

CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLS IN SLOVAK RED WINES CV. CABERNET SAUVIGNON

Martin Sák, Ivana Dokupilová, Jana Lakatošová, Ján Šajbidor

Abstract: any studies confirmed that the moderate consumption of wine could perform as prevention against of some inflammatory diseases. Identification of individual polyphenol compounds, determination of total polyphenol contents and antioxidant activities in nine red wine cv. Cabernet Sauvignon was studied. The polyphenol compounds were measured by high performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detector. The highest content of analyzed polyphenols were identified as gallic acid (8,9 – 14,3 mg/L), (+) catechin (8,5 – 30,4 mg/L) and (-) epicatechin (7,4 – 20,2 mg/L). The highest content of total polyphenol (2816 mg GAE/L) was found in sample CS8 from wine region around Nitra. Robust antioxidant activity (25,4 mM TE/L) in sample CS1 from South Slovak wine region was observed.

Keywords: red wine, HPLC, total polyphenol content - Folin–Ciocalteu, antioxidant activity – DPPH

ÚVOD

V poslednej dobe sa čoraz viac ľudí zaujíma o zdravú stravu, ku ktorej bezpochyby patrí veľké množstvo ovocia a zeleniny. Je bohatým zdrojom bioaktívnych látok so zdraviu prospešnými účinkami. Niektoré štúdie poukazujú, že aj mierne pitie červeného vína má na zdravie pozitívny účinok. Je známe, že prírodné polyfenoly znižujú riziko vzniku zápalových, kardiovaskulárnych ochorení a majú pozitívny efekt na prevenciu rakovinových ochorení (**Rimm et al., 1999**).

Medzi najvýznamnejšie skupiny polyfenolov vína patria flavanoly (katechín, epikatechín), flavonoly (kvercetin, myricetin, rutin), antokyány, proantokyandíny, fenolové kyseliny (galová, kávová, para kumarová), stilbény (trans resveratrol) a iné. Viaceré štúdie potvrdili, že červené víno obsahuje pomerne veľa polyfenolov (**Medic-Saric et al., 2009**). Polyfenoly obsiahnuté vo víne pochádzajú hlavne z hroznej šupky, strapiny a zo semien (**Xia et al., 2010**). Polyfenoly majú biologické účinky ktoré súvisia s vychytávaním voľných radikálov, chelátov kovov, ovplyvňujú aktivitu enzýmov ale aj génovú expresiu a bunkovú signalizáciu (**Havsteen B., 1983**).

Oxidačný stres a zápal sa považujú za kľúčové procesy pri patogenéze kardiovaskulárnych ochorení. Ukázalo sa, že polyfenoly pozitívne vplyvajú na homeostázu kardiovaskulárneho systému inhibovaním patologických procesov (**Munoz et al., 2008**). Ďalšia štúdia preukázala účinok kvercetínu na zníženie systolického krvného tlaku (**Egert et al., 2010**).

Z dôvodu veľkej štruktúrálnej rôznorodosti polyfenolov vo víne a v hrozne je ich analytické stanovenie veľmi komplikované. Najvhodnejším analytickým prostriedkom na analýzu polyfenolov vo víne je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) s detektorom diódového poľa (DAD) a s fluorescenčným detektorom (FLD) (**Bravo et al.,**

2006). Celkový obsah polyfenolov je možné stanoviť aj spektrofotometricky použitím Folin–Ciocalteu činidla a antioxidačnú aktivitu pomocou DPPH (**Brand-Williams et al., 1995**).

Cieľom tejto práce bola identifikácia jednotlivých polyfenolov, stanovenie ich celkového obsahu a antioxidačnej aktivity v 9 vzorkách červených vín odrody Cabernet Sauvignon pochádzajúcich z Malokarpatskej, Nitrianskej, Juhoslovenskej a Stredoslovenskej vinohradníckej oblasti. Získané výsledky sa použijú ako doplňujúce údaje do databázy pre vytvorenie vinohradníckych apelácií.

