

Polifenolių ir antocianinų kiekis vynuogėse, vynuogių sultyse ir raudonuose vynuose bei jų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Vitalis Briedis, Vitalija Povilaitytė, Saulius Kazlauskas¹, Petras Rimantas Venskutonis²

Kauno medicinos universiteto Vaistų technologijos ir farmacijos organizavimo katedra,

¹Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra, ²Kauno technologijos universiteto Maisto technologijos katedra

Raktažodžiai: vynuogės, polifenoliai, antocianai, antioksidacinis aktyvumas, chromatografija.

Santrauka. Darbo tikslas. Pagaminti vynuogių (*Vitis vinifera L.*) ekstraktus, panaudojant efektyvius tirpiklius, ir palyginti šių ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, polifenolių ir antocianinų kiekius bei komponentinę sudėtį su vynuogių sulčių ir vynu minėtomis charakteristikomis. Pagaminti raudonųjų ir mėlynųjų vynuogių metanoliniai bei vandeniniai ekstraktai. Nustatytas bendras polifenolių ir antocianinų kiekis vynuogių ekstraktuose, sultyse bei vynuose. Bendras polifenolių kiekis nustatytas spektrofotometriškai matuojant absorbciją (panaudotas Folin-Ciocalteu reagentas). Bendras antocianinų kiekis nustatytas pH-diferenciniu metodu. Visų šių vynuogių produktų antioksidacinis aktyvumas ištirtas modelinėse laisvųjų radikalų 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) ir 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS) sujungimo sistemose. Rezultatai, gauti abiem antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodais, buvo palyginti; remiantis jais, galima spręsti apie gebėjimą inaktyvuoti laisvuosius radikalus. Polifenoliai ir antocianinai buvo išskirstomi naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą. Malvidino, delfinidino ir petunidino junginiai buvo identifikuoti kaip pagrindiniai antocianinai, esantys vynuogėse ir pasižymintys antioksidaciniu aktyvumu. Raudonuosiuose vynuogių vynuose nustatyti santykinai didesni polifenolių ir antocianinų kiekiai negu kituose tirtuose objektuose. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas būdingas tirtiems vynamams, o gauti rezultatai tiesiogiai koreliavo su nustatytu polifenolių kiekiu. Koreliaciją tarp antocianinų kiekio tirtuose objektuose ir jiems būdingo antioksidacinio aktyvumo nepatvirtinta.

Įvadas

Vykstant normaliems ląstelių gyvybiniam procesams bei veikiant aplinkos veiksniams, organizme nuolat susidaro laisvieji radikalai. Laisvųjų radikalų perteklius kelia pavojų organizmui ir gali būti ligos priežastis. Būtina pažymėti neigiamą aplinkos teršalų, UV spindulių, jonizuojančios radiacijos, ksenobiotikų, cigarečių dūmų poveikį, skatinantį laisvųjų radikalų susidarymą. Jeigu organizmo apsauginės antioksidacinės sistemos nepakankamai efektyvios arba trūksta antioksidantų, laisvieji radikalai gali sukelti oksidacinį stresą.

Dėl laisvojo elektrono atomų orbitalėje laisvieji radikalai yra labai aktyvūs, biologinėse sistemose jie egzistuoja labai trumpai. Lengvai atiduodami elektroną arba prisijungdami jį iš kitų molekulių, jie veikia kaip oksidatoriai ar reduktoriai. Dėl to organizme susidaro lipidų peroksidai, kinta DNR ir baltymai, o tai gali tapti audinių pažeidimų priežastimi. Neseniai paskelbti

duomenys apie ypatingą laisvųjų radikalų poveikį ląstelėse vykstantiems procesams, jų reikšmę aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų, cukrinio diabeto, lėtinio inkstų nepakankamumo, reumatinio artrito, nervų sistemos ligų pasireiškimui (1). Tyrimų rezultatai patvirtina oksidacinio streso įtaką lėtiniam uždegiminiams procesams organizme bei bendram organizmo senėjimui.

Antioksidantais dažniausiai vadinamos medžiagos, kurių maži kiekiai yra pakankamai efektyvūs slopinant ar visiškai sustabdant oksidacijos procesus. Jie slopina laisvųjų radikalų susidarymą, pašalina juos arba skatina jų suirimą ir taip saugo organizmą nuo galimo žalingo poveikio audiniams. Organizme viena svarbi ir endogeninė, ir egzogeninė apsauginė antioksidacinė sistema, saugančios ląstelių komponentus nuo žalingo laisvųjų radikalų poveikio. Pagal veikimo mechanizmą antioksidantus galima skirstyti į tris pagrindines grupes: fermentus antioksidantus, gran-

dininę reakciją nutraukiančius antioksidantus bei kinetinio valentingumo metalus surišančius baltymus (2).

Dabar vis didesnis dėmesys skiriamas polifenolių, tarp jų ir antocianinų, vartojimui su maistu. Nuo jų kokybinės ir kiekybinės sudėties labai priklauso ne tik produkto išvaizda (spalva), aromatas, skonis, bet ir bendras produkto antioksidacinis aktyvumas (3). Tuo paaiškinamas domėjimasis antioksidantais turtingais augalais ir iš jų gaminamais produktais, kurių teigiamas poveikis dažniausiai siejamas su stipriu antioksidaciniu aktyvumu. Epidemiologinių tyrimų duomenys patvirtina atvirkštinę priklausomybę tarp vaisių ir daržovių suvartojimo ir rizikos susirgti širdies ir kraujagyslių sistemos ligomis. Tokie rezultatai aiškinami maisto nustatomų antioksidantų kiekiu. Būtent dėl šių junginių buvimo vynuogių bei iš jų pagamintų produktų vartojimas didina plazmos antioksidacinį potencialą, slopina mažo tankio lipoproteinų oksidaciją (4, 5). Tyrimais patvirtinta atvirkštinė priklausomybė tarp vynuogių, vynuogių sulčių ir saikingo raudono vyno vartojimo bei širdies ir kraujagyslių ligų sąlygotų mirčių (6).

