

УДК 663.253.34:547.973.9

## **НОВЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МАЛЬВИДИН-3,5-ДИГЛИКОЗИДА В ВИНОГРАДЕ И ВИНЕ**

© 2005 Е.А. Слатья, Т.А. Жиликова, Н.И. Аристова, И.Ф. Ткачёв, Д.С. Пилипенко

Предложен метод полуколичественной оценки содержания мальвидин-3,5-дигликозида в кожце винограда, сусле и молодом вине, основанный на разделении пигментов методом тонкослойной хроматографии. Метод предназначен для предварительной проверки вин, предназначенных для экспорта, и позволяет выявлять продукты, полученные из гибридных сортов винограда и винограда, не принадлежащего к виду *Vitis vinifera*. Предложенный метод может быть использован для проведения мониторинга виноградников и оценки виноматериалов с целью выявления гибридных сортов винограда.

### **Введение**

Директивами Европейского Союза (ЕС № 1493/1999, Статья 19 и ЕС № 883/2001, Статья 21) введено ограничение на импорт в страны Европейского Союза красных виноградных вин, произведенных из винограда, полученного межвидовым скрещиванием или не принадлежащих к виду *Vitis vinifera* [1]. Специфическим маркером межвидовых гибридов является пигмент темноокрашенного винограда – мальвидин-3,5-дигликозид (МДГ). Концентрация этого пигмента в экспортируемом вине не должна превышать 15 мг/дм<sup>3</sup>. Мальвидин-3,5-дигликозид является веществом, характерным для американских видов рода *Vitis* и их гибридов. Гибридные сорта винограда – такие, например, как «Изабелла», «Лидия» и «Молдова», широко культивируются в Украине, Молдавии и на юге России благодаря их устойчивости к филлоксеру и стрессовым факторам окружающей среды.

Пигменты винограда относятся к группе антоциановых гликозидов. В составе пигментов европейских сортов винограда (*Vitis vinifera*) содержатся исключительно моногликозиды по положению 3 антоцианового ядра и их формы, ацилированные уксусной или п-кумаровой кислотой по положению 6' углеводного остатка. В отличие от европейских сортов, в составе пигментов винограда американских видов и гибридов американских видов с европейскими сортами содержатся еще и дигликозиды по положениям 3 и 5 антоцианового ядра, а также их ацилированные производные (Рисунок 1).

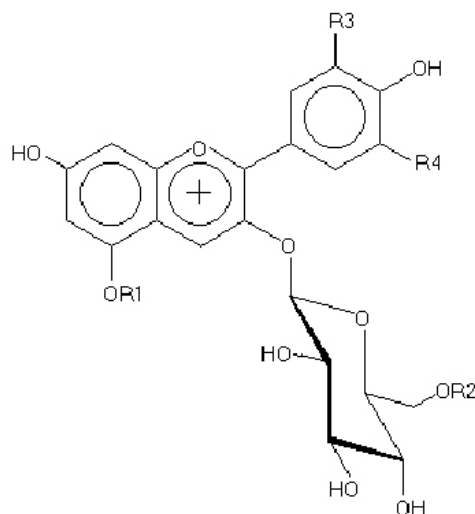
Сведения о возможном негативном (тератогенном) влиянии на здоровье человека продуктов из гибридных сортов винограда, противоречивы [2]. Сам мальвидин-3,5-дигликозид является распространенным в природе пигментом ягод и плодов и, по данным авторов [3], не оказывает вредного воздействия.

Для определения содержания мальвидин-3,5-дигликозида в красных винах используется ряд методов, таких как флуоресцентный анализ и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Последний является наиболее точным, но оба метода требуют дорогостоящих оборудования и материалов [4,5]. Для определения соотношения компонентов пигментного комплекса вин традиционной является бумажная хроматография в сочетании со спектрофотометрией [6], не идентифицирующие МДГ.

Современные винодельческие предприятия на сегодняшний день ориентированы не только на внутренний, но и на мировой рынок, в связи с чем остро стоит вопрос оценки качества заложенных виноградников на основе критериев ЕС [1]. Обладая простым и доступным методом обнаружения и количественной оценки содержания мальвидин-3,5-дигликозида в винограде, виноделы будут иметь возможность регулировать процессы мацерации мезги, избегая экстракции дигликозидов в виноматериал. Метод необходим также для предварительной экспертной оценки вин, направляемых на экспорт.

