

А. Э. Модонкаева,
кандидат сельскохозяйственных наук,
Е. А. Сластия,
кандидат биологических наук,
В. А. Бойко,
аспирант,
Н. Н. Аппазова,
аспирант
Национальный институт
винограда и вина «Магарач»

УДК 634.86:547.973:577.127.4

К вопросу оптимизации процесса разделения антоциановых пигментов столового винограда

Викладено новий підхід до комплексної оцінки складу фенольних речовин столового винограду з використанням високоефективної рідинної хроматографії. Наведено результати оптимізації методу аналізу та пробопідготовки виноградної ягоди для вивчення складу фенольних сполук.

Ключові слова:

столовий виноград, фенольні речовини, антоціани

Важным компонентом химического состава столового винограда являются флавоноиды. Они играют доминирующую роль как в обмене веществ, так и в формировании диетических свойств, окраски, вкусовых достоинств винограда. Практически все флавоноиды обладают Р-витаминной и антиокислительной активностью, являясь важнейшим регулятором протекающих внутриклеточных свободнорадикальных процессов [1–4]. Антоцианы, процианидины, катехины и флавонолы, характеризуясь небольшой молекулярной массой, являются наиболее важными флавоноидными соединениями виноградной ягоды и проявляют выраженную биологическую активность. Анализ этих групп соединений играет ключевую роль в определении качества столового винограда.

Весомые аргументы в пользу ключевой роли фенольных соединений, в том числе антоцианового комплекса, в проявлении биологической активности были получены благодаря исследованиям с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Многие годы основными методами выделения, очистки и концентрирования определяемых веществ были жидкостная экстракция, осаждение, центрифугирование, коло-

ночная и тонкослойная хроматографии. Такая подготовка образцов является длительным и многоступенчатым процессом, требующим расхода большого количества особо чистых (не привносящих примесей) растворителей и реактивов, дополнительного оборудования и трудозатрат. С появлением оборудования для ВЭЖХ анализ фенольных соединений винограда стал более доступным и занимает значительно меньше времени [5, 6]. В нашей работе мы усовершенствовали методы подготовки проб, а также качественного и количественного анализа соединений антоцианового комплекса столового винограда с использованием ВЭЖХ и добились существенного прогресса в идентификации состава антоциановых пигментов ягод окрашенных сортов винограда.

Объекты и методы исследования. Объект исследования – сорт столового винограда среднепозднего срока созревания Молдова (9 бригада, ГП «Морское», горнодолинной зоны АР Крым).

Разделение производили на хроматографическом оборудовании фирмы «Shimadzu» (Япония), включающим спектрофотометрический детектор с диодной матрицей ультрафиолетового и видимого диапазонов, микроплунжерный насос

с модулем градиента низкого давления, автосемплер и термостат колонок.

Наилучшие результаты разделения комплекса фенольных веществ были получены на колонке фирмы Macherey–Nagel (Германия) Nucleosil C18AB размером 250*3,0 мм, заполненную обращено-фазовым сорбентом с размером частиц 3 мкм и пористостью 100 Å.

Для анализа антоцианового комплекса пробы готовили следующим образом. Кожицу виноградных ягод отделяли вручную, подсушивали фильтровальной бумагой, затем гомогенизировали при помощи мельющих шаров в планетарной микромельнице «Pulverisette 7», фирмы «Fritsch» (Германия). Далее гомогенизат экстрагировали смесью 50% метанола с 0,5% соляной кислоты. Экстракт центрифугировали Eppendorf 5702 R (Германия) 15 тыс. об. мин., супернатант использовали для хроматографического анализа. Для количественной оценки содержания анализируемых фенольных соединений в виноградной ягоде определяли массовую долю кожицы в ягоде, сухой вес кожицы и рассчитывали коэффициент разбавления при подготовке пробы.

При оптимизации процесса разделения фенольных соединений была подобрана система раствори-

телей, базирующаяся на растворе А – трифтор-уксусной кислоты в воде с массовой концентрацией 0,3% и растворе Б – трифтор-уксусной кислоты в смеси равных пропорций метанола с ацетонитрилом с массовой концентрацией 0,3%.

Для аналитического разделения использовали линейный градиент от 5% раствора Б на 5 минуте до 35% раствора Б к 70 минуте. Детектирование антоцианов проводили по поглощению при длине волны 525 нм.

Результаты и обсуждение. Результаты анализа экстракта кожицы винограда сорта Молдова, проведённого по оптимизированной методике, показаны на хроматограмме, изображённой на рисунке. Основные пики на хроматограмме соответствуют моногликозидам дельфинидина (Rt 42,0), цианидина (Rt 45,5), петунидина (Rt 46,5), пеонидина (Rt 49,3) и мальвинидина (Rt 50,5). С большей задержкой во времени детектируются пики ацилированных производных антоцианов основные из которых мальвидин-3-О-(6'-О-ацетил-гликозид) Rt 62,0 и мальвидин-3-О-(6'-О-п-кумароил-гликозид) Rt 65,7.