MATERIAL A METÓDY

Vlastnej analýze predchádzala predúprava vzoriek, ktorá pozostávala s okyslenia 0,1M HCl na pH 2. Nasledovala extrakcia etylacetátom, (5 ml okyslenej vzorky sa dva krát extrahovalo 5 + 5 ml etylacetátu po dobu 30 minút v trepačke pri 180 ot/min). Po extrakcii sa nepolárne fázy odobrali, zlúčili a odparili na vákuovej rotačnej odparke. Po odparení sa zvyšky vo vákuovej odparke rozpustili v 4 ml 50% vodného roztoku metanolu. Takto upravená vzorka sa pred samotnou analýzou prefiltrovala cez striekačkový diskový membránový filter.

Celkový obsah polyfenolov v predupravenej vzorke sme stanovili spektrofotometricky podľa metódy Singleton and Rossi (1965). Ako štandard sme použili kyselinu gálovú. Obsah celkových polyfenolov je uvádzaný ako ekvivalent kyseliny gálovej (GAE).

Metóda na stanovenie antioxidačnej aktivity je založená na redukcii voľných radikálov DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). 1 ml DPPH sme rozpustili v metanole (5,9 mg/100 ml) a ten sme zmiešali s 0,5ml nariadenej vzorky červeného vína s 12% vodným roztokom etanolu v pomere 1:20 v/v. Absorbancia sa merala po 30 minútach trepania na trepačke pri 100 ot/min. v tme, pri vlnovej dĺžke 517nm oproti destilovanej vode. Štandardné roztoky pre antioxidačnú aktivitu sme pripravili vždy čerstvé. Výsledky sme vyjadrili v mM Troloxu, použitím kalibračnej krivky závislosti absorbancie od koncentrácie Troloxu.

Jednotlivé polyfenoly sme analyzovali s použitím prístroja HPLC HP1200 Hewlett-Packard Agilent Technologies (USA). 20 μ l prefiltrovanej nariadenej predupravenej vzorky s 50% vodným roztokom metanolu v pomere 1:2 v/v sme analyzovali net alóne Supelcosil LC-18 (250mm x 4,6mm, 5 μ m) pri teplote kolóny 30°C. Chromatografické podmienky separácie sme nastavili podľa metódy Malovaná et al. 2001.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzorky červených vín odrody Cabernet Sauvignon mali označenie CS1 až CS9-. Vzorky CS1, CS2 a CS3 pochádzali z Juhoslovenskej; CS4, CS5 a CS6 z Malokarpatskej; CS7 a CS8 z Nitrianskej a CS9 zo Stredoslovenskej vinohradníckej oblasti.

Chromatografický záznam z analýzy zmesného štandardného roztoku meraný na HPLC/DAD/FLD je znázornený na obrázku 1. Podarilo sa identifikovať 11 polyfenolických zúčenín: kyselinu gálovú (1), kyselinu kaftarovú (2), (+) katechín (3), kyselinu vanilovú (4), kyselinu kávovú (5), (-) epikatechín(6), syringaldehyd (7), kyselinu para-kumarovú (8), kyselinu ferulovú (9), rutín (10) a trans-resveratrol (11).

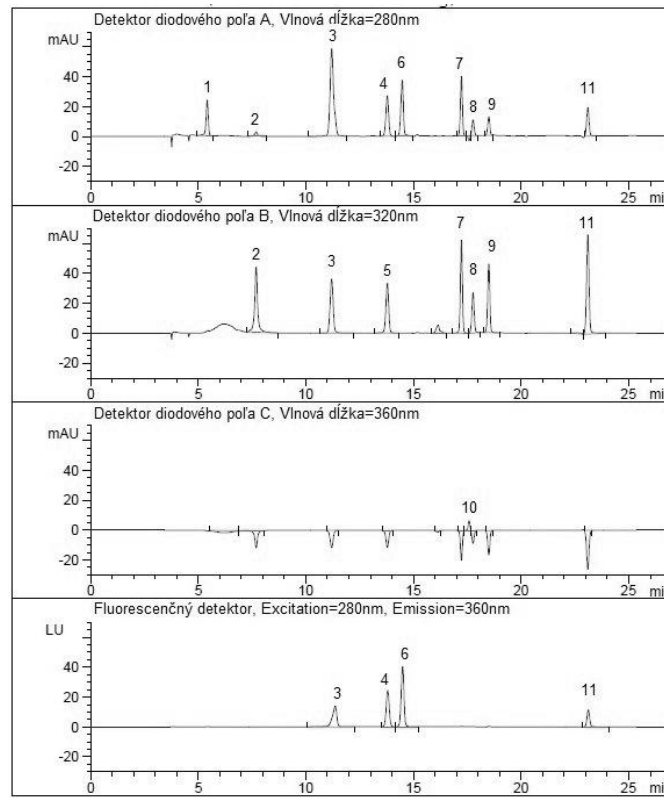
Koncentrácie jednotlivých polyfenolov v analyzovaných vzorkách vín sú graficky znázornené na obrázku 2. Pri porovnaní s výsledkami práce Šeruga et al., 2011 môžeme konštatovať podobnú zhodu v zastúpení kyseliny gálovej (rozsah od 8,9 do 14,3 mg/L); kyseliny kaftarovej (od 1,2 do 17,9 mg/L); (+)epikatechín (od 8,5 do 30,4 mg/L) a (-)epikatechín (od 7,4 do 20,2 mg/L).