Обычно на этапе предварительной оценки содержания компонентов в пищевых продуктах [7] применяется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), благодаря его экспрессности, доступности и относительно невысокой стоимости расходных материалов. Целью настоящей работы явилась разработка на основе ТСХ дешевого и быстрого метода обнаружения и определения МДГ в материалах виноделия (свежей кожце винограда, суслах и молодых красных винах).

Современные высокоэффективные хроматографические пластины позволяют добиваться хорошего разделения за 10-15 минут, при использовании таких пластин длиной 250 мм достигается разделение на индивидуальные компоненты.



Название вещества	R1	R2	R3	R4
Мальвидин-3-гликозид	ОН	Н	ОМе	ОМе
Мальвидин-3-гликозид-6'-ацетат	ОН	Ас	ОМе	ОМе
Мальвидин-3,5-дигликозид	Glu	Н	ОМе	ОМе
Дельфинидин-3-гликозид	ОН	Н	ОН	ОН
Дельфинидин-3-гликозид-6'-ацетат	ОН	Ас	ОН	ОН
Пеонидин-3-гликозид	ОН	Н	ОМе	ОН
Цианидин-3-гликозид	ОН	Н	ОН	Н
Петунидин-3-гликозид	ОН	Н	ОМе	Н

**Рис. 1.** Основные компоненты антоциановых пигментов красного вина.

Впервые для пигментов винограда и вина нами предложен способ полуколичественной оценки содержания компонентов по размерам и интенсивности пятен. Использование предложенного подхода в сочетании с денситометрией ТСХ-хроматограмм позволяет получать результаты, точность которых приближается к таковой при ВЭЖХ анализе.

### Материалы и методики

Исследования проводили на винограде технической зрелости урожая 2003 г., собранном в октябре на коллекционном участке предгорного опытного хозяйства Института винограда и вина «Магарач» в с. Вилино Бахчисарайского района АР Крым.

Для анализа винограда отбирали 15-50 ягод технической зрелости, вручную отделяли кожицу от мякоти и семян, отжимали кожицу между листами фильтровальной бумаги для удаления сока. Навеску кожицы заливали в отношении 1/1 по массе раствором с объемной долей этанола 40% и концентрированной хлороводородной кислоты 2%. Мацерацию проводили в течение 7 суток в темном месте при температуре 8-15°C. Экстракт отжимали от кожицы и фильтровали сначала через марлю, а затем – на фильтре Шотта под вакуумом.

Сусло и вино отбирали в количестве 5 см<sup>3</sup>. Вино концентрировали под вакуумом до ¾ исходного объема, довели раствором 2 % хлороводородной кислоты до исходного объема и фильтровали образец. Сумму антоциановых пигментов извлекали методом твердофазной экстракции на картридже с обращеннофазовым сорбентом С18. Картридж предварительно промывали 2 см<sup>3</sup> метанола и 2 см<sup>3</sup> раствора 0.01 моль/л хлороводородной кислоты. Подготовленную пробу (1-5 см<sup>3</sup> в зависимости от содержания красящих веществ) прокачивали через картридж, а затем прокачивали 2 см<sup>3</sup> раствора 0.01 моль/л хлороводородной кислоты для отделения сахаров

и кислот. Сумму антоциановых пигментов элюировали 2 см<sup>3</sup> метанола, содержащего 2 % хлороводородной кислоты, при этом собирали 1 см<sup>3</sup> интенсивно окрашенного элюата.

Общее содержание пигментов в пересчете на мальвидин-3-моногликозид определяли спектрофотометрически [6]. Пробу вина или сусле объемом 1.2 см<sup>3</sup> разбавляли в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> раствором с объемной долей этанола 40% и концентрированной хлороводородной кислоты 2%. Экстракт кожицы брали в количестве 0.1 см<sup>3</sup> и разбавляли тем же раствором до 100 см<sup>3</sup>. Оптическую плотность раствора измеряли в кювете толщиной 10 мм на спектрофотометре КФК-3 при длине волны 530 нм относительно холостой пробы. В качестве холостой пробы использовали раствор этанола. Массовую концентрацию пигментов в сусле и вине рассчитывали по формуле:

$$C_1 = K_1 \cdot D, \quad (1)$$

где  $C_1$  – массовая концентрация пигментов в сусле и вине в пересчете на моногликозид мальвидина, (мг/дм<sup>3</sup>);  $D$  – оптическая плотность раствора,  $K_1$  – пересчетный коэффициент, равный 1056.7 [6].