Vynuogėse nustatyti palyginti dideli polifenolių kiekiai. Jie netolygiai pasiskirstę vynuogių žievelėje, minkštyme ir sėklose. Dėl šios priežasties bei dėl vynuogių produktų technologijų skirtumų įvairuoja ir polifenolių kiekiai produktuose, pagamintuose iš vynuogių (7). Polifenolių sudėtis ir kiekiai produktuose dažniausiai kinta dėl ten vykstančių kondensacijos reakcijų, kurioms vykstant susidaro nauji polimeriniai pigmentai. Kitos polifenolių kitimo priežastys – jų dalyvavimas oksidacijos ir hidrolizės procesuose (6).

Antocianinų kiekis vynuogėse priklauso nuo jų brandos bei polifenolių biosintezei turinčių įtakos aplinkos sąlygų: šviesos intensyvumo, temperatūros. Antocianinų sudėtis yra svarbi per dieną suvartojamų biologiškai aktyvių junginių kiekiui ir produkto komercinei vertei nustatyti. Tokie tyrimai taip pat gali padėti įrodyti produktų autentiškumą ir kokybės reikalavimų atitikimą (8, 9).

Šio darbo tikslas buvo nustatyti polifenolių ir antocianinų kiekį Lietuvoje vartojamose vynuogėse (*Vitis vinifera L.*, kilmės šalis – Italija), vynuogių sultyse, vynuogių vynuose bei šių produktų antioksidacinį aktyvumą, taip pat įvertinti galimą šių rodiklių koreliaciją. Bandyta įvertinti technologinių procesų ir laikymo sąlygų įtaką polifenolių ir antocianinų sudėčiai ir kiekiui tirtuose objektuose. Lygiagrečiai buvo įvertintas naudotų tyrimo metodų tinkamumas užsibrėžtiems tikslams pasiekti.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Tyrimams pasirinktos rausvosios ir mėlynosios vynuogės bei dvi rūšys natūralių raudonųjų vynuogių

sulčių. Sudėtingiau buvo pasirinkti vynuogių vynu pavyzdžius, nes gamintojų, žaliavos rūšių ir kilmės regionų gamybos technologijų įvairovė yra didelė. Šiam tyrimui buvo pasirinkti du raudonieji vynuogių vynai, kurių vienas buvo priskiriamas jauniems vynams, o kitas – trejų metų išlaikymo vynams.

Tyrimams buvo pritaikyti jautrūs, selektyvūs ir tikslūs šiuolaikiniai analizės metodai. Antocianinų kokybinei ir kiekybinei analizei dažniausiai naudojama efektyvioji skysčių chromatografija (ESC), nes tiriamam mėginiui taikoma mažiausiai paruošimo procedūrų, kurios gali pakeisti junginių sudėtį dėl jų hidrolizės, oksidacijos arba izomerizacijos procesų. Filtruotas antocianinų mėginys tiesiogiai injekuojamas į chromatografinę kolonėlę, nes kiti polifenoliniai junginiai netrukdo juos nustatyti esant 520 nm bangos ilgiui.

Naudotas ESC grynumo acetonitrilas buvo įsigytas iš „Carl Roth GmbH&Co“ (Vokietija). Eliuentui parūgštinti buvo naudojamos analizinio grynumo fosforo ir acto rūgštys (Lachema, Čekija). Vanduo buvo paruošiamas naudojant „Millipore“ (JAV) vandens valymo įrangą.

Polifenoliniai junginiai iš vynuogių buvo ekstrahuoti dviem būdais: 0,1 N HCl parūgštintu vandeniu ir 0,1 N HCl parūgštintu metanolio. Buvo ekstrahuojama iki visiško polifenolinių junginių išskyrimo iš žaliavos. Prieš chromatografinę analizę vynuogių ekstraktai, vynuogių sultys ir vynai buvo filtruojami per 0,45 μm porų dydžio membraninį filtrą.

Bendras polifenolinių junginių kiekis. Bendrasis polifenolinių junginių kiekis buvo nustatomas su *Folin-Ciocalteu* reagentu naudojant etaloninį galo rūgšties tirpalą. *Folin-Ciocalteu* reagentas buvo skiedžiamas distiliuotu vandeniu (1:10) ir 5 ml įpilama į 1 ml tiriamo vynuogių ekstrakto, sulčių ar vyno. Vėliau buvo įpilama 4 ml 7,5 proc. natrio karbonato tirpalo ir po 30 min. spektrofotometru UNICAM „Helios α“ matuojamas tirpalo optinis tankis esant 765 nm bangos ilgiui. Bendras polifenolinių junginių kiekis apskaičiuotas pagal tokią formulę išreiškiant galo rūgšties ekvivalento mg:

$$C = c \times V \times m^{-1},$$

kur: C – polifenolinių junginių koncentracija (galo rūgšties ekvivalentais), c – galo rūgšties koncentracija (mg×ml⁻¹), V – ekstrakto tirpalo tūris (ml), m – ekstrakcijai paimto mėginio svoris (g).

Kiekvieno bandinio tirta po tris pakartotinius mėginius.