Najvyššia koncentrácia kyseliny gálovej (14,3mg/L) bola stanovená vo vzorke CS8 a najvyššia koncentrácia (+) katechínu 30,4 mg/L vo vzorke CS7. Ostatné polyfenoly boli zistené v nasledovných koncentračných rozsahoch: kyselina vanilová (1,7 – 6,2 mg/L),

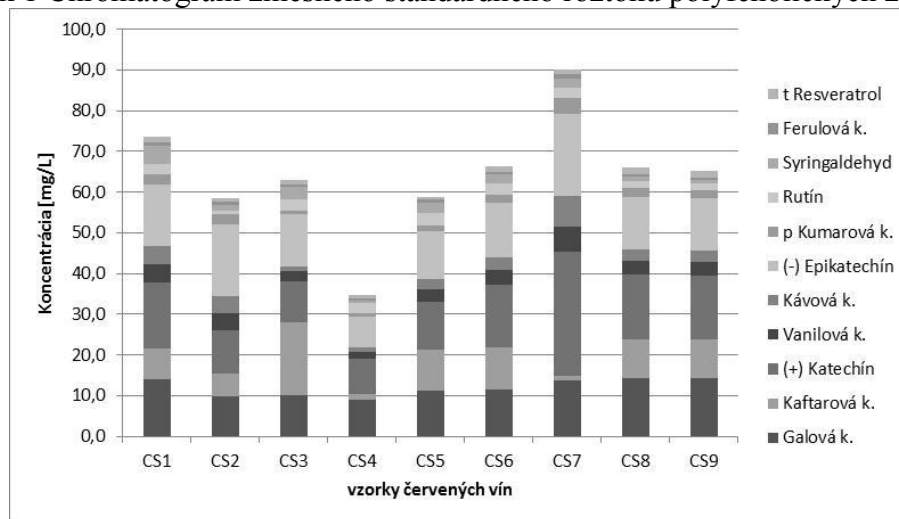
Potravinárstvo

kyselina kávová k. (1,2 – 7,5 mg/L), kyselina para kumarová (0,9 – 3,8 mg/L), rutín (0,7 – 3,0 mg/L), syringaldehyd (0,7 – 4,5 mg/L), kyselina ferulová (0,5 – 1,3 mg/L) a trans resveratrol (0,6 – 1,7 mg/L).

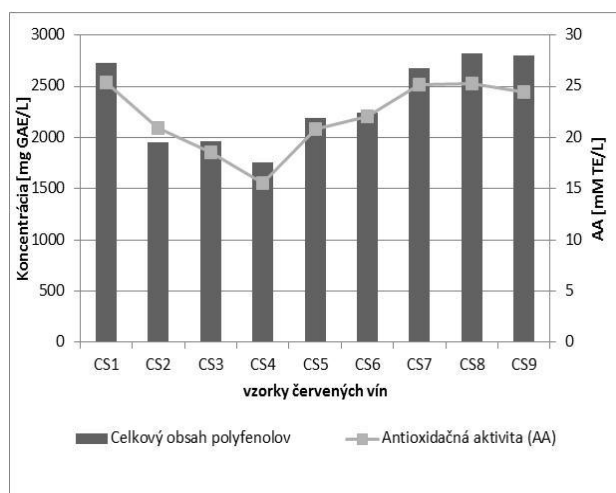
Ako je zrejmé z obrázku 3, najvyššiu antioxidačnú aktivitu mali vzorky s najväčším obsahom celkových polyfenolov (CS8 (2816 mg GAE/L) a CS9 (2800 mg GAE/L). Naše výsledky potvrdili skoršie zistenia (Šeruga et al., 2011).