Для расчета массовой доли пигментов в сырой кожице винограда использовали формулу:

$$C_2 = K_2 \cdot D, \quad (2)$$

где  $C_2$  – массовая доля пигментов в сырой кожице в пересчете на моногликозид мальвидина, (мг/кг),  $D$  – оптическая плотность раствора,  $K_2$  – пересчетный коэффициент;  $K_2 = 12 \times 2 \times K_1 = 25360.8$ .

В методе ТСХ использовали пластины Silufol UV256 или Sorbfil размером 50×150 мм.

Определение методом ВЭЖХ выполняли на жидкостном хроматографе «Миллихром-4». Для разделения пигментов использовали колонку Nucleosil C18 размером 100.0×2.0 мм, сорбент с диаметром частиц 5 мкм и размером пор 180 Å. Разделение проводили, используя многослойный ступенчатый градиент ацетонитрила в 10% растворе муравьиной кислоты, при скорости потока подвижной фазы 30 мкл/мин и детектировании при длине волны 520 нм. Содержание мальвидин-3,5-дигликозида определяли по площади его пика. Для градуировки использовали растворы мальвидин-3,5-дигликозида, который был выделен из кожицы *Vitis cinerea* и очищен с использованием препаративной жидкостной хроматографии [8].

Разделение суммы антоциановых пигментов и определение мальвидин-3,5-дигликозида методом тонкослойной хроматографии выполняли на пластинах Silufol UV256 или Sorbfil в следующих условиях: расстояние между пробами 1 см, стартовая линия на высоте 1 см от нижнего края пластины. Пробы объемом 5 мкл наносили с помощью микрошприца вместимостью 10 мкл или стеклянного капилляра. После достижения фронтом растворителя верхнего края пластины ее сушили в вытяжном шкафу теплым воздухом в течение 1 мин.

## Результаты и обсуждение

Для анализа пигментов винограда и вина методом тонкослойной хроматографии нами подобраны наиболее подходящие составы элюентов. В качестве элюентов для ТСХ были испытаны две системы растворителей:

1) изоамиловый спирт : уксусная кислота : вода : хлороводородная кислота в соотношении объемов 4:15:1:1;

2) этилацетат : муравьиная кислота : вода в соотношении объемов 3:1:1.

Хроматографическую систему № 1 готовили в два приема: смешивали 4 части изоамилового спирта, 15 частей ледяной уксусной кислоты и 1 часть дистиллированной воды, смесь оставляли для достижения равновесия на 24 часа при комнатной температуре. Для проведения разделения непосредственно перед использованием к полученному раствору прибавляли концентрированную хлороводородную кислоту в соотношении 1/20 по объему.

Хроматографическая система №2 готовилась непосредственно перед анализом смешиванием 3 частей этилацетата, 1 части дистиллированной воды и 1 части муравьиной кислоты.

Обе системы показали аналогичные результаты разделения. На рисунке 2 приведена хроматограмма, полученная с применением системы №1. Обработка хроматограммы показывает, что предложенный вариант метода ТСХ позволяет эффективно разделить основные группы антоциановых пигментов: дигликозиды ( $R_f=0.25\pm 0.05$ ); моногликозиды ( $R_f=0.45\pm 0.05$ ) и 6'-ацилированные моногликозиды ( $R_f=0.60\pm 0.05$ ). Увеличение высоты пробега фронта раствори-

теля приводит к расширению групповых пятен пигментов и разделению основных веществ. Так, в пределах группового пятна антоциановых моногликозидов мальвидин-3-моногликозид имеет  $R_f=0.45$ , а дельфинидин-3-моногликозид –  $R_f=0.40$ .