Bendras antocianinų kiekis. Antocianinų kiekis pavyzdžiuose nustatomas pH diferenciniu metodu (10). Vynuogių ekstraktai, sultys ir vynai buvo skiedžiami

buferiniu tirpalu (pH 1,0) iki absorbcija esant 520 nm bangos ilgiui bus intervale 0,4–0,6. Išmatuojama absorbcija 520 nm ir 700 nm bangos ilgiuose. Tokia pati procedūra buvo taikoma skiedžiant pH 4,5 buferiniu tirpalu. Visas antocianinų kiekis apskaičiuotas pagal formulę:

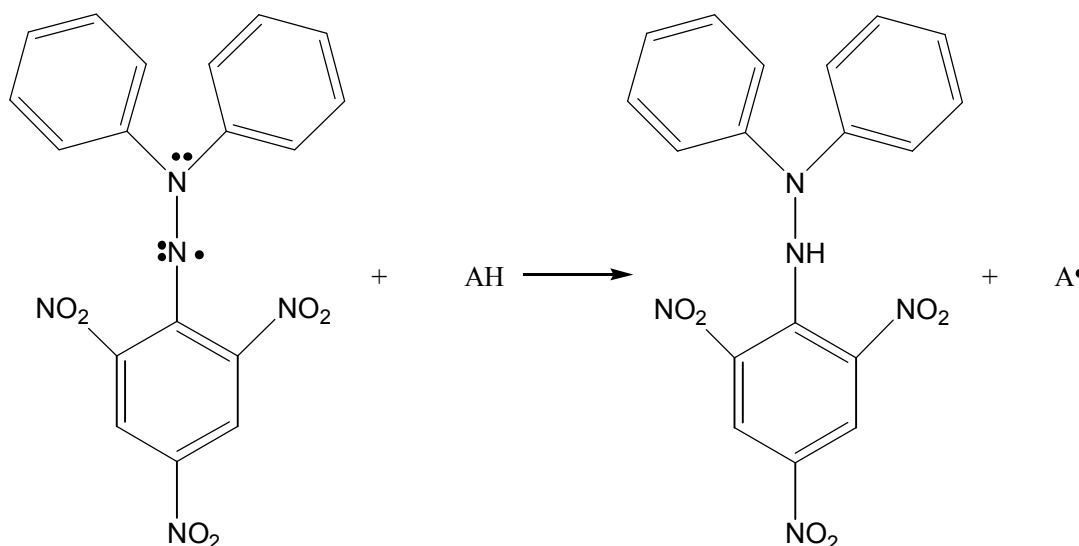
$$C = A \times 10^3 \times MS \times P \times \epsilon^{-1} \times L^{-1},$$

kur: C – visas antocianinų kiekis ($\text{mg} \times \text{l}^{-1}$), A – absorbcija (apskaičiuota pagal formulę $A = (A_{520 \text{ nm pH } 1,0} - A_{700 \text{ nm pH } 1,0}) - (A_{520 \text{ nm pH } 4,5} - A_{700 \text{ nm pH } 4,5})$), MS – cianidin-3-glikozido molekulinis svoris (445), S – praskiedimas, ϵ – cianidin-3-glikozido molinė absorbcija (29600).

Vynuogių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo sujungimo metodas. DPPH radikalo tirpalas, prisijungdamas protoną, keičia spalvą iš purpurinės į geltoną ir praranda savybę absorbuoti 515 nm bangos ilgio šviesą (1 pav.).

Ekstraktų gebėjimas sujungti laisvąjį radikalą nustatytas naudojant modifikuotą DPPH sujungimo metodą, aprašytą W. Brand-Williams ir kt. (11). Vienkartinėje 1 cm kiuvetėje 77 μl ekstrakto buvo sumaišyta su 3 ml DPPH tirpalo, šviežiai paruošto metanolyje ($6,5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). Reakcijos mišinys buvo paliekamas tamsoje ir spektrofotometru buvo išmatuota absorbcija 515 nm bangos ilgyje po 6 valandų. Tuščias bandinys buvo ruošiamas sumaišant DPPH tirpalą tokiu pačiu santykiu kaip ruošiant su ekstraktais. Ekstraktų aktyvumas išreiškiamas DPPH inaktyvinimo procentais:

$$DPPH_{\text{inaktyvinimo}\%} = \frac{DPPH_{T_0}^{\bullet} - DPPH_{T_i}^{\bullet}}{DPPH_{T_0}^{\bullet}} \times 100,$$



1 pav. DPPH radikalo reakcija su antioksidantu

kur: $DPPH_{T_0}^{\bullet}$ – tuščiojo bandinio absorbcija ($T_0=0$); $DPPH_{T_i}^{\bullet}$ – bandinio su ekstraktu absorbcija ($T_i=6$ valandos).

2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS) radikalo katijono sujungimo metodas. ABTS^{•+} radikalas buvo gautas reaguojant ABTS su kalio persulfatu (12). Radikalas pasigamina laikant ABTS ir kalio persulfato mišinį santykiu 2:1 tamsoje 16 valandų. Katijoninė radikalo forma išlieka stabili dvi paras. Antioksidaciniam aktyvumui įvertinti ABTS^{•+} praskiedžiamas fosforo ir druskos buferiniu tirpalu, kad 734 nm bangos ilgio šviesos absorbcija būtų 0,7. Antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas ABTS inaktyvinimo procentais ir apskaičiuojamas pagal tą pačią formulę kaip ir taikant DPPH radikalo sujungimo metodą.

Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė. Chromatografinė analizė buvo atliekama pritaikius mokslinėje literatūroje aprašytą metodą (9) ir naudojant skysčių chromatografą „Waters 2690“ su spektrofotometriniu detektoriumi „Waters 2487“ bei fotodiodų UV detektoriumi. Chromatografinė kolonėlė „X-Terra“ RP₁₈, 3,5 μm , kolonėlės matmenys 3,0 \times 150 mm, prieškolonėlė „X-Terra“. Injekuojamo pavyzdžio tūris – 10 μl . Optinis tankis buvo matuojamas esant 520 nm bangos ilgiui. Eliuento tekėjimo greitis, sudėtis ir sudėties kitimas pateikiami pirmoje lentelėje. Eliuento komponentų kiekiai buvo keičiami pagal tiesinę priklausomybę. Chromatografinės analizės rezultatai apskaičiuoti panaudojus „Millenium“ programinę įrangą.