Obrázok 1 Chromatogram zmesného štandardného roztoku polyfenolických zlúčenín.



Obrázok 2 Grafické porovnanie koncentrácií konkrétnych polyfenolických zlúčenín vo vzorkách vín



Obrázok 3 Grafické znázornenie nameraných celkových obsahov polyfenolov a antioxidačnej aktivity vo vzorkách vín.

ZÁVER

Výsledkom predloženej práce je analytická identifikácia prírodných polyfenolov a kvantifikácia ich antioxidačnej aktivity v 9 vzorkách slovenských červených vín odrody Cabernet Sauvignon. Najvyššie koncentrácie polyfenolov boli stanovené vo vzorke CS7 z Nitrianskej vinohradníckej oblasti. Najmenej polyfenolov a najnižšiu antioxidačnú aktivitu mala vzorka CS4 z Malokarpatskej vinohradníckej oblasti. Je zaujímavé, že vzorky sa príliš nelíšili v obsahu kyseliny gálovej a (-) epikatechínu. Koncentrácie (+) katechínu v analyzovaných vínach sú približne rovnaké, až na vzorku CS7, kde je jeho koncentrácia výrazne vyššia oproti ostatným vzorkám. Vo vzorkách s nízkym obsahom kyseliny kaftarovej sa namerali vyššie koncentrácie kyseliny kávovej a vanilovej. Naproti tomu vo vzorkách s vysokým obsahom kyseliny kaftarovej sme tieto kyseliny dokázali v nižších koncentráciách. Pri porovnaní výsledkov s výsledkami od iných autorov môžeme konštatovať, že slovenské vína v obsahu a prítomnosti zdraviu prospešných látok so zahraničím vôbec nezaostávajú. Výsledky z tejto štúdie budú zahrnuté do databanky Výskumného Ústavu vinohradníckeho a vinárskeho a priebežne budú dopĺňané o ďalšie odrody a vinohradnícke oblasti.

Literatúra

- BRAND-WILLIAMS, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25–30.
- BRAVO, M. N., Silva, S., Coelho, A. V., Vilas Boas, L., Bronze, M. R. 2006. Analysis of phenolic compounds in muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, 563, 84–92.
- EGERT, S., Boesch-Saadatmandi C, Wolfram, S, Rimbach, G, Müller, M. J. 2010. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J. Nutr.* 2010;140:278–84.
- HAVSTEEN B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983;7:1141–8.
- MARIJAN ŠERUGA, Ivana Novak, Lidija Jakobek, 2011. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chemistry* 124 (2011) 1208–1216
- MEDIĆ-SARIĆ M, Rastija V, Bojić M, Males Z. From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutr J* Jul 22, 2009;8:33.
- MUNOZ-Munoz J. L, García-Molina F, Molina-Alarcón M, Tudela J, García-Cánovas F, Rodríguez-López J. N. Kinetic characterization of the enzymatic and chemical oxidation of the catechins in green tea. *J Agric Food Chem* 2008;56:9215–24.

- RIMM, E. B, Williams, P, Fosher, K, Criqui, M, Stampfer, M. J. 1999. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: metaanalysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 1999; 319:1523–8.
- SMALOVANÁ, F. J. Garcia Montelongo, J. P. Pérez, M. A. 2001. Rodriguez-Delgado, Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* 428 (2001) 245–253.
- SINGLETON, V. L., Rossi Jr., J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- XIA E. Q, Deng G. F, Guo Y. J, Li, H. B. 2010 Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* 2010;11:622–46.

Pod'akovanie Táto práca bola spolufinancovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja APVV-0550-11.

Kontaktná adresa:

Ing. Martin Sák Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky v Bratislave, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Oddelenie biochemickej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

Ing. Ivana Dokupilová

-Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky v Bratislave, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Oddelenie biochemickej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

Ing. Jana Lakatošová

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky v Bratislave, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Oddelenie biochemickej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

prof. Ing. Ján Šajbidor, DrSc.

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Oddelenie biochemickej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava