

Małgorzata B. Gawlik, Łukasz Nowak, Marcin Baran

ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI WIN PRODUKCJI POLSKIEJ

Katedra Toksykologii Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. *J. Brandys*

W przedstawionej pracy zamieszczono charakterystykę 9 czerwonych win gronowych wyprodukowanych w winnicach Polski południowej w 2005 r. Oceniono pH, gęstość, zdolność do redukcji Fe (III), całkowitą zawartość polifenoli i zawartość resweratrolu. Zawartość resweratrolu związku biologicznie czynnego o charakterze protekcyjnym w stosunku do układu krążenia, była na średnim poziomie w 2 próbkach badanych win w porównaniu do markowych win pochodzących z krajów o długiej tradycji winiarskiej. Pozostałych 7 próbek zawierało niższe stężenia tego związku. Wartości pozostałych badanych parametrów polskich win zasadniczo były podobne do tych, które podaje piśmiennictwo opisujące wina z innych regionów świata.

Hasła kluczowe: resweratrol, polifenole, ekstrakcja na fazie stałej, HPLC, wino czerwone.

Key words: resveratrol, polyphenols, solid phase extraction, HPLC, red wine.

Wino, produkt otrzymywany w złożonym procesie winifikacji, w swoim składzie zawiera ok. 60–90% wody, 9–18% obj. etylowego alkoholu oraz cukry, barwniki, polifenole, garbniki, składniki mineralne, witaminy, związki azotowe, kwasy organiczne i substancje aromatyczne – związki o charakterze estrów, aldehydów i polifenoli. Tak bardzo złożony skład wina zależy od wielu czynników, między innymi klimatycznych, glebowych, od gatunku winorośli czy sposobu winifikacji. Na walory smakowe istotny wpływ ma między innymi kwasowość wina i gęstość związana z zawartością cukrów.

Rozpoznane jest działanie prozdrowotne niektórych związków występujących w winach (1, 2). Jednym z nich jest resweratrol. To przede wszystkim ten związek odpowiedzialny jest za ochronne działanie na układ sercowo-naczyniowy (3). Prowadzone są także badania nad zastosowaniem resweratrolu w chorobach nowotworowych i neurodegeneracyjnych (4, 5, 6).

Ze względu na skomplikowany skład chemiczny win, który może decydować o sile działania prozdrowotnego, złożone są także procedury analityczne umożliwiające jego ocenę.

Celem pracy jest określenie takich parametrów jak pH, gęstość, siła redukująca, ocena zawartości resweratrolu oraz całkowitej zawartości polifenoli w winach produkcji krajowej z winorośli hodowanych na terenie Polski południowej.

MATERIAŁ I METODY

Ocenę fizyko-chemiczną wykonano dla 9 win pochodzących z 2005 r. z winnic rejonu Polski południowej.

Oznaczanie resweratrolu w winach z zastosowaniem metody HPLC

Oznaczenia wykonano w oparciu o opisywane w piśmiennictwie metody (7, 8). W przedstawionym badaniu, resweratrol wyosobniono z badanych próbek wina z zastosowaniem metody ekstrakcji na fazie stałej (SPE) (9). Na kolumnienki po wcześniejszym kondycjonowaniu sorbentu za pomocą metanolu наносono 5 cm³ badanego wina. Następnie niepożądane składniki usuwano przepuszczając przez kolumnienki wodę destylowaną o pH 8 i 12% (v/v) etanol (etanol/bufor fosforanowy pH = 8). Pozostały na kolumnie resweratrol eluowano 10 cm³ octanu etylu z zastosowaniem podciśnienia. Rozpuszczalnik odparowywano w strumieniu azotu a suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 cm³ acetonitrylu.

Badany związek oznaczano za pomocą metody wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej. Zastosowano kolumnę chromatograficzną C18 (28 cm × 4 mm) i fazę ruchomą o składzie acetonitryl/woda (70:30). Detekcję prowadzono przy szybkości przepływu fazy ruchomej 0,8 cm³/min. i dł. fali 254 nm.

Zawartość związku uzyskanego po elucji z kolumnienki, wykonano w oparciu o krzywą wzorcową dla metanolowych roztworów resweratrolu w zakresie stęż. 2,5 – 10 µg/cm³.

W pracy oceniono także odzysk zastosowanej metody oznaczania resweratrolu. W tym celu całą procedurę postępowania jak w przypadku próby wina wykonano z roztworami wzorcowymi związku. Wysokość pików wzorca otrzymanego na chromatogramie po zastosowanej procedurze, porównano z wysokością pików wzorca czystego. Otrzymane różnice w wynikach dla 5-krotnych powtórzeń wyrażono w procentach.

Oznaczanie całkowitej zdolności do redukcji jonów żelaza(III)

W celu oceny właściwości antyoksydacyjnych badanych win określono ich zdolność do redukcji żelaza(III). Zastosowano metodę kolorymetryczną, w której wykorzystuje się zmianę barwy zredukowanego kompleksu żelaza pod wpływem reduktora. Do badań pobierano 0,1 cm³ wina, które dodawano do 2,5 cm³ buforu fosforanowego o pH 6,6 i 2,5 cm³ roztworu wodnego żelazicyjanku potasu o stęż. 1%. Próbę inkubowano w temp. 50°C przez 20 min. Po ochłodzeniu dodawano 2,5 cm³ kwasu trichlorooctowego (10%) i 0,6 cm³ 0,1% roztworu chlorku żelaza(III). Absorbancję mierzono przy dł. fali 700 nm. Wzrost absorbancji w badanych próbkach w porównaniu do mieszaniny inkubacyjnej nie zawierającej wina, świadczyła o wielkości siły redukującej analizowanego wina.

Oznaczanie całkowitej zawartości polifenoli

W celu oznaczenia zawartości polifenoli w badanych winach wykorzystano zdolność do barwnej reakcji polifenoli z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu*. W meto-

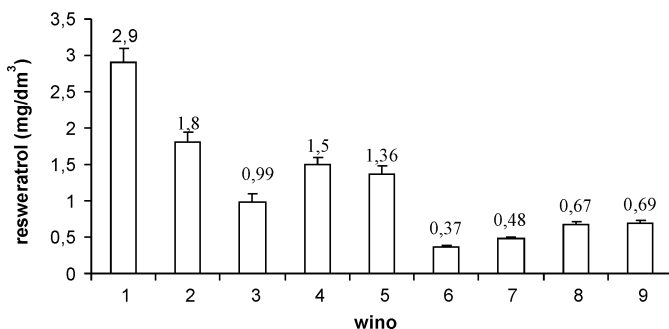
dzie tej intensywność zabarwienia badanych rozcieńczonych wodą próbek wina z dodanym odczynnikiem mierzono przy dł. fali 765 nm. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy, dla którego wykonano krzywą kalibracji w zakresie stęż. 0–50 mg/dm³.

Oznaczanie pH i gęstości

pH badanych win mierzono za pomocą pehametru, a gęstość za pomocą piknometru poj. 25 cm³.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W pracy zastosowano odpowiedni tok analizy który posłużył do oznaczenia ilościowego reseweratrolu, istotnego składnika win. Odzysk dla zastosowanej procedury ekstrakcji na fazie stałej wyniósł $99,3 \pm 5\%$. W badanych winach zawartość resweratrolu przedstwiono na ryc. 1.

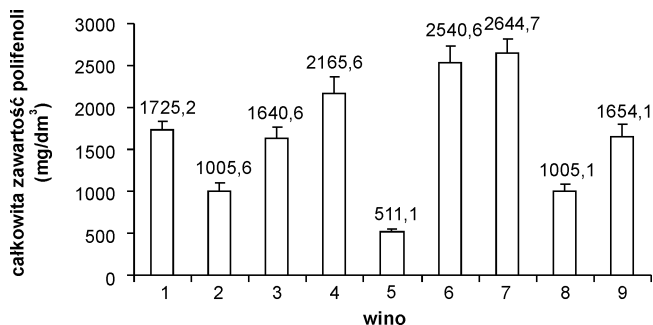


Ryc. 1. Stężenie resweratrolu w badanych winach.

Fig. 1. Concentration of resveratrol in study wines.

Spośród badanych win najwyższy poziom resweratrolu 2,9 mg/dm³ stwierdzono w próbce wina nr 1. Także wysoki poziom resweratrolu stwierdzono w winie nr 2, 4 i 5 (średnio ponad 1,5 mg/dm³). W pozostałych winach stężenie resweratrolu wynosiło poniżej 1 mg/dm³. Oznaczany związek w czerwonych winach gronowych produkowanych w krajach o tradycji winiarskiej (Francja, Włochy, Hiszpania, Węgry), występuje średnio w zakresie stęż. od 0,1 do 10 mg/dm³ (10, 11). Chociaż niektóre wina np. hiszpańskie bądź produkowane w Japonii mogą zawierać stężenia resweratrolu poniżej tej granicy (11, 12). W badanych polskich winach resweratrol nie występował w górnych granicach zakresu stężeń tego związku ale również nie występował w najniższych.

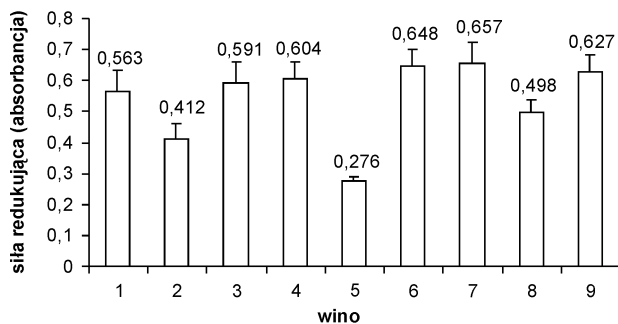
Na ryc. 2. przedstawiono całkowitą zawartość polifenoli występujących w badanych próbkach win. Przyjmując, że czerwone wina gronowe zawierają średnio od 1000 do 4000 mg/dm³ polifenoli (13, 14, 15), to w winie nr 4, 6, 7 zawartość tych związków (średnio 2500 mg/dm³) znajduje się na dobrym średnim poziomie. Pozostałe badane wina zawierają niższą całkowitą zawartość polifenoli, średnio w granicach 1200 mg/dm³. Niską zawartość polifenoli niewiele wyższą niż występującą w winach białych gronowych (ok. 200–300 mg/dm³) stwierdzono w próbce nr 5.



Ryc. 2. Całkowita zawartość polifenoli w badanych winach w przeliczeniu na kwas galusowy.

Fig. 2. Total polyphenol contents in study wines in terms of gallic acid level.

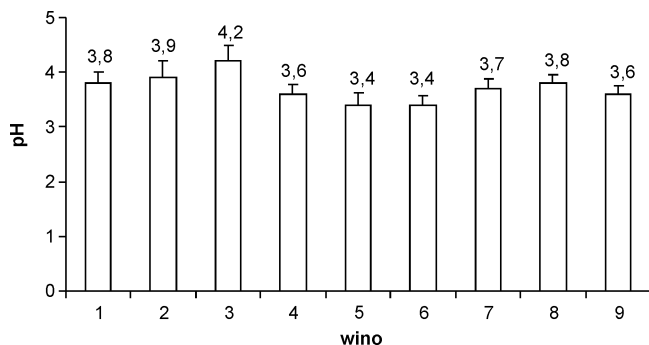
Na ryc. 3. przedstawiono zdolność win do redukcji jonów żelaza (III) która może świadczyć o właściwościach antyoksydacyjnych badanych prób. Obliczono, że siła redukująca win w ok. 81% koreluje z całkowitą zawartością polifenoli. Jednak nie stwierdzono istotnego wpływu zawartości resweratrolu na właściwości redukujące win. Może to świadczyć o tym, że zasadniczo za właściwości antyoksydacyjne win czerwonych tak, jak wynika to również z niektórych badań (16) odpowiedzialne są inne związki z grupy polifenoli.



Ryc. 3. Właściwości antyoksydacyjne win wyrażone jako wartości absorbancji po dodaniu Fe(III).

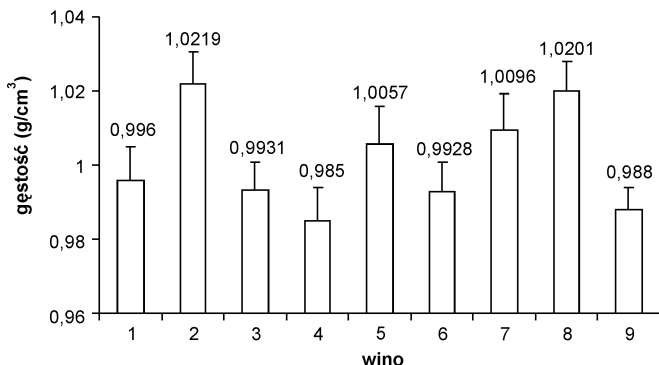
Fig. 3. Antioxidant activity of wines in terms of absorbance after adding of Fe(III).

Odpowiednio na ryc. 4 i 5 zamieszczono wyniki oznaczeń pH i gęstości badanych win. Miały one charakter kwaśny o odczynie niewiele różniącym się między sobą. Większe różnice stwierdzono w gęstości. Wartość tego parametru jest wypadkową między innymi zawartości cukru i alkoholu etylowego.



Ryc. 4. Różnice w kwasowości badanych win.

Fig. 4. Differences in acidity of study wines.



Ryc. 5. Gęstość badanych win.

Fig. 5. Density of study wines.