Rezultatai ir jų aptarimas

Polifenolių ir antocianinų nustatymo vynuogėse, natūraliose vynuogių sultyse ir vynuose rezultatai patei-

1 lentelė. Chromatografijos eliuento sudėties kitimas nustatant antocianinus

Laikas (min.)	Eliuento greitis (ml/min.)	Vanduo (proc.)	Acetonitrilas (proc.)	1,5 proc. H ₃ PO ₄ +15 proc. CH ₃ COOH (proc.)
0,00	0,40	55,0	5,0	40,0
50,00	0,40	29,0	21,0	50,0

2 lentelė. Polifenolių ir antocianinų koncentracijos vynuogėse (mg×kg⁻¹), vynuogių sultyse ir vynuose (mg×kg⁻¹)

Produktas	Polifenolių kiekis (±SN)	Antocianinų kiekis (±SN)
Raudonųjų vynuogių metanolinė ištrauka	451,767±14,889	50,664±1,353
Mėlynųjų vynuogių metanolinė ištrauka	537,533±28,506	84,565±2,221
Raudonųjų vynuogių vandeninė ištrauka	411,300±8,654	44,149±1,397
Mėlynųjų vynuogių vandeninė ištrauka	430,733±9,069	74,267±1,242
Vynuogių sultys – 1 pavyzdys	157,050±10,046	0
Vynuogių sultys – 2 pavyzdys	443,333±13,742	10,023±1,356
Raudonasis vynas (jaunas raud. vynas)	1063,633±11,124	63,743±2,225
Raudonasis vynas (išlaikytas raud. vynas)	1570,477±10,225	26,835±0,813

kiami antroje lentelėje. Polifenolių ir antocianinų koncentracijos tirtose sultyse ir vynuose pateiktos mg×l⁻¹, o šių junginių koncentracijos vynuogėse nurodytos mg×kg⁻¹, nes ekstrahuotos medžiagos kiekis buvo nustatomas pasvėrus. Kadangi sulčių ir vyno 1 l svoris yra beveik lygus 1 kg, polifenolių ir antocianinų koncentracijų palyginimas tirtuose objektuose nesudaro kliūčių.

Gauti rezultatai parodė, kad polifenolių ir antocianinų kiekiai tirtuose objektuose labai skiriasi. Didžiausias polifenolių kiekis nustatytas vynuose. Tiek mėlynosiose, tiek ir raudonosiose vynuogėse polifenolių nustatyta mažiau. Rezultatai patvirtino, kad polifenoliai ir antocianinai efektyviau ekstrahuojami metilo alkoholiu negu vandeniu. Netikėtai maži kiekiai polifenolių buvo nustatyti tiriant vieną iš pasirinktų natūralių vynuogių sulčių rūšių. Antocianinų šiose sultyse nerasta. Tą galima aiškinti prastos kokybės žaliavos naudojimu arba technologinių normų nepaisymu.

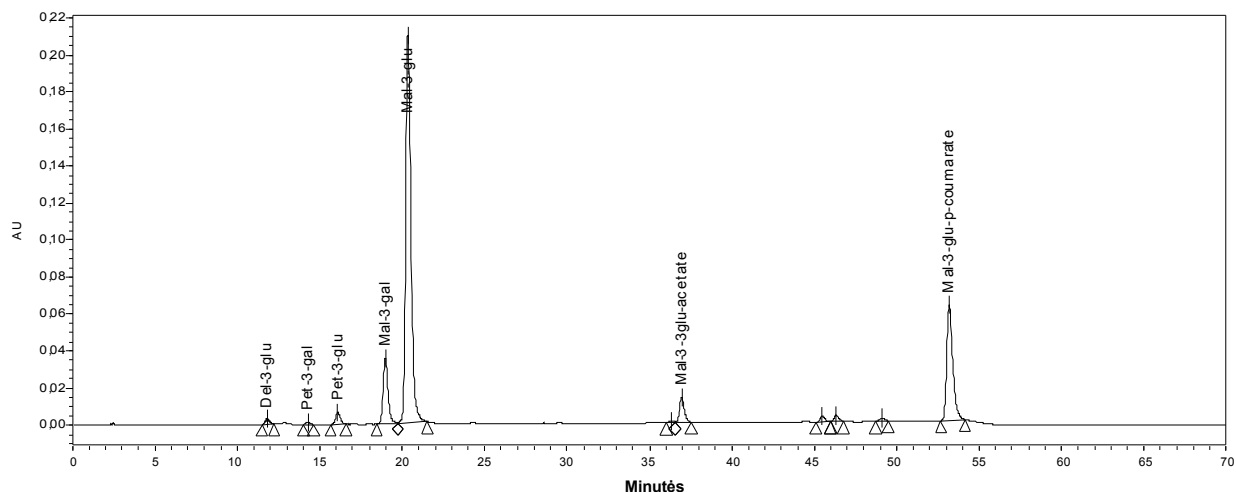
Atlikus chromatografinę analizę, galima patikimai atskirti antocianinus vynuogių ekstraktuose, vynuogių sultyse ir vynuose. Antocianinai buvo nustatomi pagal jų eliuacijos laiką bei seką. Panaudojant fotodiodų detekciją, lygiagrečiai atlikta ESC. Gauti duomenys buvo lyginami su paskelbtais mokslinėje literatūroje duomenimis ir taip buvo patvirtinta antocianinų tapatybė. Nustatyta, kad ekstrahuojant metanoliumi išgaunama 10–15 proc. didesni antocianinų kiekiai negu ekstrahuojant vandeniu.

DSSC metodu metanoliniame ir vandeniame mėlynųjų vynuogių ekstrakte nustatyta 11 antocianinų (2 pav.). Jų procentinė sudėtis ekstraktuose nežymiai skyrėsi. Vyraujantis mėlynųjų vynuogių antocianinų komponentas – malvidin-3-O-gliukozidas sudarė apie 60 proc. visų antocianinų kiekio.