Пятна обводили простым карандашом сразу после просушивания и оценивали интенсивность их окраски при дневном освещении. Полуколичественную оценку проводили следующим образом: самое большое пятно принимали за «3», остальные пятна оценивали по четырехбальной шкале: «3» - пятно, сопоставимое по размеру и интенсивности, «2» и «1» - пятна, размер и интенсивность окраски которых составляют 2/3 или 1/3 от размера и интенсивности окраски самого большого пятна, «0» – пятно отсутствует или представлено следовыми количествами вещества.

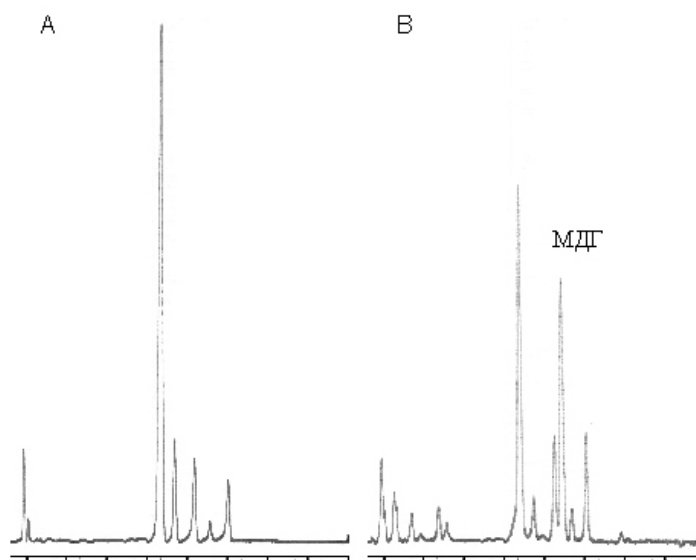
Расчет массовой концентрации мальвидин-3,5-дигликозида в сусле и вине ( $C_{МДГ}$ , мг/дм<sup>3</sup>) проводили по формуле:

$$C_{МДГ} = K_3 \cdot C_1 \cdot B_{ДГ} / (B_{ДГ} + B_{МГ} + B_{АГ}), \quad (3)$$

где  $C_1$  – массовая концентрация пигментов в сусле и вине (мг/дм<sup>3</sup>),  $B_{ДГ}$  – балл, присвоенный пятну суммы антоциановых дигликозидов ( $R_f=0.25$ );  $B_{МГ}$  – балл, присвоенный пятну моногликозидов ( $R_f=0.45$ ) и  $B_{АГ}$  – балл, присвоенный пятну 6'-ацелированных моногликозидов ( $R_f=0.60$ ),  $K_3$  – коэффициент пересчета на мальвидин-3,5-дигликозид, который соответствует отношению удельных оптических плотностей растворов мальвидин-3,5-дигликозида и мальвидин-3-моногликозида и равен 1.33.



**Рис. 2.** Результат ТСХ анализа экстрактов свежей кожицы винограда: А – Каберне Совиньон; В – Молдова; С – Виллар Нуар



**Рис. 3.** ВЭЖХ хроматограммы экстрактов свежей кожицы винограда: А – Каберне Совиньон; В – Молдова

В большинстве исследованных нами гибридных сортов винограда (*V. vinifera* x *labrusca*), содержащих антоциановые дигликозиды, основным пигментом этой группы, по данным ВЭЖХ, оказался мальвидин-3,5-дигликозид, который сопровождался минорными количествами дельфинидин-3,5-дигликозида. Остальные антоциановые дигликозиды содержались в следовых количествах (Рисунок 3). Лишь у некоторых сортов (например, Конкорд 840) и американского вида винограда (*V. rotundifolia*) состав дигликозидов представлен иным распределением: основной компонент – дельфинидин-3,5-дигликозид. На тонкослойных хроматограммах после подсушивания пятно дельфинидин-3,5-дигликозида приобретает сиренево-синюю окраску, в отличие от малиновой окраски пятна мальвидин-3,5-дигликозида.

В таблице 1 представлены результаты определения содержания мальвидин-3,5-дигликозида в кожице винограда с помощью разработанной методики ТСХ- разделения и метода ВЭЖХ.

Расхождение между результатами анализа по данным двум методикам не превышает 30 %, что сравнимо с относительной погрешностью методики ТСХ (20-40%).

**Таблица 1.** Результаты определения массовой доли мальвидин-3,5-дигликозида в свежей коже винограда методами ТСХ и ВЭЖХ.

Сорт винограда	Мас. доля пигментов, 10 <sup>3</sup> мг/кг	Мас. доля МДГ по ТСХ, 10 <sup>3</sup> мг/кг	Мас. доля МДГ по ВЭЖХ, 10 <sup>3</sup> мг/кг	Относительное расхождение, %
Каберне Совиньон	2.61±0.17	0	0	0
Молдова	3.7±0.7	1.6±0.3	1.3±0.2	20
Голубок	15±3	7.5±1.1	6.6±0.4	13
Виллар Нуар	3.2±0.6	3.2±0.6	2.6±0.3	18
Изабелла	1.9±0.4	0.50±0.10	0.38±0.06	29

Состав суммы пигментов красных вин представлен не только природными антоцианами винограда, но и продуктами их окислительных превращений, называемыми «полимерными пигментами». Содержание полимерных пигментов в вине увеличивается в процессе выдержки и старения. Их вклад в окраску вин может составлять более 70%, например, в красных винах типа кагора и портвейна. При проведении анализа методом ТСХ полимерные пигменты ухудшают эффективность разделения пятен. В связи с этим метод полуколичественного определения мальвидин-3,5-дигликозида с помощью ТСХ может быть рекомендован только для молодых красных вин.

### Выводы

Предложен метод полуколичественной оценки содержания мальвидин-3,5-дигликозида в коже винограда, сусле и молодом вине, основанный на разделении пигментов методом ТСХ после пробоподготовки, включающей очистку и концентрирование пигментов. Подобрано два состава элюентов для проведения ТСХ анализа на пластинках с силикагелем.

Показана хорошая согласованность результатов с методом ВЭЖХ. Предложенный метод может быть использован непосредственно в условиях заводской лаборатории для проведения мониторинга виноградников с целью выявления гибридных сортов винограда, а также для оценки виноматериалов и винограда, поступающего на переработку, включающую этап мацерации мезги. Экспрессность метода позволяет применять его для предварительной проверки вин, предназначенных для экспорта, и отбора образцов, в которых следует определять МДГ более точным методом ВЭЖХ.

### Список литературы:

1. Норми та правила ринку вина Європейського Союзу (директиви та постанови). Київ: СМП "АВЕРС", 2003.- 560 с.
2. Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н. Биологически или экологически чистое вино//Виноградарство и виноделие СССР, 1991, № 2, с. 36-40.
3. Stoewsand G.S., Robinson W.B. Malnutrition: cause of "toxic" response of chics FED varietal grape juices. Am. J. Enol. and Viticul. – 1972. – Vol. 23, No 2. – P. 54-57.
4. Garcia-Beneytez E., Cabello F., Revilla E. Analysis of Grape and Wine Anthocyanins by HPLC-MS // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51. – P. 5622-5629.
5. Hebrero E., Garcia-Rodriguez C., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. Analysis of Anthocyanins by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Spectroscopy in a Hybrid Grape Variety (*Vitis vinifera* X *Vitis berlandieri* 41B) // Am. J. Enol. Vitic. – 1989. – Vol. 40, No. 4. – P. 283-291.
6. Валуйко Г.Г. Биохимия и технология красных вин. М.:Пищевая промышленность, 1973.- 256 с.
7. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов//Под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. – М.: Брандес, Медицина, 1998.-340 с.

8. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986.- 288 с.

*Поступила в редакцию 4 июля 2005 г.*

Kharkov University Bulletin. 2005. №669. Chemical Series. Issue 13(36). E.A.Slastya, T.A.Zhilyakova, N.I.Aristova, I.F.Tkachyov, D.S.Pilipenko. New rapid method of semi-quantitative determination of malvidin-3,5-diglucoside in grape and wine.

A rapid method of semi-quantitative determination of malvidin-3,5-diglucoside in grape skin, musts and young red wines was developed. The method is based on the separation of pigments in a thin layer of silica gel. The method can be used for the custom examination of red wines to be exported. During wine certification, the method allows to detect the presence of products characteristic for grape varieties of hybrid origin or different from *Vitis vinifera*. The method can be used for examination of vineyards to reveal hybrid varieties of grape.