

*Е. Скорбанова,
Н. Таран,
М. Черней,
О. Тамней,
П. Рында,
Н. Дегтярь*

Публичное учреждение «Научно-практический институт садоводства,
виноградарства и пищевых технологий»,
Республика Молдова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОМЕРНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ В КРАСНЫХ СУХИХ ВИНАХ МЕТОДОМ ВЫСОКО-ЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (HPLC)

Введение

Красное виноградное вино содержит значительное количество полифенолов, обладающих биологической активностью относительно организма человека. Это связано с Р-витаминной активностью флавоноидов, антимикробной – катехинов, а весь комплекс полифенолов обладает антилучевым, антистрессовым, антиоксидантным действием [4,8,9].

По мнению ученых, исследовавших данный вопрос, высокие антиоксидантные свойства в красных винах обусловлены присутствием таких веществ как ресвератрол, кверцетин и рутин. Они препятствуют процессам окисления, способствуют снижению липидов в клеточных мембранах, предотвращают негативное воздействие свободных радикалов, замедляют преждевременное старение клеток живых организмов [3,6,10,11].

Ввиду повышенного интереса к мономерным флавоноидам, как важным природным антиоксидантам, обладающим биологической активностью, разработка методов определения их содержания в красных виноградных винах является актуальным.

Наиболее часто для определения биологически активных полифенолов применяют спектрофотометрический и электрохимический методы [9].

Однако, метод высоко-эффективной жидкостной хроматографии (HPLC) дает возможность определить количество отдельных флавоноидов, из выделенной группы фенольных веществ [1,2,5,7,8].

Основной целью наших исследований являлась разработка метода определения мономерных полифенолов (ресвератрол, рутин и кверцетин) в сухих красных винах из различных сортов винограда, районированных в Республике Молдова.

Материалы и методы

Метод высоко-эффективной жидкостной хроматографии (HPLC) позволяет разделить фенольные соединения, на специальной хроматографической колонке, затем определить их количественно. Мы выбрали оптимальные режимы разделения смеси мономерных полифенолов и использовали разработанную методику для количественного дифференцированного определения вышеназванных соединений, в красных винах из разных сортов винограда.

Отработку режимов определения фенольных соединений методом HPLC и дальнейшие исследования осуществляли на жидкостном хроматографе LC-20A Prominace, Shimadzu на колонке CC 125/4 Nucleosil 100-5c 18 Nautilus. Детектор SPD-20AV UV/VIS, которым оснащен данный жидкостной хроматограф, включает в себя дейтериевую и вольфрамовую галогенные лампы, в результате расширяются аналитические возможности до видимого диапазона.

Для выбора оптимальных условий разделения смеси мономерных полифенолов мы использовали элюенты: ортофосфорную кислоту, ацетон, метанол и различные режимы хроматографического разделения.

При использовании в качестве элюента смеси ортофосфорной кислоты (10%) и ацетона и при режиме разделения:

Объем инжестируемой пробы, μl	10
Длина волны, nm	305
Элюент	Раствор А – ортофосфорная кислота, 10%; Раствор В – ацетон + ортофосфорная кислота, (1:1)
Программа градиента:	Старт - 5 % раствор А, 95 % раствор В; 10 min - 15 % раствор А, 85 % раствор В; 45 min - 40 % раствор А, 60 % раствор В; 55 min - 92 % раствор А, 2 % раствор В Финиш - 5 % раствор А, 95 % раствор В
Скорость подачи элюента, ml/min	0,75
Продолжительность анализа, min	60

Наблюдалось плохое разделение пика ресвератрола в его стандартном растворе. Применяв в качестве элюента смесь метанола и бидистиллированной воды и осуществив хроматографирование при следующих условиях:

Объем инжестируемой пробы, μl	10
Длина волны, nm	305
Элюент	Раствор А - метанол ; Раствор В – бидистиллированная вода
Программа градиента:	Старт -35 % раствор А, 65 % раствор В; 8,0 min - 35 % раствор А, 65 % раствор В; 20 min - 60 % раствор А, 40 % раствор В; 25 min - 95 % раствор А, 5 % раствор В ; 35 min - 95 % раствор А, 5 % раствор В; Финиш - 35 % раствор А, 65 %
Скорость подачи элюента, ml/min	0,75
Продолжительность анализа, min	38

Мы получили хорошее разделение пика ресвератрола. На рис. 1 изображена хроматограмма стандартного раствора ресвератрола в данном режиме. Для дальнейших исследований мы использовали данный режим.