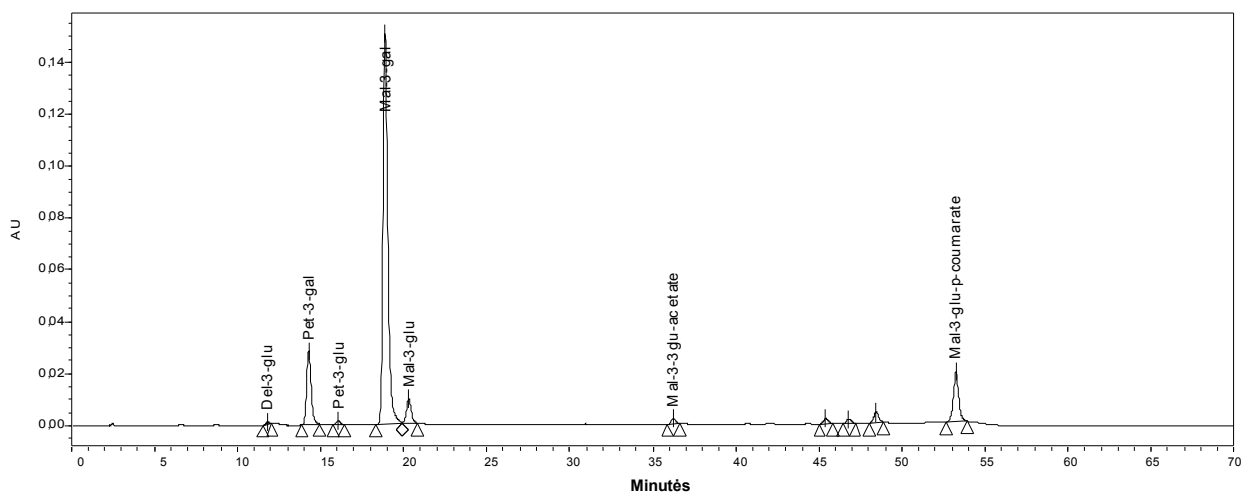
Raudonųjų vynuogių metanoliniame ir vandeniame ekstrakte identifikuota 10 antocianinų, o jų procentinė sudėtis nežymiai skyrėsi. Vyraujantis komponentas abiejose ištraukose buvo malvidin-3-O-gliukozidas, kuris sudarė iki 70 proc. visų antocianinų kiekio. Raudonųjų vynuogių metanolinio ekstrakto chromatograma pateikiama trečiame paveiksle. Taigi acetilinto antocianino kiekis buvo mažas.

Vynuogių sulčių pavyzdžio, kuriame rasta polifenolinių junginių ir antocianinų, chromatograma pateikiama ketvirtame paveiksle. Taigi procentinė antocianinų sudėtis buvo panaši į mėlynųjų vynuogių ekstraktą. Sultyse, kaip ir mėlynųjų vynuogių ištraukose, vyraujantis antocianinas – malvidin-3-O-gliukozidas (apie 45 proc. viso antocianinų kiekio). Šis kokybinis ir kiekybinis vynuogių ir vynuogių sulčių sudėčių panašumas gali būti aiškinamas technologinių procesų daroma įtaka antocianinų sudėties pokyčiams.

Antocianinų spektrofotometrinio nustatymo vynuose duomenis patvirtino chromatografinės analizės duomenys. Juose nustatyti didžiausi antocianinų kiekiai palyginus su kitais tirtais objektais. Abiejų tirtų vynu atvejais vyravo malvidin-3-O-gliukozidas, kuris jau



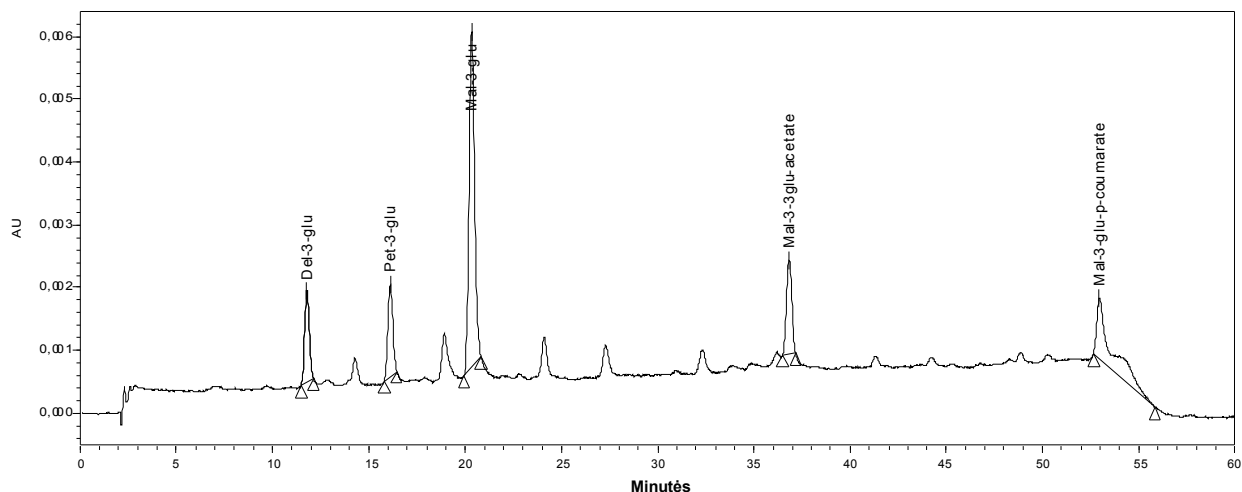
2 pav. Mėlynujų vynuogių metanolinio ekstrakto DSSC chromatograma



