



УДК 544

Высокоэффективная жидкостная хроматография в исследовании антиоксидантных свойств вин

Ульянова Е.В., Ларионов О.Г., Ревина А.А.

Учреждение Российской академии наук, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Андриевская Д.В.

ГУ ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности Россельхозакадемии, Москва

Поступила в редакцию 12.01.2010 г.

Аннотация

С применением ВЭЖХ проведено сравнение антиоксидантной активности и радиопротекторных свойств вин различной сортовой и региональной принадлежности. Показано, что при практически близком общем содержании фенольных соединений в винах одного наименования, но разных производителей, их антиоксидантные активности сильно различаются. Вина с высоким значением антиоксидантной активности отличались большим содержанием кверцетина, катехина и кофейной кислоты – соединений, которые относятся к группе сильных антиоксидантов. Установлено также, что при радиоллизе происходят интенсивные процессы, сопровождающиеся значительным увеличением содержания фенольных соединений.

Ключевые слова: ВЭЖХ, антиоксидантная активность, фенольные соединения, радиоллиз

There was carried out the comparison of antioxidant activities and radioprotective properties of different varieties and geographical origin wines with HPLC application. It was shown that antioxidant activities of wines with practically close general phenolic content but of different producers are greatly differ. The wines with high value antioxidant activity characterized by large quantity of quercetin, catechin and caffeic acid – compounds which belong to the group of strong antioxidants. It was also established that intensive processes accompanied with considerable increase of phenolic compounds came about during the radiolysis.

Key words: HPLC, antioxidant activity, phenolic compounds, radiolysis

Введение

Вино является богатейшим источником природных биологически активных веществ – фенольных соединений, обладающих антиоксидантным действием и по своей активности превосходящих витамины С, Е и β -каротин. Известно, что фенольные соединения (вина) способны тормозить процессы перекисного окисления липидов клеточных мембран и тем самым препятствуют повреждающему действию свободных радикалов, замедляют преждевременное старение клеток в живых организмах [1]. Установлено, что биологическая активность вин обусловлена

сложным составом фенольных соединений, их структурой и влиянием различных факторов. Известно, что состав и активность фенольных соединений в винах определяется как способом приготовления, так и временем выдержки и условиями хранения готовой продукции [2].

Особый интерес представляет сравнение биологической активности вин, связанной с их потенциальной способностью регулировать окислительно-восстановительные процессы и противостоять окислительному стрессу в живых системах, вызванному воздействием ионизирующего излучения, УФ-, СВЧ-облучения, присутствием тяжелых и радиоактивных элементов и др. факторов.

С этой целью проведено сравнение антиоксидантных активностей (АОА) и радиопротекторных свойств вин различной сортовой и региональной принадлежности и разных сроков хранения.

Эксперимент

В качестве объектов (исследования) использовали образцы красных (Каберне-Совиньон, Мерло) и белых (Совиньон Блан, Шардоне) столовых сухих вин урожая 2005 г. и 2006 г. из разных винодельческих регионов, широко представленных на отечественном рынке (Табл.1). Исследования проводили с образцами вин первого года хранения ($1 \pm 0,5$ лет) и после выдержки образцов этой же партии вин в течение $3 \pm 0,5$ лет при 16°C .

Массовую концентрацию фенольных веществ определяли колориметрическим методом с применением реактива Фолина-Чокальтеу [3].

Количественное определение индивидуальных фенольных соединений проводили методом ОФ-ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Agilent 1100 Series» с диодно-матричным детектором, предколонкой Hypersil ODS C18 (5 мкм, 20x2,1 мм) и колонкой Hypersil ODS C18 (3 мкм, 100x2,1 мм). Систему кондиционировали 30 минут. Элюенты: А – вода (pH=3, H_3PO_4), В – ацетонитрил (pH=3, H_3PO_4). Условия градиентного элюирования: 0-5 мин. – 3% В, 5-22 мин. – 3-100% В, 22-25 мин. – 100% В, 25-28 мин. – 100-3% В, 28-32 мин. – 3% В. Расход элюента – 300 мкл/мин. Объём вводимой пробы 5 мкл. Детектирование фенольных соединений проводили при 230, 254, 280, 330 и 500 нм, спектр сканировали в диапазоне 200 – 700 нм [4]. Идентификацию фенольных соединений в образцах вин проводили сравнением времён удерживания и спектров оптического поглощения соответствующих стандартов с аналогичными данными для соединений, входящих в состав вин. Для расчета их содержаний использовали метод внешнего стандарта. Пробоподготовку образцов не проводили, так как данная процедура привела бы к изменению состава анализируемых вин. Правильность выбранной методики подтверждена методом "введено - найдено", поэтому влияние других компонентов на измеряемые характеристики исключена.

