfenolických látek výhradně rostlinného původu. Podle struktury se dělí na několika skupin a mezi nejznámější zástupce patří flavonoly, katechiny a anthokyany. Vyskytují se přirozeně v ovoci, zelenině, ořechách a semenech, a tak jsou nedílnou složkou lidské potravy. Flavonoidy vykazují mnoho pozoruhodných a pro člověka zajímavých biologických účinků. V první řadě fungují jako účinné antioxidanty a jsou schopny zachytávat reaktivní radikály. Mohou vytvářet cheláty s dvojnásobnými prooxidačně působícími ionty kovů, zejména Fe a Cu. Nezanedbatelné jsou také jejich účinky antibakteriální a virostatické, protizánětlivé a vazodilatační. Antioxidačně působící flavonoidy ochraňují krevní lipidy, zejména frakci LDL, před oxidací a zabraňují tak vzniku aterosklerózy a trombotických onemocnění<sup>1</sup>. Je prokázáno, že dostatečný příjem flavonoidů a ostatních polyfenolů vyváženou stravou je spojen s nižším výskytem onemocnění srdce a cév<sup>2</sup>.

Z velkého počtu přírodních flavonoidů se ve významnějších koncentracích v přírodním materiálu vyskytuje jen několik. Mezi ně patří flavonol kvercetin (obr. 1). Jeho antioxidační schopnosti jsou díky jeho chemické struktuře mimořádné<sup>3</sup> a je účinnějším antioxidantem než vitamíny C a E. Na druhé straně je nutno říci, že některé flavonoidy, a mezi nimi i kvercetin, vykazují nejen antioxidační aktivitu, ale v některých případech i aktivitu prooxidační. Podle nejnovějších výzkumů se zdá, že alkylace hydroxyskupiny v poloze 7 zvyšuje záchyt

radikálů a naopak kvercetin a jeho deriváty s volnými hydroxyskupinami mající v části molekuly strukturu pyrokatecholu a navíc s volnou hydroxyskupinou v poloze 3 mohou za určitých okolností vykazovat prooxidační aktivitu<sup>4</sup>. Pro zablokování této aktivity by neměla být posledně zmíněná hydroxyskupina volná, jako je tomu např. u rutinu, jehož konzumace by tedy byla výhodnější. Otázkou také je, kolik volného kvercetinu zůstává např. v krevní plazmě po jeho přijetí potravou či nápoji. Ve studii publikované v poslední době zjistili autoři<sup>1</sup>, že po podání kvercetinu jako přísady do bílého vína a ovocného, nebo zeleninového džusu pokusným osobám v dávce 25 mg na 70 kg váhy, se maximum obsahu konjugátů kvercetinu objevilo v krevní plazmě již 30 min po podání, přičemž podíl volného kvercetinu činil cca 20 %. Kvercetin je v rostlinném materiálu obvykle vázán na některý sacharid a vytváří tak glykosidy, které jsou rozpustnější ve vodě a stabilnější. Volný kvercetin se může vyskytovat v potravinách po některých technologických úpravách, jako je například konzervace v kyselém prostředí a mikrobiální postupy<sup>5</sup>.

Červené víno je bohatým zdrojem flavonoidů a ostatních polyfenolických látek a jejich obsah závisí na odrůdě révy, podmínkách pěstování révy a technologii výroby vína. V červeném víně se vyskytují zejména anthokyany vytvářející typickou barvu vína, katechiny, kvercetin ve volné a glykosidicky vázané formě a příbuzný derivát stilben, resveratrol. Právě tyto látky jsou z hlediska svých antioxidačních schopností hodnoceny jako nejcennější. Alkohol, kterého víno obsahuje v průměru 12 %, bývá také spojován s kladnými účinky vína na lidský organismus<sup>6</sup>. Výživa, která je bohatá na přírodní antioxidanty, působí příznivě při prevenci tzv. civilizačních chorob jako jsou např. onemocnění srdce a cév. Ta jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Umírněná konzumace vína, zejména červeného, je spojována s poklesem výskytu onemocnění srdce a cév. Je zřejmé, že za tento efekt je odpovědný souhrn fenolických látek obsažených ve víně. Z biologicky aktivních flavonoidů červeného vína byly dosud zkoumány zejména katechiny a resveratrol, údajů o obsahu kvercetinu ve víně je méně. Výzkum fenolických látek v červených vínech probíhá zejména ve státech s dlouhou tradicí výroby vína. U nás byla sledována moravská červená vína<sup>7–10</sup>, méně pak vína české proveniencí<sup>8,11</sup> a většinou byl měřen obsah resveratrolu, u některých pak obsah katechinu, epikatechinu a gallové kyseliny<sup>10</sup>. Data o obsahu kvercetinu v českých a moravských vínech chybí zcela.