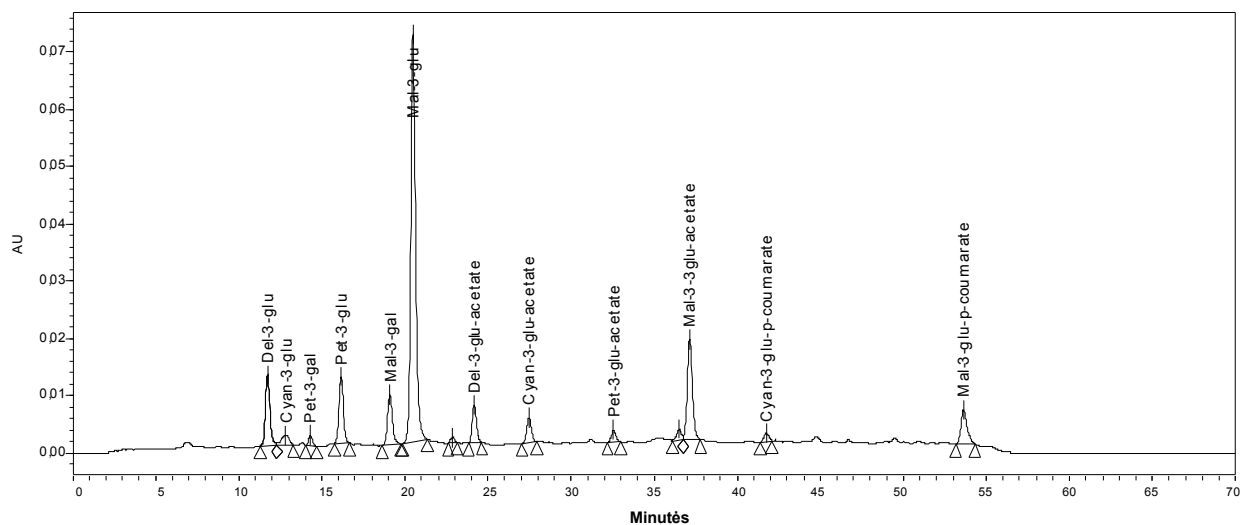
3 pav. Raudonųjų vynuogių metanolinio ekstrakto DSSC chromatograma

3 lentelė. DSSC metodu nustatyti antocianinų smailių plotai (proc. nuo viso nustatytų junginių kiekio)

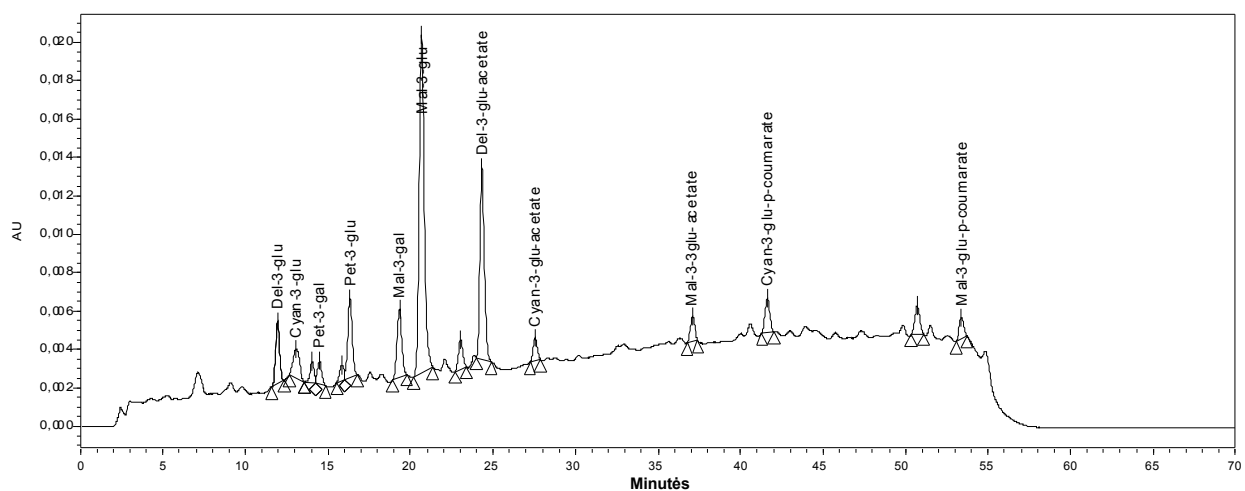
Eil. Nr.	Antocianinas	Mėlynosios vyn. MeOH	Raudonosios vyn. MeOH	Mėlynosios vyn. HOH	Raudonosios vyn. HOH	Jaunas raudonas vynas	Išlaikytas raudonas vynas	Vynuogių sultys – 2 pvz.
1.	Del-3-glu	0,69	0,35	1,01	1,08	7,45	5,20	10,17
2.	Cyan-3-glu				0,91	1,74	4,04	
3.	Pet-3-gal	0,26	11,73	0,59	14,93	1,03	2,19	
4.	Pet-3-glu	1,64	0,64	2,13	1,16	7,22	7,58	10,77
5.	Mal-3-gal	9,59	68,46	14,58	69,99	5,71	7,59	
6.	Mal-3-glu	60,89	4,29	66,17	4,91	49,24	36,03	44,75
7.	Del-3-glu-acetate					3,86	18,08	
8.	Cyan-3-glu-acetate					2,68	2,06	
9.	Pet-3-glu-acetate					1,37		
10.	Mal-3-3glu-acetate	3,73	0,92	2,90	0,58	12,21	2,51	12,13
11.	Cyan-3-glu-p-coumarate					0,86	3,45	
12.	Mal-3-glu-p-coumarate	20,80	10,18	11,54	4,85	4,88	2,10	22,18



4 pav. Vynuogių sulčių (2 pavyzd.) DSSC chromatograma



5 pav. Jauno raudonojo vyno DSSC chromatograma



6 pav. Išlaikyto raudonojo vyno DSSC chromatograma

name vyne sudarė apie 50 proc. visų chromatografiškai nustatytų antocianinų, o trejus metus išlaikytame vyne – apie 37 proc. visų nustatytų antocianinų (5 ir 6

paveikslai). Tą galima paaiškinti skirtingomis vynu gamybos technologijomis bei antocianinų sudėties pokyčiais vynu saugojimo metu.