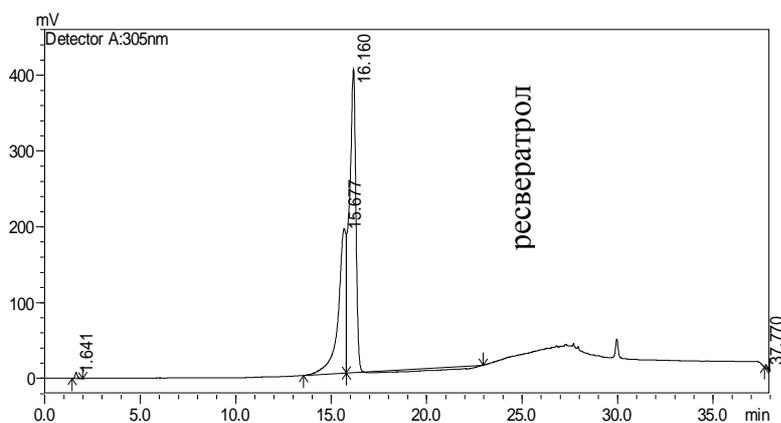


Рис. 1 Хроматограмма стандартного раствора ресвератрола (16,1 мин).

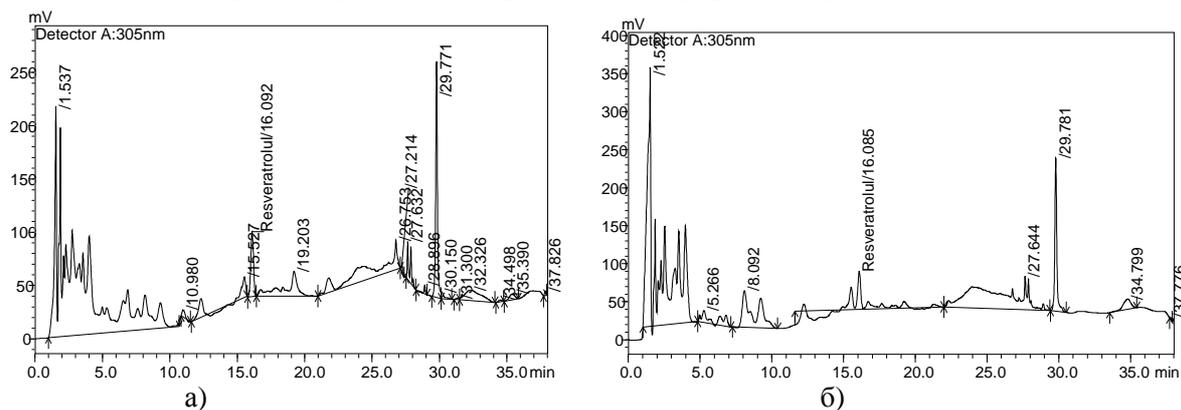


Рис. 2 Хроматограмма разделения ресвератрола в красных винах из сортов винограда:
а) Фетяскэ Нягрэ, б) Кодринский

Разделение стандартного раствора кверцетина и рутина осуществляли элюентами и в режиме хроматографирования, аналогичном предыдущей методике, однако изменили длину волны на 363 nm. В результате удалось получить хорошее разделение пиков и достаточно высокую чувствительность для данной стандартной смеси (рис.3). Проведение анализа в этом режиме позволяет за один прием получить хорошее разделение пиков исследуемых веществ.