Obr. 1. Strukturální vzorec kvercetinu

## Experimentální část

### Materiál

Všechna vína pocházela ze čtyř vinařských oblastí moravského regionu a měla jakostní stupně: jakostní, pozdní sběr a výběr z hroznů. Obsah volného a celkového kvercetinů byl stanovován v 10 vzorcích 5 odrůd z roku 2000 a v 13 vzorcích 8 odrůd z roku 2001.

### Použité chemikálie

Acetonitril a methanol (LiChrosolv, Merck), trifluoroctová kyselina (TFA) a 1-naftyloctová kyselina (Fluka), SPE kolonky RP-18 (LiChrolut, Merck), borax a SDS (Sigma), kyselina boritá, HCl a NaHCO<sub>3</sub> (Lachema Brno), kyselina L-askorbová (Merck), kvercetin (Aldrich).

### Přístroje

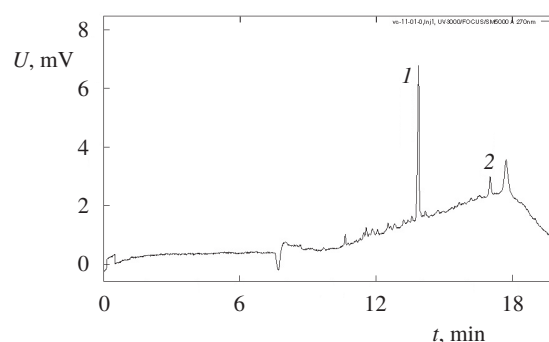
HPLC: kapalinový chromatograf HP 1050 (Hewlett-Packard, USA), kolona C18, 3 μm, 2×150 mm (Luna Phenomenex, USA), detektor s diodovým polem (HP 1040, Hewlett-Packard, USA). Nastřikovaný objem byl 5 μl.

Kapilární elektroforéza: Spectra Phoresis 2000 (Thermo Separation Product, Fremont, USA), křemenná kapilára Celest FS 75, 70 cm × 75 μm (Supelco).

### Metodika

#### Stanovení celkového obsahu kvercetinů ve víně

Směs 2,5 ml vzorku, 12,5 ml methanolu, 5 ml 6 M-HCl, 5 ml redestilované vody a 80 mg kyseliny askorbové byla



Obr. 2. Typický elektroforeogram hydrolyzátu červeného vína; 1 – vnitřní standard, 2 – kvercetin

hydrolyzována pod zpětným chladičem 2 hodiny na vodní lázni při teplotě 90 °C. Po ochlazení byl hydrolyzát zneutralizován 2 g NaHCO<sub>3</sub> a převeden 12,5 ml methanolu a 100 ml vody do kádinky na 600 ml. Kyselost hydrolyzátu byla upravena roztokem NaHCO<sub>3</sub> na hodnotu pH 3. Hydrolyzát byl doplněn vodou na objem 500 ml a prolit kolonkou (předem kondicionovanou 10 ml methanolu a 10 ml vody) rychlostí zhruba 15 ml za minutu. Poté byla kolonka promyta 10 ml vody a sušena 15 minut procházejícím vzduchem. Kvercetin byl z kolonky eluován 1,4 ml methanolu. K eluátu bylo přidáno 0,1 ml roztoku vnitřního standardu (2 mg·ml<sup>-1</sup> 1-naftyloctové kyseliny v methanolu). Vzorky byly měřeny na kapilární elektroforéze (obr. 2). Pracovní pufr: 10 mM boraxu, 10 mM kyseliny borité, 20 mM SDS, 15% (v/v) methanolu, pH 9,2. Podmínky analýzy: 25 °C, 20 kV, detekce analytu při 270 nm, hydrodynamický nástřik 2 s.