Для приготовления элюентов и растворов анализируемых соединений использовали: ацетонитрил (0 сорт, НПК "Криохром", Россия); ортофосфорную кислоту (хч); тридистиллированную воду, дополнительно очищенную на фильтрах Millipore, (Milli-P QG, Waters); этанол (96% extra pure, Merck, Германия).

Антиоксидантную активность образцов вин определяли электрохимическим методом, используя анализатор «ЦветЯуза-01-АА» с амперометрическим детектором. За единицу АОА принималась окислительная активность, проявляемая раствором кверцетина с концентрацией 1мг/дм^3 [5].

Для определения способности вин противостоять окислительному стрессу использовали метод радиационно-химического моделирования окислительно-восстановительных реакций с участием свободных радикалов и активных форм кислорода, генерированных при воздействии ионизирующего излучения со средой и взаимодействующих с молекулами фенольных соединений.[6-7]. Для этого образцы вина в количестве 3 см³ подвергали γ -облучению на установке ⁶⁰Co РХМ- γ -20 в присутствии кислорода воздуха при комнатной температуре в течение 3 ч., доза облучения, в соответствии с ферросульфатной дозиметрией, составляла 2,5 кГр. Продукты радиолиза, образующиеся при взаимодействии ионизирующего излучения с фенольными соединениями вина, регистрировали в пострадиационный период спектрофотометрическим и хроматографическим методами.

Результаты и их обсуждение

Поскольку одним из важных показателей качества вин является содержание фенольных соединений (ФС), то на первом этапе исследований необходимо было определить общее содержание ФС в винах и их потенциальную способность к окислению (АОА).

Таблица 1. Общее содержание фенольных веществ и антиоксидантная активность вин

№ п/п	Наименование образца	Массовая концентрация фенольных веществ, мг/дм ³	Антиоксидантная активность, мг/дм ³
Вина столовые сухие красные			
1	Каберне Совиньон, Франция, Vin de Rays d'Ос, 2005 г.	2 456	135,1
2	Каберне Совиньон, Чили, Центральная долина, 2005 г.	1 888	593,0
3	Каберне Совиньон, Чили, Долина Мауле, 2006 г.	2 165	802,2
4	Мерло, Франция, Vin de Rays d'Ос, 2005 г.	1 821	111,1
5	Мерло, Чили, Центральная долина, 2005 г.	1 905	757,9
6	Мерло, Чили, Долина Мауле, 2006 г.	2 023	517,7
Вина столовые сухие белые			
7	Совиньон Блан, Франция, Vin de Pays des Côtés de Gascogne 2005 г.	287	72,1
8	Совиньон Блан, Чили, Молина, 2005 г.	207	162,6
9	Совиньон Блан, Чили, долина Мауле, 2006 г.	192	153,5
10	Шардоне, Франция, Vin de Pays d'Ос, 2005 г.	331	87,9
11	Шардоне, Чили, Центральная долина, 2005 г.	289	282,1
12	Шардоне, Чили, долина Мауле, 2006 г.	210	137,6

Далее по тексту номер образца вина соответствует порядковому номеру в табл. 1

В табл.1 представлены результаты измерения массовой общей концентрации фенольных веществ колориметрическим методом с применением реактива Фолина-Чокальтеу. Как видно из таблицы, по содержанию фенольных соединений, как красные, так и белые вина одного наименования, но произведенные в разных регионах, незначительно отличались между собой (табл. 1). Однако содержание ФС в красных винах в среднем в 8 раз больше, чем в белых.

Следует обратить внимание, что при практически близком содержании ФС в образцах вин одного наименования АОА их различна. Так, в красных винах Чили АОА в 5 раз, а в белых - в 2 раза выше, чем в исследованных образцах аналогичных марок Французских вин.

