

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ**К ВОПРОСУ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОБОПОДГОТОВКИ И МЕТОДА АНАЛИЗА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ
СТОЛОВОГО ВИНОГРАДА**

Н.АППАЗОВА;

В.БОЙКО;

Е.А.СЛАСТЬЯ, кандидат биологических наук;

А.Э.МОДОНКАЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук

НИВиВ «Магарач», г. Ялта

Введение

Для оценки качества столового винограда определение содержания и состава фенольных соединений является одним из основных параметров. Фенольные соединения винограда определяют его вкусовые качества и внешний вид, однако основной особенностью этих веществ является их биологическая активность. Относительно биологической активности фенольных соединений винограда на протяжении последних трех десятилетий ведется активная полемика, начало которой положено явлением так называемого французского парадокса. Весомые аргументы в пользу ключевой роли фенольных соединений в проявлении биологической активности были получены лишь недавно благодаря исследованиям с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Важным компонентом химического состава столового винограда являются флавоноиды. Они играют доминирующую роль как в обмене веществ, так и в формировании диетических свойств, окраски и 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.

Многие годы основными методами выделения, очистки и концентрирования определяемых веществ были экстракция, осаждение, центрифугирование, бумажная, колоночная и тонкослойная хроматографии. Такая подготовка образцов является длительным и многоступенчатым процессом, требующим расхода большого количества особо чистых растворителей и реактивов, дополнительного оборудования и трудовых затрат. 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 и анализа фенольных соединений винограда с использованием ВЭЖХ и добились существенного прогресса в идентификации состава антоцианового комплекса ягод окрашенных сортов винограда.

Объекты и методы исследования

Для работы использовали столовый виноград технической зрелости сорта Молдова, собранный на коллекционном участке НИВиВ «Магарач» в с. Вилино в сентябре 2010 г.

Разделение производили на хроматографическом оборудовании фирмы «Shimadzu» (Япония), включающем 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 250x3,0 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом с размером частиц 3 мкм и пористостью 100 Å.

Для анализа антоцианового комплекса пробы готовили следующим образом. Кожицу виноградных ягод отделяли вручную и подсушивали ее фильтровальной бумагой, затем гомогенизировали при помощи мелющих 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) при 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, ее сухой вес и рассчитывали коэффициент разбавления при подготовке пробы.

В процессе оптимизации процесса разделения антоциановых соединений была подобрана система растворителей, базирующаяся на растворе А – трифторуксусной кислоты в воде с массовой концентрацией 0,3% и растворе Б – трифторуксусной кислоты с массовой концентрацией 0,3% в смеси равных пропорций метанола с ацетонитрилом.

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

Результаты и обсуждение

Результаты анализа экстракта кожицы винограда сорта Молдова, проведенного по оптимизированной методике, показаны на хроматограмме, изображенной на рисунке. Основные пики на хроматограмме соответствуют моногликозидам дельфинидина (Rt 42,0), цианидина (Rt 43,5), петунидина (Rt 45,5), пеонидина (Rt 49,3) и мальвинидина (Rt 50,5). С большей задержкой во времени выходят пики ацилированных производных антоцианов, основные из которых мальвидин-3-О-(6'-О-ацетилгликозид) Rt 62,0 и мальвидин-3-О-(6'-О-п-кумароил-гликозид) Rt 65,7. Дигликозиды антоцианов имеют меньшие времена удерживания и выходят в промежутке Rt 36,0 – 46,5 мин. Ранее при анализе антоцианового комплекса винограда исследователями были получены лишь усредненные характеристики 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.

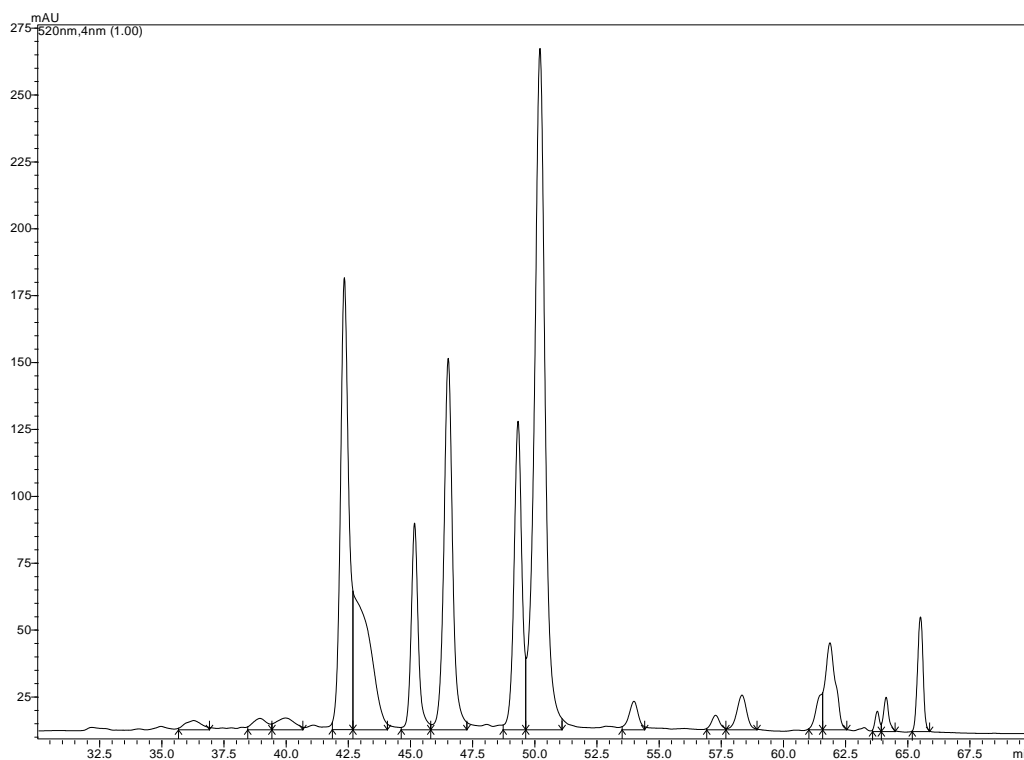


Рис. Хроматограмма комплекса антоцианов сорта винограда Молдова

Выводы

1. Подобраны оптимальные условия для проведения анализа 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.

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

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

Список литературы

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

Рекомендовано к печати к.б.н. Палий А.Е.