Jako analytická odezva byl brán poměr ploch píků kver-

Tabulka I

Obsah kvercetinů v červených moravských vínech

Vzorek	Odrůda	Jakostní stupeň	Oblast	Producent	Obsah kvercetinů [mg·l <sup>-1</sup> ]			
					2000		2001	
					volný	celkový	volný	celkový
1	Zweigeltrebe	jakostní	velkopavlov.	Révovín	5,02	15,79	1,23	4,49
2	Svatovavřínecké	jakostní	velkopavlov.	Révovín	4,40	9,60	1,27	4,59
3	Frankovka	jakostní	velkopavlov.	Révovín	3,08	12,00	1,59	5,16
8	Svatovavřínecké	pozdní sběr	velkopavlov.	Baloun	n.d. <sup>a</sup>	2,40	n.d. <sup>a</sup>	2,73
9	Frankovka	výběr z hroznů	velkopavlov.	Baloun	n.d. <sup>a</sup>	2,53	n.d. <sup>a</sup>	1,39
10	Zweigeltrebe	jakostní	strážnická	Blatel	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	0,25	2,25
11	André	jakostní	strážnická	Blatel	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	0,98	4,90
12	Svatovavřínecké	jakostní	strážnická	Blatel	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	0,99	6,81
13	Rulandské modré	jakostní	strážnická	Blatel	5,34	15,18	1,37	6,86
15	Svatovavřínecké	výběr z hroznů	znojemská	Vin. skl. Lech.	n.d. <sup>a</sup>	<sup>b</sup>	1,17	3,26
16	Frankovka	pozdní sběr	znojemská	Vin. skl. Lech.	n.d. <sup>a</sup>	1,77	0,98	5,61
17	Rulandské modré	jakostní	znojemská	Forman	1,30	7,71	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>
18	Frankovka	jakostní	brněnská	Forman	3,95	7,96	1,45	5,29
19	Svatovavřínecké	jakostní	brněnská	Forman	1,30	9,32	0,53	2,34

<sup>a</sup> n.d. – pod mezí detekce, <sup>b</sup> vzorek nebylo možno získat

Tabulka II  
Hodnoty publikovaných obsahů volného a celkového kvercetinu ve vínech

Druh vína	Země původu	Kvercetin [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]		Lit.
		volný	celkový	
Červené 1990		nestanoveno	4,1–16	2
Bílé 1990		nestanoveno	<0,5	2
Červené <sup>a</sup>		0,1–15,8	1,2–21,8	15
Červené	Bulharsko	0,7–4,5	2,1–7,7	16
	Španělsko	12,6–43,1 <sup>b</sup>	nestanoveno	12
	Španělsko (Kanárské ostr.)	8,45–25,57	nestanoveno	13

<sup>a</sup> Dosud nejrozsáhlejší publikovaný soubor, <sup>b</sup> nejvyšší publikovaná hodnota

cetinu a vnitřního standardu. Kvantifikace obsahu byla provedena kalibrací. Výťažnost kvercetinu z materiálu se pohybovala pro různé typy vzorků v rozmezí 64 až 96 % a byla stanovena pro každý vzorek zvlášť metodou standardního přídatku. Detekční limit byl  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Rozšířená nejistota postupu s koeficientem rozšíření 2 byla odhadnuta z rozboru dílčích nejistot jednotlivých kroků metody a činila 15 %.

#### Stanovení volného kvercetinu

Volný kvercetin byl stanoven pomocí HPLC, vzorek vína byl aplikován bez jakýchkoli úprav. Byla použita gradientová eluce (Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,15% TFA. Mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,15% TFA, voda do 100%. Gradient: 25% B – 50% B, 20 min. Průtok:  $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Detekce při 250 nm (záznam snímán v rozsahu 190–600 nm). Detekční limit  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

#### Výsledky a diskuse

Naměřené obsahy volného a celkového kvercetinu jsou uvedeny v tabulce I. Z této tabulky je zřejmé, že obsah volného kvercetinu se u měřeného souboru vzorků vín pohybuje v rozmezí od  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $5,34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , obsah celkového kvercetinu pak od  $1,39 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $15,79 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Uvedené hodnoty můžeme porovnat s hodnotami publikovanými v literatuře, jejichž přehled je uveden v tabulce II. Porovnáním námi naměřených hodnot s dosud největším naměřeným souborem 65 vzorků vín uvedeným v řádku 3 tabulky II můžeme říci, že se moravská vína nacházejí asi v první polovině hodnot tohoto souboru a nijak významně nevybočují z řady. Na druhé straně jsou zřetelné poněkud vyšší hodnoty u španělských vín<sup>12,13</sup>. Z hlediska ročníku pak můžeme konstatovat, že s výjimkou dvou vzorků je u ostatních hodnot obsahu jak volného tak celkového kvercetinu zcela patrná tendence k vyšším hodnotám u ročníku 2000. Autoři zabývající se vlivem slunečního záření na obsah některých fenolických látek v hroznech a ve víně prokázali<sup>14</sup>, že intenzita slunečního záření je určujícím faktorem pro obsah jak glykosylovaného, tak volného kvercetinu. Z námi sebraných klimatologických dat pro vystoupení na XXVIIIth World Congress of Vine and Wine<sup>9</sup> vyplý-

vá, že rok 2000 byl bohatší na sluneční záření a tento fakt může být tedy jeden z důvodů vyššího obsahu obou forem kvercetinu.