Анализ спектров оптического поглощения красных вин позволил выделить четыре области поглощения, характерные для фенольных веществ: в УФ-области при $\lambda=200-230$ нм (танины), $\lambda=240-290$ нм (лейкоантоцианы, флавононы, танины) $\lambda=256-370$ нм (оксикоричные и оксibenзойные кислоты), и в видимой области поглощения при $\lambda=420-580$ нм (антоцианы). Для белых вин характерны полосы поглощения первых трех областей. [8]

В табл. 2 приведено содержание индивидуальных фенольных соединений вин, идентифицированных с помощью ОФ-ВЭЖХ. Для сравнения были выбраны образцы вин Каберне-Совиньон №№1,3, Мерло №№4,5 и Шардоне №№ 10,11 - с максимальными и минимальными значениями АОА. Как видно из таблицы, из двух вин одного наименования вино с более высоким значением АОА отличалось большим содержанием кверцетина, катехина и кофейной кислоты – соединений, которые относятся к группе сильных антиоксидантов.

Поскольку механизмы проявления АОА различных систем многообразны, и каждый из них может различаться влиянием на свободно-радикальные процессы, для дополнительной оценки АОА вин, т.е. способности вин противостоять окислительному стрессу, был использован метод стационарного радиоллиза.

Таблица 2. Содержание индивидуальных фенольных соединений в красных и белых винах

Наименование образца	Антиоксидантная активность, АОА мг/дм ³	Содержание идентифицированного вещества, мг/дм ³		
		кверцетин	(+)-катехин	кофейная к-та
Каберне Совиньон, № 1 Франция, 2005 г.	135,1	24,6	49,6	-
Каберне Совиньон, № 3 Чили, 2006 г.	802,2	26,0	89,7	-
Мерло, № 4 Франция, 2005 г.	111,1	38,3	-	-
Мерло, № 5 Чили, 2005 г.	757,9	50,7	-	-
Шардоне, № 10 Франция, 2005 г.	87,9	-	4,0	8,0
Шардоне, № 11 Чили, 2005 г.	282,1	-	6,5	9,6

Условные обозначения: « - » – ниже предела обнаружения

Для этого образцы №№ 1,3 и №№ 10,11 были подвергнуты γ -облучению. Так как при взаимодействии фенольных соединений с образовавшимися при радиоллизе активными формами кислорода (АФК) возможно уменьшение концентраций

исходных веществ и возникновение новых оптически активных соединений, был проведён хроматографический анализ образцов вин после облучения.

Характер изменений в данных образцах под действием γ -облучения был различен. Так в образце Каберне-Совиньон № 1 произошло уменьшение содержания идентифицированных веществ; в Каберне-Совиньон № 3 установлено исчезновение кверцетина при заметном увеличении содержания (+)-катехина (на 11 %) и галловой кислоты (в 4,6 раза). Это позволяет предположить, что в данных образцах характер процессов, протекающих при воздействии γ -облучения, различен. Для образца Шардоне № 10 установлено исчезновение кофейной кислоты и увеличение концентрации (+)-катехина (на 30%); тогда как в Шардоне № 11 произошло увеличение содержания кофейной кислоты (в 1,9 раза) и падение концентрации (+)-катехина (на 26%).

Из-за отсутствия стандартов провести идентификацию других соединений не удалось. Количественное соотношение отдельных групп соединений на хроматограмме оценивали по суммам площадей пиков, определенных при 230, 254, 280, 334 и 500 нм и выраженных в относительных единицах. Из рис. 1-4 видно, что после облучения двух белых вин и двух красных при всех длинах волн произошло увеличение сумм площадей пиков. Таким образом, все исследуемые группы соединений, танины, флавононы и антоцианы (в красных винах), оксикоричные и оксibenзойные кислоты, оказались радиационнолабильными. При этом как в облучённых, так и в необлучённых образцах преобладали танины.

Сумма площадей пиков фенольного состава вин (детекция при $\lambda=330$ нм) увеличилась в 1,8-2,5 раза. Это объясняется тем, что фенольные соединения в молодых винах находятся в неустойчивой конформационной форме и под действием ионизирующего излучения, вызывающего окислительную деструкцию, переходят в другие, более активные формы – семихиноны, которые могут либо конденсироваться в высокомолекулярные соединения с другой АОА, либо регенерировать и переходить в исходные соединения [6, 7].