Atlikus chromatografinę analizę, galima įvertinti kokybinę ir kiekybinę individualių antocianinų sudėtį – tai gali padėti patvirtinti produktų autentiškumą bei kokybę. Kokybinės sudėties patvirtinimui vertingą informaciją suteikia ESC su fotodiodų detekcija, pagal kurią įvertinama atskirtų junginių tirpalų absorbcija esant skirtingiems bangos ilgiams, ir gaunama papildomos informacijos atskirų komponentų tapatumui patvirtinti. Septintame paveiksle pateikiama raudonojo vyno pavyzdžio ESC su fotodiodu detekcija chromatograma. Daugelio atskirtų junginių būdingas didžiausias optinis tankis yra intervale 510–530 nm, o tai būdinga antocianinams. Įvertinus šių junginių sulaikymo

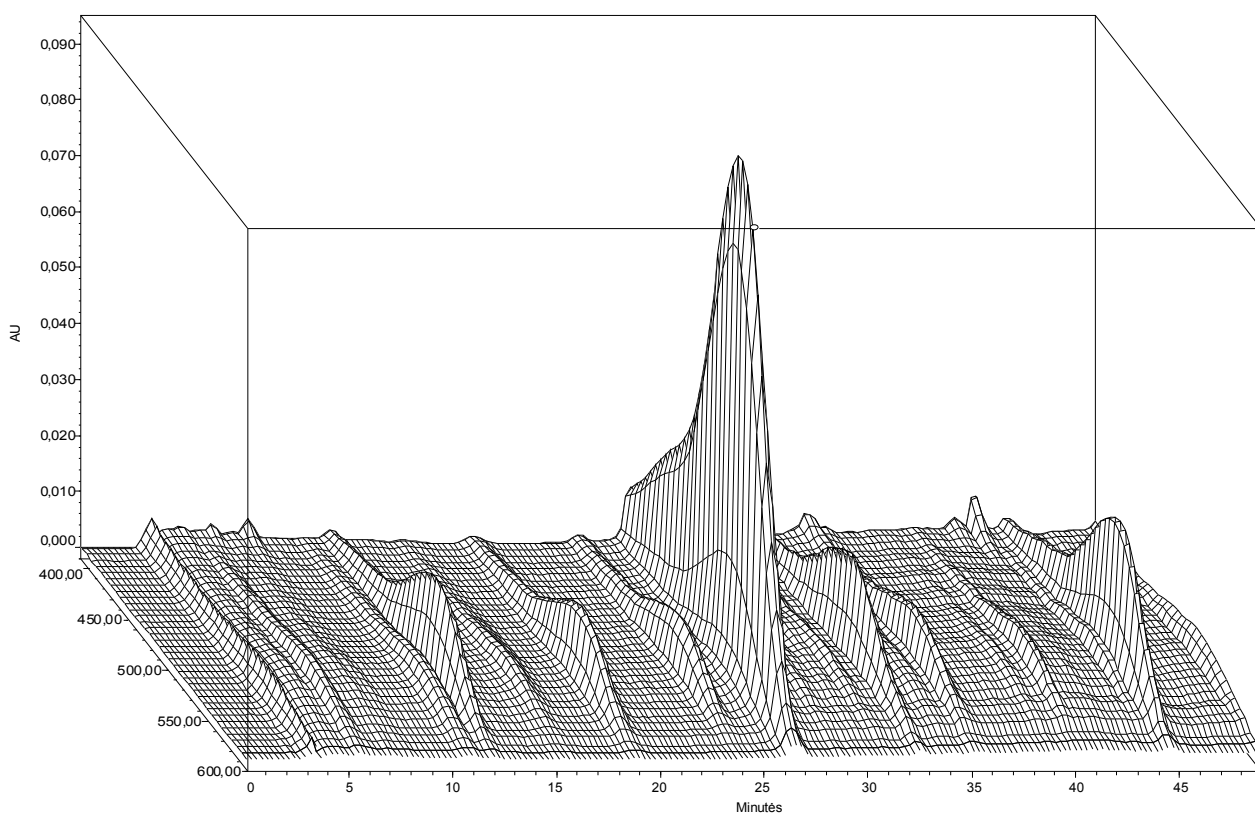
kolonėlėje laikus, galima pakankamai tiksliai identifikuoti šiuos junginius.

Atlikus antioksidacinio aktyvumo tyrimus, taip pat galima spręsti apie produktų tapatybę ir kokybę. Be to, toks tyrimas suteikia informacijos apie potencines galimybes inaktyvuoti reaktyvius deguonies junginius, kurių perteklius organizme dažniausiai sukelia oksidacinį stresą.

Abiem metodais nustatytas vynu antioksidacinis aktyvumas buvo didžiausias tarp tirtų objektų, nors jų sudėtyje esančiam alkoholiui priskiriamas prooksidacinis poveikis (13). Pastarasis yra kompensuojamas raudonajame vyne esančių polifenolių antioksidacinio poveikio. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas nu-

4 lentelė. Produktų antioksidacinis aktyvumas nustatytas DPPH• surišimo ir ABTS radikalų katijonų dekolozavimo sistemomis

Nr.	Produktas	DPPH metodas	ABTS metodas
1.	Raudonųjų vynuogių metanolinė ištrauka	60,85±1,57	46,99±1,03
2.	Mėlynųjų vynuogių metanolinė ištrauka	76,75±1,01	60,71±1,02
3.	Raudonųjų vynuogių vandeninė ištrauka	36,17±1,01	28,34±1,48
4.	Mėlynųjų vynuogių vandeninė ištrauka	59,10±0,24	45,37±0,50
5.	Vynuogių sultys – 1 pavyzdys	21,05±1,94	16,58±1,92
6.	Vynuogių sultys – 2 pavyzdys	46,94±1,54	29,66±2,05
7.	Jaunas raudonasis vynuogių vinas	83,56±0,02	67,83±1,48
8.	Išlaikytas raudonasis vynuogių vinas	90,14±1,02	80,21±0,09



7 pav. Raudonojo vynuogių vyno analizė DSSC metodu su fotodiodine detekcija

statytas tiriant vynuogių sulčių pavyzdį, kuriame nustatytas mažiausias polifenolių kiekis. Tai gali būti aiškinama produkto technologijos ypatybėmis. Pradinės raudonųjų vynu gamybos stadijos metu vykdoma maceracija didina polifenolinių junginių ekstrakciją iš vynuogių žievelių ir sėklų.