*Tato studie byla vypracována v rámci projektu NAZV QD 1155 „Vliv suroviny a technologie zpracování na obsah zdravotně prospěšných polyfenolických látek v révových vínech“ a MSM 122200002/2. Autoři děkují dále RNDr. J. Totuškoví, CSc., Ing. J. Veverkovi a Ing. J. Balíkovi, PhD. za zajištění vzorků měřených vín.*

#### LITERATURA

- Goldberg D. M., Yan J., Soleas G. J.: *Clin. Biochem.* 36, 79 (2003).
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., van de Putte B.: *J. Agric. Food Chem.* 41, 1242 (1993).
- Cook N. C., Samman S.: *J. Nutr. Biochem.* 7, 66 (1996).
- Kessler M., Ubeaud G., Jung L.: *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 131 (2003).
- Davídek J., Janíček G., Pokorný J.: *Chemie potravin*. SNTL, Praha 1983.
- Frankel E. N., Kanner J., German J. B., Parks E., Kinsella J. E.: *Lancet* 341, 454 (1993).
- Totušek J., Vrchotová N., Tříška J., Marečková L.: *Chem. Listy* 94, 973 (2000).
- Kolouchová-Hanzlíková I., Melzoch K., Filip V., Šmidrkal J.: *Vitamins 2002, Pardubice, 3.–5. září 2002*, sborník konference (Blatná J., Horna A., Zima T., ed.), str. 173. Univerzita Pardubice, Pardubice 2002.
- Tříška J., Kyseláková M., Totušek J., Vrchotová N., Lefnerová N., Balík J., Veverka J.: *XXVIIIth World Congress of Vine and Wine, Bratislava, 24–28 June 2002*, str. 126.
- Tříška J., Kyseláková M., Totušek J., Vrchotová N., Lefnerová N., Balík J., Veverka J.: *XXVIIIth World Congress of Vine and Wine, Bratislava, 24–28 June 2002*, str. 125.
- Hanzlíková I., Melzoch K., Filip V., Buckiová D., Šmidrkal J.: *Proc. EUROFOODCHEM XI, Norwich, 26–28 September 2001* (Pfannhauser W., Fenwick G. R., Khokhar S., ed.), str. 220.
- Viñas P., López-Erroz C., Marín-Hernández J. J., Hernández-Córdoba M.: *J. Chromatogr., A* 871, 85 (2000).

13. Rodríguez-Delgado M.-Á., González-Hernández G., Conde-González J.-E., Pérez-Trujillo J.-P.: *Food Chem.* 78, 523 (2002).
14. Price S. F., Breen P. J., Valladao M., Watson B. T.: *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 187 (1995).
15. Mc Donald M. S., Hughes M., Burns J., Lean M. E. J., Matthews D., Crozier A.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 368 (1998).
16. Tsanova-Savova S., Ribarova F.: *J. Food Comp. Anal.* 15, 639 (2002).

**E. Dadáková<sup>a</sup>, N. Vrchotová<sup>b</sup>, J. Tříška<sup>b</sup>, and M. Kyšláková<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, <sup>b</sup>*Institute of*

*Landscape Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice*, <sup>c</sup>*Department of Postharvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Lednice*): **Determination of Free and Conjugated Quercetin in Moravian Red Wines**

Free and conjugated quercetin in Moravian red wines were determined after acid hydrolysis. The measured concentrations are in agreement with most published data in the literature. The comparison of vintage years 2000 and 2001 revealed increased concentrations of both quercetin types in 2000, which could be a consequence of a longer sunshine period in that year.

---

---

**PRODÁM KOMPLETNÍCH 31 ROČNÍKŮ**

***Journal of Chemical Education (1964 až 1995)***

**ZA NABÍDNUTOU CENU**

**Prof. Josef Pacák (pacak@natur.cuni.cz)**

---

---