Таким образом, установленные режимы проведения анализа методом HPLC позволяют дифференцированно определить концентрацию кверцетина и рутина в красных винах. На рис. 4 представлена хроматограмма разделения рутина и кверцетина в красных винах из сортов винограда Фетяскэ Нягрэ и Кодринский.

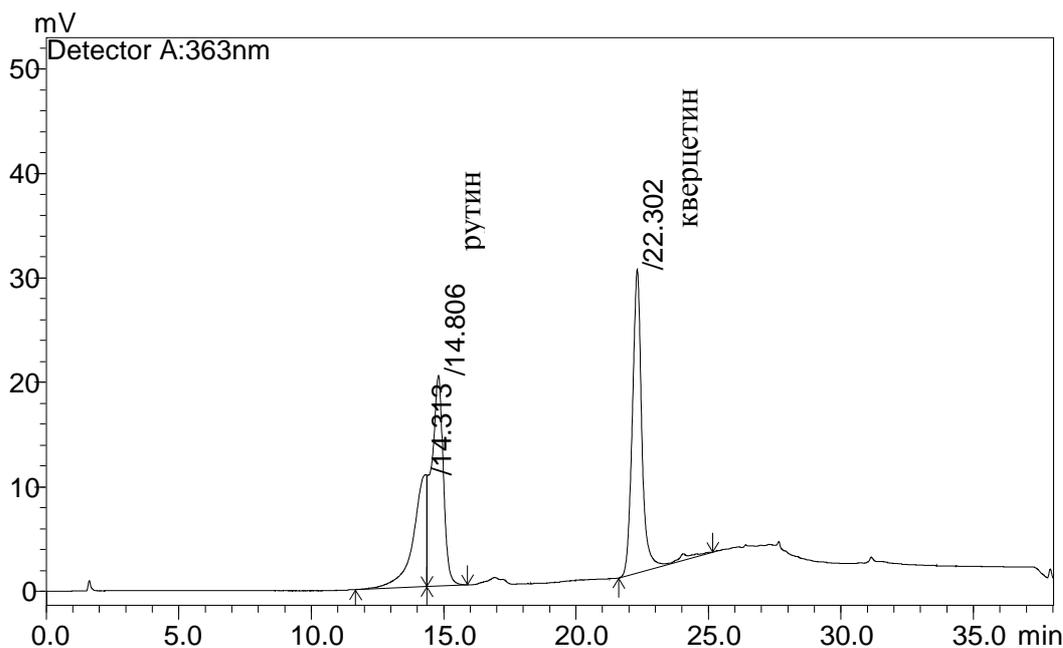


Рис. 3 Хроматограмма стандартного раствора рутина (14,8 мин) и кверцетина (22,3 мин)

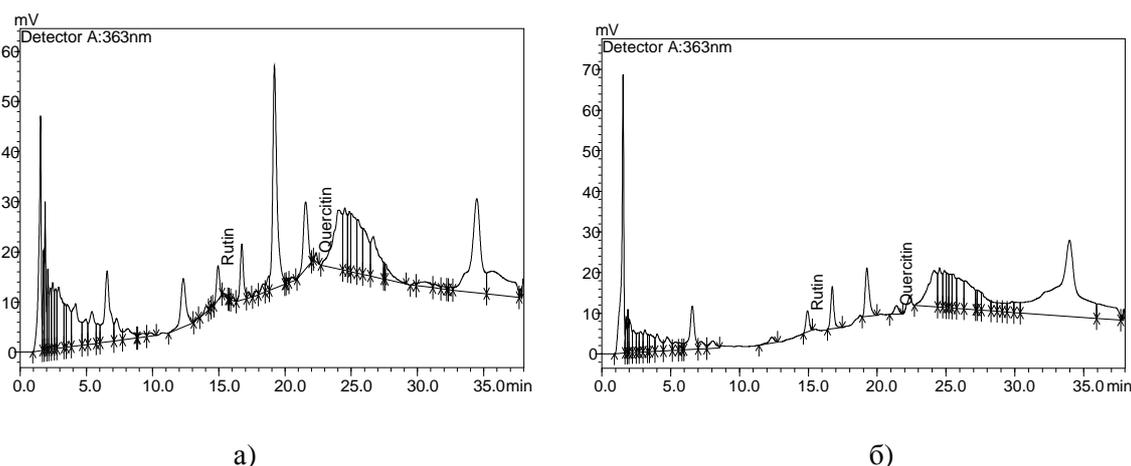


Рис.4 Хроматограмма разделения ресвератрола в красных винах из сортов винограда:
а) Фетяскэ Нягрэ, б) Кодринский

Заключение

Применение высоко-эффективной жидкостной хроматографии (HPLC) позволяет дифференцированно определить содержание основных мономерных полифенолов, в первую очередь, ресвератрола, кверцетина и рутина в красных сухих виноградных винах. Разработанные нами

режимы разделения могут быть успешно использованы для изучения фенольных соединений в винах при проведении научных исследований.

Литература

1. Abert Vian M., Toma V., Jallet S., Coulomb P., O./ Lacombe Simple and rapid method for cis-and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns, //G.U.G.Chromatogr A 2005,1085 , №2, p. 224-229
2. Castellari Massimo, Karakaidos Themistocles, Arfelli Jieseppe, Amati Aureliano, Torsi Giancarlo/ Tecnica HPLC –DAD per separazione e identificazione delle sostanze fenoliche nei vini // Ind. Bev., 1998-27, №154, p. 142-148
3. De Santi C., Pictrabissa A., Spisani R., Mosca F., Pacifici J.M./ Sulphation of resveratrol a natural product present in grapes and wine in the human liver and duodenum// Xenobiotica, 2000, 30., №6, p. 609-617
4. Кохташвили М.Г., Бежуашвили М.Г.Идентификация транс-ресвератрола в некоторых красных сортах винограда.// JEN: Jeorg. End. News, 1998, №4, с. 104-106
5. Shu Joun, Chen Min, He Giguao, Dai Gunqing, Sepu=Chin. G. Определение содержания ресвератролов и мецеидов в винах высокоэффективной жидкостной хроматографией с применением твердофазной экстракции.// Chromatogr., 2005,23, №1, с- 88-91
6. Abrie M., Negueruela Perez C., Guant T., Estopanan G./ Preliminary stude of resveratrol content in Aragan red and rose wines Food Chem. , 2005, 92, №4, с. 729-736
7. Pibeiro de Lima Maria T., Waffo-Teguo Pierre Tiessedre Pierre L.Pijolas, Determination of stilbenes (trans-astrigin, cis-and trans- piceid and cis-and trans-resveratrol) in portuguese wines // G.Agr. and Food Chem. -1999,47, №7, с. 2666-2670
8. Nikfardjam Martin S., Pour., Mark laszlo, Avar Peter, Figler Maria Poliphenols, anthocyanis and trans-resveratrol in red wines from the Hingarian Valzany region. // Food Chem.. 2006,98, №3, с. 453-462
9. Angeli C., Lodi M., Compagnoni F., Simonini S./ Determinazione del contenuto de resveratrole in uve, semilavorati e vini della varieta Lambrusco // Ind. Bev.- 1998,27, №115, с. 268-278
10. Б.Гаина, О.Роман, М.Бурзекс, Р.Ружон Ресвератролы суслу и вина: динамика их накопления и содержания// ж. Виноградарство и виноделие в Молдове, №3, 2007, стр.24-25
11. Лапин А.А., Герасимов М.К., Зеленков Н.Н./ Определение суммарной концентрации антиоксидантов в красных французских винах и их российских аналогах // . Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты.: Сб. научных трудов. Вып. 15 Рос. Акад. естественных наук., 2007, с. 61-71, 196

Skorbanova E., Taran N., Cherney M., Tampey O., Rynda P., Degtiar N.

The methods of determination polyphenols red grape wine , based on using high-performance liquid chromatography

Red grape wine is important source of polyphenols with antioxidant activity, their identification presents scientific and practical interest.

The methods of determination of resveratrol, rutin and quercetin in red wines, based on using high-performance liquid chromatography (HPLC), have been carried out.