Polifenolių kokybinė ir kiekybinė analizė, antioksidacinio aktyvumo tyrimai suteikia galimybę įvertinti produkto kokybę, tačiau dar nepakankamai žinoma apie polifenolių ir antocianinų biologinį prieinamumą *in vivo* vartojant vynuoges ir jų produktus. Iki šiol skelbti duomenys dažnai yra prieštaringi ir sunkiai palyginami dėl tyrimų metodinių skirtumų. Lygiagrečiai turėtų būti tiriamas polifenolinių junginių antioksidacinis aktyvumas serume po vynuogių ir jų produktų pavartojimo, ir tuo nustatoma jų vertė.

Išvados

Atliktų tyrimų duomenimis, raudonieji vynuogių

vynai turi santykinai daugiau polifenolių ir antocianinų palyginus su kitais tirtais objektais, o jų antioksidacinis aktyvumas yra didesnis.

Antioksidacinio aktyvumo duomenys tiesiogiai koreliavo su nustatytu polifenolių kiekiu.

Antocianinų kiekis jauname vyne buvo didesnis negu išlaikytame. Tai leidžia daryti prielaidą, kad laikymo metu dalis antocianinų dalyvauja produkte vykstančiuose procesuose ir virsta kitais junginiais, kurie pasižymi mažesniu antioksidaciniu aktyvumu arba jo apskritai nenustatoma.

Išsamus vynuogių vynu įvertinimas gali būti atskiras tyrimas, kurio metu būtų analizuojama produkto polifenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties bei jo antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo anksčiau išvardytų faktorių. Atliekant kitus tyrimus, būtina įvertinti polifenolinių junginių pasisavinimą iš vynuogių ir jų produktų, nustatyti pasisavintų polifenolių įtaką serumo antioksidaciniam aktyvumui.

Polyphenols and anthocyanins in fruits, grapes juices and wines, and evaluation of their antioxidant activity

Vitalis Briedis, Vitalija Povilaitytė, Saulius Kazlauskas¹, Petras Rimantas Venskutonis²

Department of Drug Technology and Pharmaceutical Management, Kaunas University of Medicine,

¹Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Kaunas University of Medicine,

²Department of Food Technology, Kaunas University of Technology, Lithuania

Key words: grapes, polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity, chromatography.

Summary. The objective of this study was to produce grape (*Vitis vinifera L.*) extracts using efficient solvents and to compare antioxidant activity, polyphenol and anthocyanin content and composition in the produced extracts to the same characteristics of grape juices and wines. Methanolic and aqueous extracts of red and blue grapes were produced. Total amounts of polyphenols and anthocyanins in grape extracts, juices and wines were determined. Total polyphenols were spectrophotometrically determined measuring absorption after using *Folin-Ciocalteu* reagent. Total anthocyanins were determined by pH-differential method. Antioxidant activity of all those grape products was analyzed in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) and 2,2'-azine-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical binding model systems. The results obtained by both antioxidant activity determination methods were comparable and permitted to evaluate the ability to inactivate free radicals. Individual polyphenols and anthocyanins were separated by high performance liquid chromatography. Compounds of malvidine, delphinidine and petunidine were identified as main anthocyanins present in grape products demonstrating antioxidant activity. The determined amounts of polyphenols and anthocyanins in red wines were relatively higher than in other investigated objects. The wines possessed the highest antioxidant activity, which correlated with the determined amounts of total polyphenols. Correlation between total anthocyanins contents and antioxidant activity of appropriate objects was not established.

Correspondence to V. Briedis, Department of Drug Technology and Pharmaceutical Management, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 3000 Kaunas, Lithuania

Literatūra

1. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001;306:1-17.
2. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54:176-186.
3. Tomera JF. Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. *Trends Food Sci Technol* 1999;10:129-38.
4. Durak I, Koseoglu MH, Kacmaz M, Buyukkocak S, Cimen B, Ozturk S. Black grape enhances plasma antioxidant potential. *Nutr Res* 1999;19:973-7.
5. Frankel EN, Meyer AS. Antioxidants in grapes and grape juices and their potential health effects. *Pharm Biology* 1998;36S:14-20.
6. Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res* 2000;47:419-25.
7. Netzel M, Strass G, Bitsch I, Konitz R, Christmann M, Bitsch R. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. *J Food Engin* 2003;56:223-8.
8. Mondello L, Cotroneo A, Errante G, Dugo G, Dugo P. Determination of anthocyanins in blood orange juices by HPLC analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2000;23:191-5.
9. Revilla E, Garcia-Beneytez E, Cabello F, Martin-Ortega G, Ryan J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J Chromatogr A* 2001;915:53-60.
10. Wrolstad RE. Color and pigment analyses in fruit products. Station Bulletin 624. Oregon State University, USA; 1993.
11. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss U Technol* 1995;28:25-30.
12. Povilaitytė V, Cuvelier ME, Berset C. Antioxidant properties of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica L.*) *J Food Lipids* 2001;8:45-64.
13. Van Golde PHM, Sloots LM, Vermeulen WP, Wielders JPM, Hart HCh, Bouma BN, et al. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis* 1999;147:365-70.

Straipsnis gautas 2003 09 15, priimtas 2003 10 10

Received 15 September 2003, accepted 10 October 2003