Дигликозиды антоцианов имеют меньший период удерживания и выходят в промежутке Rt 36,0–46,5 мин. Ранее, при анализе антоцианового комплекса винограда, исследователями были получены лишь усреднённые характеристики

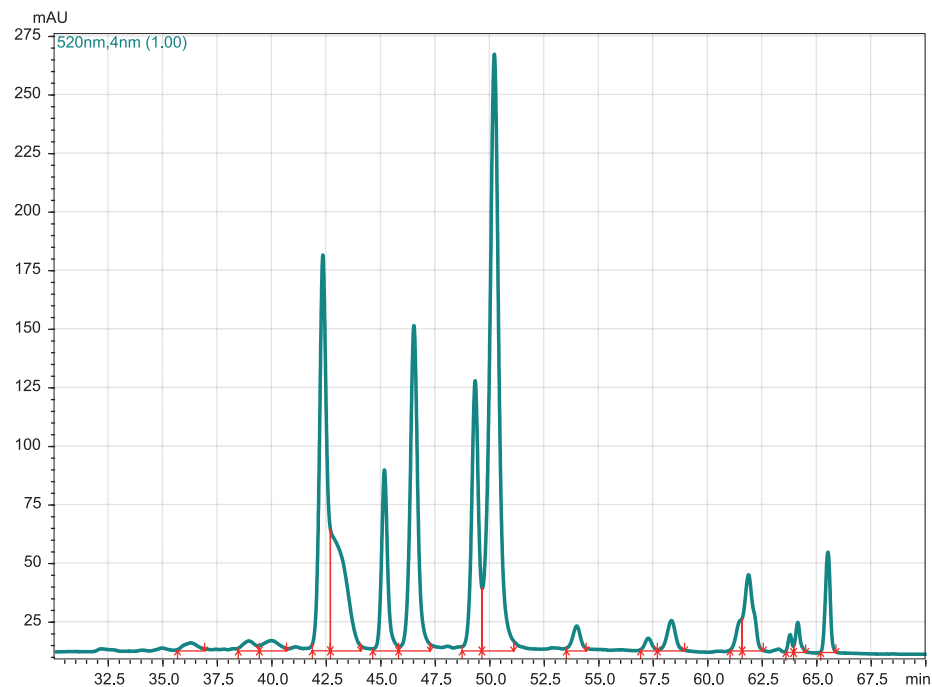


Рис. Хроматограмма комплекса антоцианов винограда сорта Молдова.

содержания антоциановых пигментов по группам – моногликозиды, дигликозиды и ацилированные производные. Оптимизированная методика открывает возможности определения массовой концентрации отдельных антоцианов, что является особенно актуальным в связи с проблемой оценки сортовой чистоты виноградников. Мальвидин-3,5-дигликозид (Rt 46,5) является веществом маркирующим виноград гибридного происхождения, использование которого в виноделии ограничивается европейскими директивами.

Выводы. Подобранны оптимальные условия для проведения ана-

лиза состава антоцианового комплекса кожицы виноградной ягоды методом ВЭЖХ. Достигнута высокая селективность пиков и эффективность разделения, достаточная для определения массовой концентрации отдельных веществ по градуировочной характеристике.

Предложенная методика анализа пигментного комплекса тёмноокрашенных ягод винограда позволяет достоверно определять сортовую чистоту виноградника по пику мальвидин-3,5-дигликозида.

Достигнут прогресс в определении качественных показателей пищевой и биологической ценности столового винограда.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Кретович, В. Л. Основы биохимии растений / В. Л. Кретович. – М.: Высшая школа, 1971. – 464 с.
2. Скалецька, Л. Ф. Біохімія плодів та овочів /Л. Ф. Скалецька, Г. І. Подпрятів // Навч. посібн. – Київ, 1999. – 159 с.
3. Кишковский, З. Н. Химия вина / З. Н. Кишковский, И. М. Скурихин. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 310 с.
4. Дженева, С. Ю. Производство винограда, кишмиша и изюма / С. Ю. Дженева, К. В. Смирнов. – М.: Колос, 1992. – 173 с.
5. L. R. Snyder, Principles of Adsorption Chromatography., M. Dekker N – Y., 1968.
6. Сластья, Е. А. Экспресс-метод полуколичественного определения содержания мальвидин-3,5-дигликозида в кожице винограда, сусле и молодых красных винах / Е. А. Сластья, Т. А. Жилыкова, Н. И. Аристова, И. Ф. Ткачев [и другие] // Виноделие и виноградарство. – 2005. – № 2. – С. 26–27.