Uzyskane wyniki badań wskazują na to, że spośród 9 badanych polskich win gronowych, 2 wyróżniły się wysoką zawartością resweratrolu (nr 1 i 2), a kolejne 2 wina posiadały stężenie tego związku również na zadawalającym poziomie (nr 4 i 5).

Wysokie właściwości antyoksydacyjne i związana z tym znaczna całkowita zawartość polifenoli była charakterystyczna dla 3 badanych win (nr 4, 6 i 7).

Uzyskane wyniki badań wykazały, że ponad 50% badanych win posiadało wartości oznaczanych parametrów fizyko-chemicznych mieszczące się w granicach jakie można spotkać w winach produkowanych w uznanych regionach winiarskich świata. Stąd można wnioskować, że rozwijający się przemysł winiarski w Polsce może mieć w perspektywie możliwość uzyskiwania win o odpowiednich walorach prozdrowotnych.

M. B. Gawlik, Ł. Nowak, M. Baran

ANALYSIS OF THE PROPERTIES OF POLISH WINE

Summary

The aim of this work was to assess antioxidant activity, level of resveratrol and total polyphenol content (TPC), pH and density of 9 Polish red wine samples. The samples of wines produced in 2005 were supplied by wine growers from South Poland. The antioxidant activity of wine was assessed by Fe(III) reduction assay. TPC was measured using the Folina-Ciocalteu reagent. A relationship was found between antioxidant values and the concentration of polyphenolic compounds. Solid-phase extraction for sample preparation and HPLC analysis with UV detection were used to determination the level of resveratrol. Each of these stages had been optimised, using standard solutions, to achieve maximum recovery. Values obtained for total resveratrol content in the red wines ranged from 0.37 mg/l to 2.9 mg/l. The resveratrol content in two Polish wines was similar to the values reported in the literature for other good quality wines. Our results show that the physical and chemical properties of some Polish red wine grades are similar to those of red wine produced in other countries with old winemaking traditions.

PIŚMIENNICTWO

1. *Ferrière J.*: The French paradox lessons for other countries. *Heart* 2004; 90: 101-111. – 2. *Opie L.H.*: The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur. Heart J.* 2007; 28: 1683-93. – 3. *Olas B.*: Resweratrol jako dobroczynca w profilaktykach chorób układu krążenia. *Kosmos*

2006; 55: 277-285. – 4. *Russo G.L.*: Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 74: 533-44. – 5. *Tsai S.K., Hung L.M., Fu Y.T* i wspópr.: Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *J. Vasc. Surg.* 2007; 46: 346-53. – 6. *Sönmez U., Sönmez A., Erbil G.* i wspópr.: Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. *Neurosci. Lett.* 2007; 420: 133-7. – 7. *Vitrac X., Monti, J.P., Vercauteren J.* i wspópr.: Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chem. Acta* 2002; 458: 103-110. – 8. *Lamuela-Raventós R.M., Romero-Pérez A.I., Waterhouse A.* i wspópr.: Direct HPLC analysis of cis- and trans resveratrol and piceid isomers in spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agr. Food Chem.* 1995; 43: 281-283. – 9. *Guillén D.A., Merello R., Barroso C.G.* i wspópr.: Solid-phase extraction for sample preparation, in the HPLC analysis of polyphenolic compounds in “Fine” sherry wine. *J. Agr. Food Chem.* 1997; 45: 403-406. – 10. *Celotti E., Ferrarini R., Zironi R.* i wspópr. Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J. Chromatogr A.* 1996; 730: 47-52.

11. *Martínez-Ortega M.V., Carcía-Parrilla M.C., Troncoso A.M.*: Resveratrol content in wines and musts from the south of Spain. *Nahrung* 2000; 44: 253-6. – 12. *Sato M., Suzuki Y., Okuda T.* i wspópr.: Contents of resveratrol, piceid and their isomers in commercial available wines made from grapes, cultivated in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997; 61: 1800-1805. – 13. *Lopez-Velez M., Martínez-Martínez F., Del Valle-Ribes C.*: The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit. Rev. Food Nutr.* 2003; 43:233-244. – 14. *Czeczot H., Podsiad M., Skrzycki M.* i wspópr.: Potencjał antyoksydacyjny w wybranych winach białych i czerwonych. *Farmacja Polska* 2001; 57: 751-752. – 15. *Gąsecka M.*: Analiza biologicznie czynnych składników win. Praca magisterska wykonana w Katedrze Toksykologii CM UJ w Krakowie 2005. – 16. *Fernández-Pachón M.S., Villaño D., García-Parrilla M.C.* i wspópr.: Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. Chem. Acta*, 2004; 513: 113-118.

Adres: 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9.