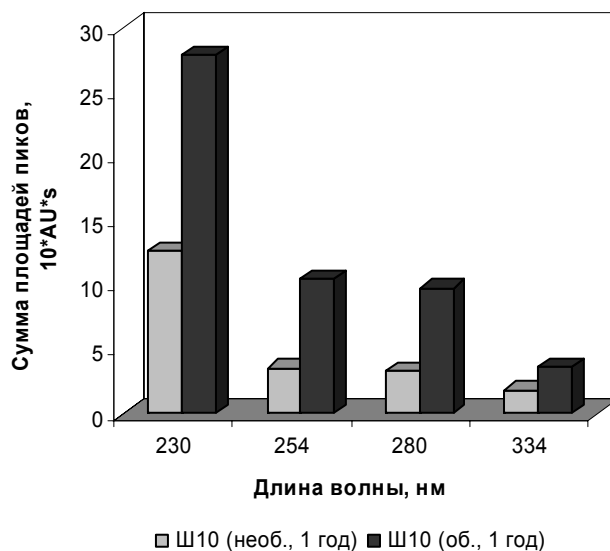


Рис. 1. Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) белого вина Шардоне №10 (первый год хранения) при разных длинах волн

Таким образом, полученные результаты показывают, что в молодых винах, независимо от показателей АОА, при радиоллизе происходят интенсивные процессы,

сопровождаясь значительным увеличением ФС. Известно, что в процессе хранения вин происходят различные реакции окислительной конденсации и полимеризации ФС, что приводит к изменению биохимического состава вин. В связи с этим представляло интерес изучить изменение содержания индивидуальных ФС в винах после $3 \pm 0,5$ - летнего хранения.

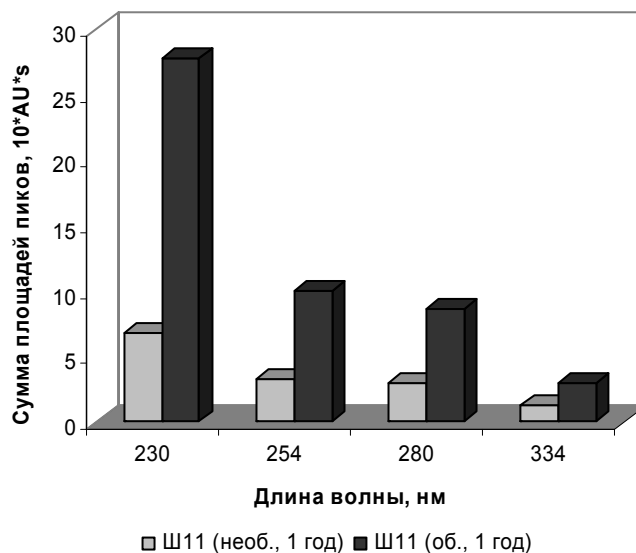


Рис. 2 Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) белого вина Шардоне №11 (первый год хранения) при разных длинах волн

Так при анализе образца Каберне-Совиньон № 1 третьего года хранения наблюдалось снижение содержания идентифицированных ФС, особенно (+)-катехина (на 50%). В образце Каберне-Совиньон № 3 произошли более интенсивные изменения: кверцетин не идентифицирован, содержание (+)-катехина уменьшилось на 76 %; одновременно с этим зафиксировано увеличение в 2,0 раза галловой кислоты.

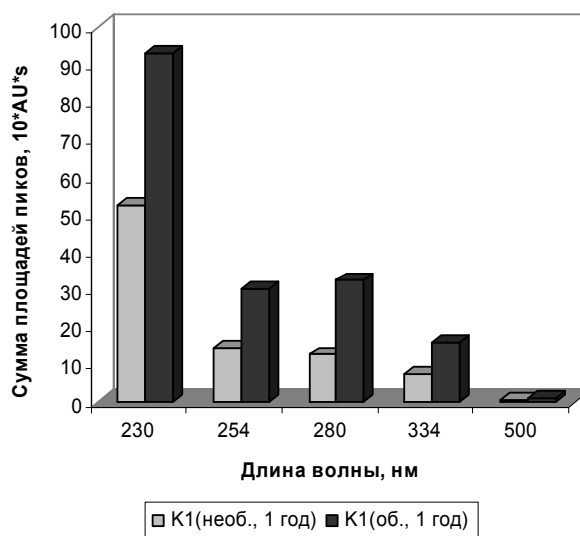


Рис. 3. Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) красного вина Каберне Совиньон № 1 (первый год хранения) при разных длинах волн

Образцы вин Каберне-Совиньон №№ 1,3 и Шардоне №№ 10,11 подвергали γ -облучению в таких же условиях опыта, что и молодые вина, после чего проводили спектрофотометрический и хроматографический анализы образцов. При радиоллизе в обоих исследованных белых винах было зафиксировано уменьшение кофейной кислоты и небольшое увеличение (+)-катехина, причем для образца Шардоне № 11 интенсивность изменений была несколько больше.

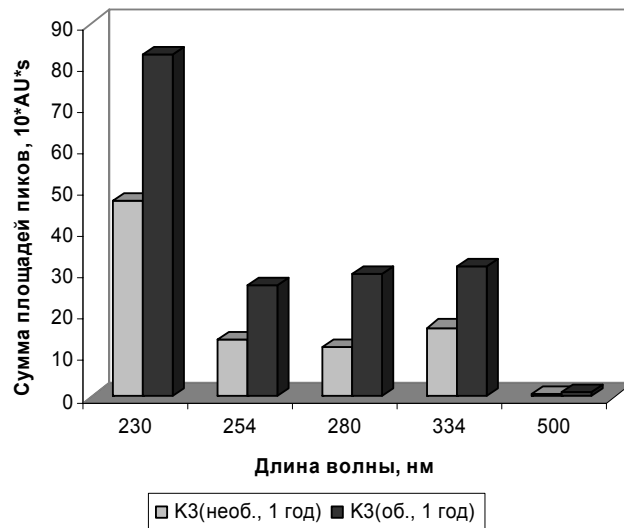


Рис. 4. Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) красного вина Каберне Совиньон № 3 при разных длинах волн

Из хроматограммы на рис. 5 видно, что в образце белого вина Шардоне № 10 после облучения значительно снизилось содержание веществ с временами удерживания 13,12 и 18,71 мин., определённых при длине волны 280 нм. В образце Шардоне № 11 таких изменений не наблюдалось. В образце Каберне-Совиньон №1 возросло содержание компонента с временем удерживания 18,72, а также появились продукты радиоллиза с временами удерживания 20,93 и 22,17 (рис. 6).

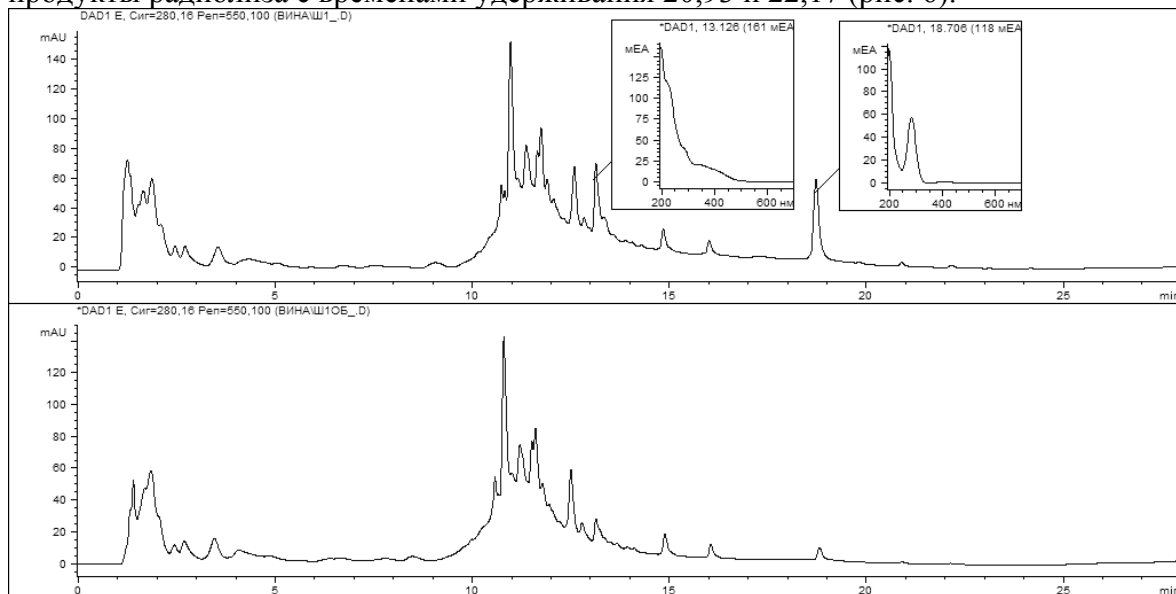


Рис. 5. Хроматограммы образца белого вина Шардоне № 10 до (вверху) и после (внизу) облучения при 280 нм. Спектры приведены для компонентов, содержание которых резко уменьшилось после облучения

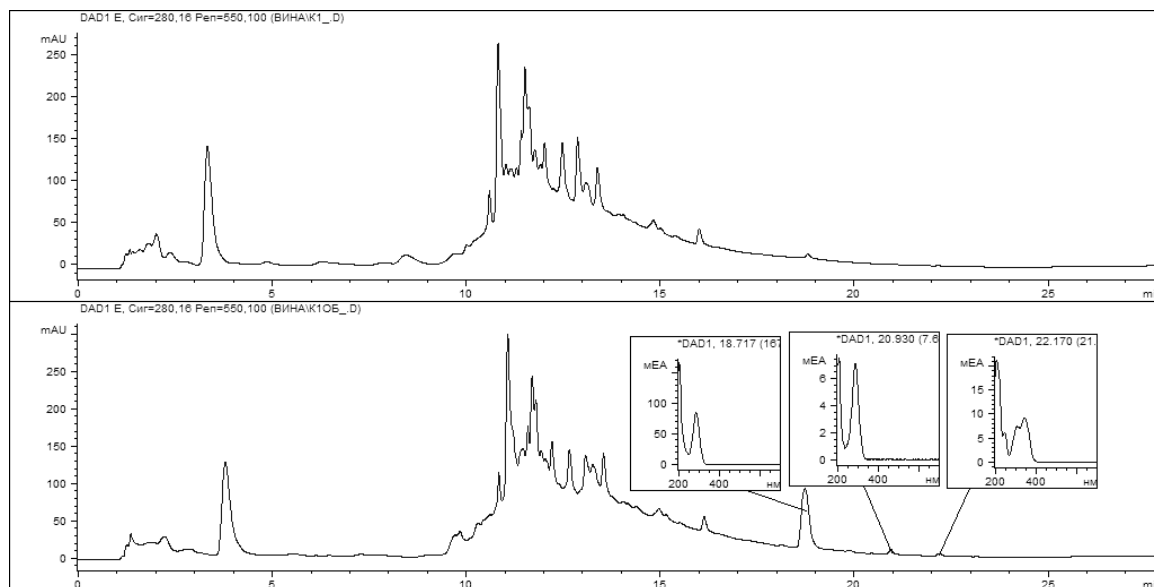


Рис. 6. Хроматограммы образца красного вина Каберне-Совиньон №1 до (вверху) и после (внизу) облучения при 280 нм. Спектры приведены для продуктов радиолиза

В вине Каберне Совиньон № 3 никаких изменений состава после облучения не обнаружено. Суммы площадей пиков на хроматограммах для разных образцов вин представлены на рис. 7-10. Судя по результатам, за время хранения содержание танинов в образцах №№ 1,3 по сравнению с первым годом хранения снизилось на 18 и 9 %, соответственно, а содержание оксикоричных и оксибензойных кислот на 33 и 75 %. После воздействия радиолиза в этих винах произошло незначительное изменение содержания ФС. Это свидетельствует о том, что конформационные формы ФС красных вин первого года выдержки, как более чувствительные, переходят за время выдержки в стабильные формы.

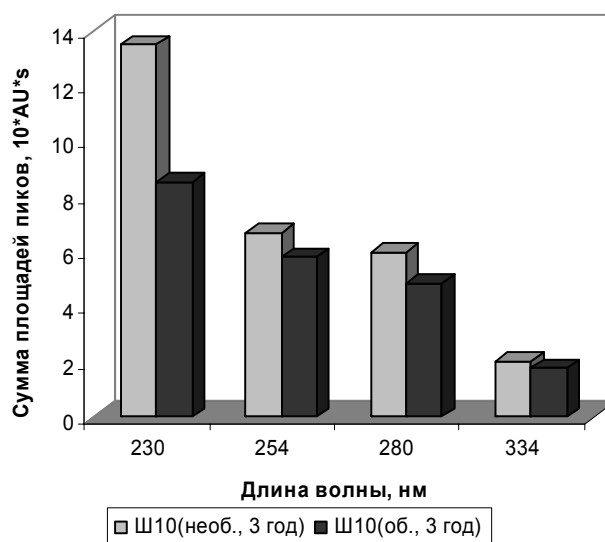


Рис. 7. Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) белого вина Шардоне №10 (третий год хранения) при разных длинах волн

В белых винах при хранении повысилось содержание фенольных соединений всех групп: танинов – на 10-30 %, флавоноидов – на 60-90 %, оксикоричных и оксибензойных кислот – на 60-80 %. После радиолиза в образце вина Шардоне № 10 произошли более значительные, чем в Шардоне № 11, изменения концентраций фенольных соединений, поглощающих при 254 и 280 нм. В первом из них содержание флавоноидов снизилось на 10 %, а оксикоричных и оксибензойных на 20 %, тогда как во втором на 1 и 6 % соответственно.

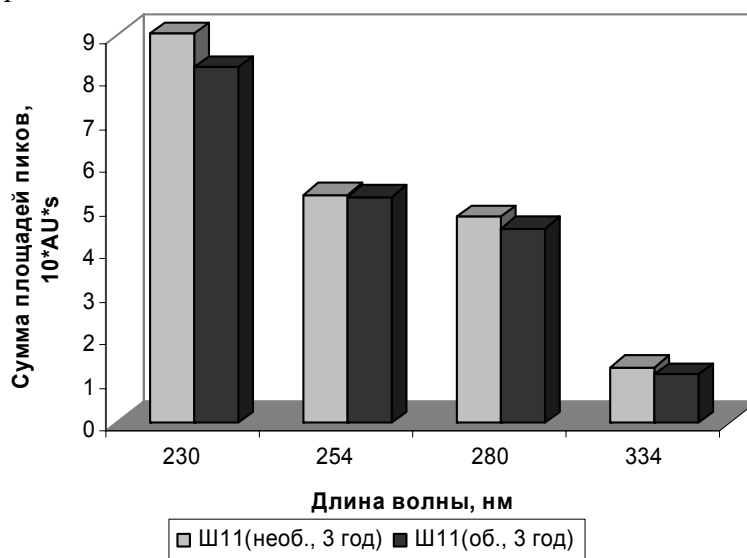


Рис. 8. Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) белого вина Шардоне №11 (третий год хранения) при разных длинах волн

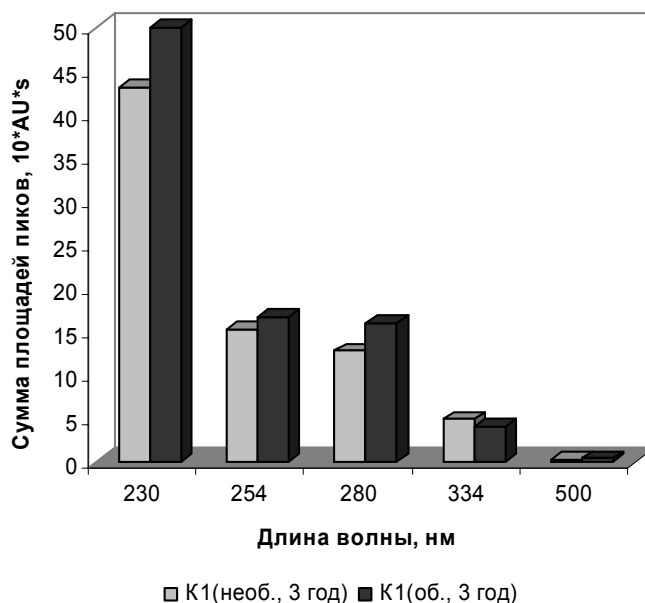


Рис. 9. Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) красного вина Каберне Совиньон № 1 (третий год хранения) при разных длинах волн

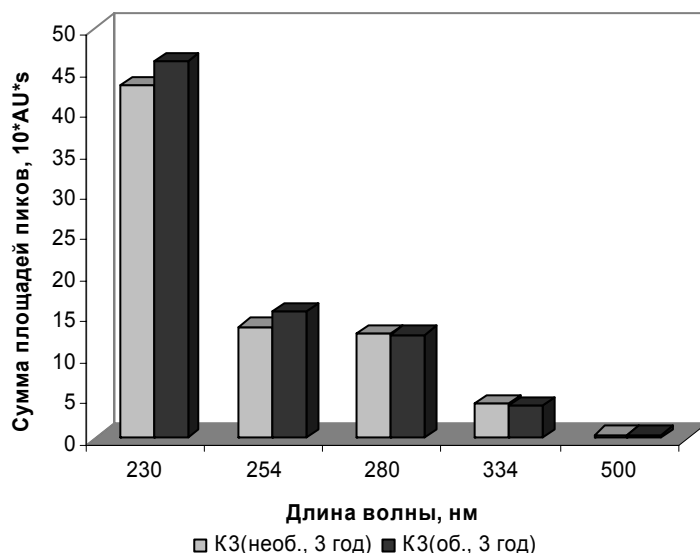


Рис. 10. Суммы площадей пиков на хроматограммах необлучённого (■) и облученного (■) красного вина Каберне Совиньон № 3 (третий год хранения) при разных длинах волн

Заключение

Установлено, что при практически близком содержании ФС в образцах вин одного наименования АОА их различна. Вина с высоким значением АОА отличались большим содержанием кверцетина, катехина и кофейной кислоты – соединений, которые относятся к группе сильных антиоксидантов. В молодых винах, независимо от показателей АОА, при радиоллизе происходят интенсивные процессы, сопровождающиеся значительным увеличением ФС. За время хранения содержание танинов в красных винах снизилось на 10-20 %, а содержание оксикоричных и оксибензойных кислот на 30-70 %. В белых винах повысилось содержание фенольных соединений всех групп. После воздействия радиолиза на вина третьего года наиболее значительные изменения состава произошли в вине Шардоне № 10, в котором содержание флавоноидов снизилось на 10 %, а оксикоричных и оксибензойных кислот на 20 %.

Список литературы

1. Эмануэль Н.М. Биофизические аспекты действия физических и химических факторов на живые организмы. Защитные свойства антиоксидантов // Биофизика. 1984. Т. 29. №4. С. 706-719
2. Pellegrini N., Simonetti P., Garana C. et al. Polyphenol content and total antioxidant activity of Vini Novelli (Young Red Wines) // Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, v. 48. – p.p. 732-735
3. Методы теххимического контроля в виноделии. Под ред. Гержиковой В.Г. – Симферополь: Таврида, 2002 г. – 260 с.

4 Кочетова М.В. Хроматографическое и спектроскопическое исследование флавоноидов хмеля.//Сборник статей «Некоторые проблемы физической химии»/ Под ред. Чалых А.Е./ М.: ИФХ РАН. – 2001. – с. 40-44

5. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Черноусова Н.И. Антиоксиданты в красном вине и их определение амперометрическим методом// Виноделие и виноградарство. – 2007, № 6. – с.22-23

6. Revina A.A. Radiation-chemical Contribution to the Study of Polyfunctional Activity of Natural Pigments. // The III-d Int. Symposium on Natural Colourants. Princeton. USA. 1998. P. 278-292/

7. Ревина А.А. Радиационно-химическое моделирование быстропротекающих процессов с участием промежуточных кислородсодержащих реакционных центров в различных системах.// Автореф. диссертации, д.х.н. Москва. ИФХ РАН. 1995.

8. Запромётов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях//М.: Наука. 1993. 272 с.

Ульянова Екатерина Владимировна – науч. сотр. ИФХЭ РАН, Учреждение Российской академии наук Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Ларионов Олег Георгиевич – гл. науч. сотр. ИФХЭ РАН, д.х.н., профессор, Учреждение Российской академии наук Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Ревина Александра Анатольевна – вед. науч. сотр. ИФХЭ РАН, д.х.н., профессор, Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Андриевская Дарья Владиславовна – мл. науч. сотр. ГУ ВНИИ ПБ и ВП, Государственное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности РАСХН, Москва

Ulyanova Ekaterena V. – scientific worker of A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, e-mail: k.uljanova@mail.ru

Larionov Oleg G. – The main scientific worker of A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow

Revina Aleksandra A. – The chief scientific worker of A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow

Andryevskaya Darya V. – The junior scientific worker of the All Russian and Development Institute of Brewing, Alcohol-free and Wine-Making Industry of Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow