

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В НЕКОТОРЫХ КРАСНЫХ СУХИХ ВИНАХ АЗЕРБАЙДЖАНА

Р.И. Агаларов^{1*}, Р.А. Гасанов^{1,2}

¹Лаборатория биотехнологии, Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан

²Кафедра биофизики и молекулярной биологии, Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан

ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND PHENOLIC CONTENTS OF SOME AZERBAIJAN RED DRY WINES

R.I. Agalarov, R.A. Gasanov (Laboratory of Biotechnology and Department of Biophysics and Molecular Biology, Baku State University, Baku, Azerbaijan)

Резюме. Антиоксидантная активность (АО) и содержания полифенольных компонентов в некоторых сухих красных винах произведенных в Азербайджане были исследованы при помощи спектрофотометрии. Антиоксидантная активность вин анализируемых методом гашения свободного радикала DPPH имела положительную корреляцию с общим содержанием фенолов (коэффициент Пирсона $r = -0,87$) и отрицательную корреляцию с концентрацией антоцианов. Установлено, что общая концентрация полифенолов варьируется от 2,032 до 3,53 г/л эквивалента галловой кислоты (GAE). Сравнение образцов на основе их индивидуальных фенольных компонентов и антиоксидантной активности показало некоторые различия между винами. Изучение корреляции выявило три типа вин, которые имели разные периоды старения, что свидетельствует о снижении концентрации антоцианов.

Abstract. The varieties of red wines type were analyzed for antioxidant activity (AO) and a range of phenolic component contents using spectrophotometric technique. The antioxidant activity of the wines in DPPH assays had positive correlation with total phenols content (Pearson coefficient $r = -0.87$) and negative correlation with anthocyanins concentration. The total polyphenol concentration was found to vary from 2.032 to 3.53 g/L of gallic acid equivalent (GAE). Comparisons of the set of samples based on their individual phenolic components and antioxidant activities showed some differences between the different varieties. Exploring the correlation revealed three types of wines that had different aging periods, which indicates a decrease in the concentration of anthocyanins.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, DPPH, вино, содержание фенолов, антоцианы.

Keywords: antioxidant activity, DPPH, wine, phenolic content, anthocyanins.

*Р.И. Агаларов, к.б.н., Лаборатория биотехнологии, Бакинский государственный университет, ул. З.Халилова, 23, Баку, Азербайджан, e-mail: ra38hasan@gmail.com remsnabcenter@gmail.com

Received: 25 September 2019;

Accepted: 23 October 2019;

Published: 12 December 2019.

1. Введение

Свободные радикалы естественным образом образуются в аэробных условиях и являются частью нормальных физиологических процессов, однако избыток свободных радикалов может повредить все клеточные макромолекулы,

включая белки, углеводы, липиды и нуклеиновые кислоты (Bellomo, 1991). Антиоксиданты - это вещества, которые действуют как гасители свободных радикалов и ограничивают их влияние. Антиоксиданты действуют как восстановители, в конечном итоге удаляя промежуточные радикалы и предотвращая дальнейшее окисление. Фрукты и овощи известны как источники богатые антиоксидантами, такими как ретинол (витамин А), аскорбиновая кислота (витамин С), α -токоферол (витамин Е), каротиноиды, флавоноиды, дубильные вещества и другие фенольные соединения (Rice-Evans, *et al.*, 1995; Duthie & Crozier, 2000; Stoclet *et al.*, 2004; Vinson *et al.*, 1995). Большой интерес к природным антиоксидантам возрос в последние годы из-за их предполагаемой безопасности и потенциальных пищевых и терапевтических эффектов (Lopez-Velez *et al.*, 2003).

Традиционно, ферментированный виноградный сок называется вином, и он также содержит соединения, которые действуют как антиоксиданты, и некоторые из них имеют фенольную природу. Фенольные соединения представляют собой важные вторичные метаболиты растений из кожицы винограда, семян и мякоти, которые экстрагируются в вино в процессе ферментации (LaTorre *et al.*, 2006). Они образуют группу вторичных метаболитов с различными химическими структурами и функциями, и вырабатываются во время физиологического роста растений, или в ответ на различные формы стресса окружающей среды (Lopez-Velez *et al.*, 2003). Принадлежат к группе фенольных соединений, антоцианы ответственны за цвет винограда и вина, в то же время антоцианы являются нестабильными соединениями и разлагаются под воздействием атмосферного кислорода и других окислителей (Mateus & Freitas, 2001), действующих как природные антиоксиданты. Фенольные соединения могут быть успешно использованы для оценки подлинности вина, так как они характерны для данного типа вина и могут предоставить информацию о его географическом происхождении (Andreu-Navarro *et al.*, 2011). Две группы флавоноидов, антоцианы и флаванолы, являются основными факторами определяющими качество красных вин. Полифенолы придают натуральным винам не только органолептические свойства, но также действуют как антиоксиданты, законсервированные в натуральной водно-спиртовой среде без доступа кислорода (Paixao *et al.*, 2007; Seruga *et al.*, 2011).

В представленной работе мы исследовали содержания полифенолов и антиоксидантной активности местных образцов вина и оценили соотношение антиоксидантных способностей с общим количеством фенолов и антоцианов.

2. Материалы и методы

Девять образцов красного вина были приобретены в магазинах в Баку (Азербайджан). Во процессе экспериментов образцы открывали, защищали от солнечного света и хранили при +4°C под вакуумом. Анализы проводились в течение нескольких дней. Каждый образец был проанализирован 3 раза. Образцы, которые мы использовали, представлены в таблице 1.

Антиоксидантную активность измеряли методом DPPH по методике Бранд-Уильямса (Brand-Williams *et al.*, 1995). Оптическое поглощение метанольного раствора DPPH (2,2 Дифенил-1-пикрилгидразил) при длине волны 518 нм доводили до 0,5, что соответствовало концентрации 40 мкМ. Изменения

оптического поглощения измеряли на максимуме пика $\lambda=518$ нм в течение 20 минут на UV-Vis спектрофотометре (Jenway 7305). Концентрации рассчитывали по калибровочной кривой в диапазоне от 1 до 10 мк М Тролокса. Все измерения проводились в кювете с оптическим путем 10 мм.

Таблица 1. Перечень образцов вин использованных в исследовании

Образец вина	Страна происхождения	Год выпуска	Содержание алкоголя	pH
Chateau Haut Brion Gand Cru Classe	Франция	2006	12-14%	3.78
Fireland Caspea Matrasa	Азербайджан	2013	12-14%	3.48
Badogoni Saperavi	Грузия	2014	12-14%	3.67
Gabala Red Dry	Азербайджан	2014	12-14%	3.75
Basar Kecer	Азербайджан	2014	10-12%	3.88
Gabala Semi Dry	Азербайджан	2014	12-14%	3.58
Savalan Merlot	Азербайджан	2013	12-13%	3.52
Savalan Syrah	Азербайджан	2013	12-14%	3.65

Общее содержание фенолов в экстрактах определяли по методике, описанной в (Singleton & Rossi, 1965). Дистиллированную воду (1,8 мл) добавляли к 0,2 мл каждого экстракта. Затем добавляли реагент Фолина-Чиокальтеу (0,2 мл) и пробирки энергично встряхивали. Через 3 минуты добавляли 0,4 мл раствора карбоната натрия (35% массы к объему) вместе с 1,4 мл дистиллированной воды. Образцы хорошо перемешивали и оставляли в темноте на 1 час. Поглощение измеряли при 725 нм, используя спектрофотометр UV-Vis, и результаты выражали в эквивалентах галловой кислоты GAE мг/мл, используя калибровочную кривую для галловой кислоты (0-0,2 мг/мл). Образцы дополнительно разбавляли, если измеренное значение поглощения было выше линейного диапазона стандартной кривой.

Концентрацию антоцианов в образцах измеряли с помощью протокола дифференциальной спектрофотометрии, описанного (Lee *et al.*, 2005). Вкратце, каждый образец вина был разделен на две равные части. Одну часть обрабатывали 0,1 н. HCl, доводя до pH 1, а вторую доводили до pH 4,5 с последующими измерениями поглощения при 510 нм и 700 нм. Разность поглощения ΔA рассчитывается по формуле (1)

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5} \quad (1)$$

где A_{510} - поглощение при 510 нм и A_{700} - поглощение при 700 нм. Концентрация антоциана рассчитана с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon=26900$ л \times моль⁻¹ \times см⁻¹. Полученные данные были обработаны с использованием программного пакета Origin Pro 9. Коэффициент Пирсона был получен использованием аппроксимации линейной функции к точкам данных, как показано ниже.

3. Результаты и обсуждение

Анализ антиоксидантной активности девяти образцов вина проводили с использованием метода ингибирования DPPH, как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены на рис.1. Красная пунктирная линия при 50% ингибирования DPPH соответствует 6,8 мкМ эквивалента синтетического витамина Е - Тролокса.

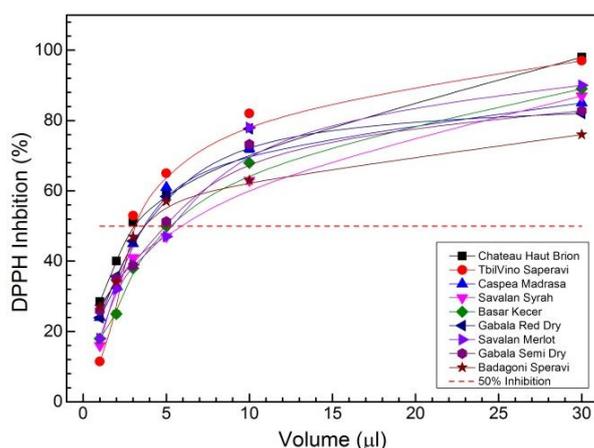


Рис.1. Зависимость ингибирования радикала DPPH от объема разных образцов вин. Пунктирная линия показывает 50% ингибирование (IC₅₀) для 6,8 мкМ эквивалента тролокса

Для лучшего понимания картины с антиоксидантной активностью и сравнения с винами других стран, мы использовали два образца вин полученных из Франции и Грузии. Chateau Haut Brion Grand Cru Classe имеет самую высокую антиоксидантную активность, и индекс 50% ингибирования IC₅₀ проявляется при объеме 2,8 мкл, следующие по антиоксидантной активности были вина Fireland Caspea Matrassa с IC₅₀ при 3,8 мкл. Badagoni Saperavi и Gabala Red Dry показали одинаковый IC₅₀ в 3,8 мкл. Следующие два вина из Габалинского района Basar Kecer и Gabala Red Semi Dry имеют IC₅₀ 5 мкл. Savalan Merlot и Savalan Syrah показывают IC₅₀ с 5,2 мкл и 5,8 мкл соответственно.

Общее содержание фенолов (TPC) и концентрации антоцианов (AC) в образцах вина представлены в таблице 2. Образцы вина в таблице расположены в порядке увеличения концентрации антоцианов. Концентрация антоцианов местных вин варьировались от 0,08648 до 0,0475 мг / мл.

Значения концентрации фенолов (TPC) для местных вин составляли от 2,038 до 2,6 г/л в эквиваленте галловой кислоты GAE. Мы сравнили наши результаты с данными из литературы, и они имеют близкие значения. Например, значения TPC, определенные методом Фолина-Чокальтеу для вин из разных стран, являются следующими: для турецких красных вин значения 1,8-3,4 г/л (Porgali and Buyuktuncel, E., 2012), для испанских красных вин 1,31-2,39 г/л (M.S.Fernandez-Pachonet al., 2004). Для греческих красных вин авторы (Kallithraka, S. et al., 2006) опубликовали значения 0,6-3,2 г/л., для сицилийских красных вин сообщенные значения 2,34-3,73 г/л (DiMajo *et al.*, 2008). Сообщенные значения 3,3-4,2 г/л для итальянских красных вин (Minussi *et al.*, 2003), для португальских красных вин найдены значения 1,7-1,9 г/л (Paixao *et al.*, 2007). Стаско и соавт. сообщенные значения 1,4-3,4 г/л для австрийских и словацких красных вин

(Stasko *et al.*, 2008). Сообщенные значения 1,2-3,2 г/л для хорватских красных вин (Seruga *et al.*, 2011). Лусена и соавт. сообщенные значения 3,2-5,9 г/л для бразильских красных вин (Lucena *et al.*, 2010). Ли и соавторами опубликовали значения 1,4-3,1 г/л для отдельных китайских красных вин (Li *et al.*, 2009).

Таблица 2. Концентрации антоцианов и фенолов в исследуемых образцах

Типа вина	Концентрация антоцианов (мг/мл)	Концентрация фенолов (g/l)
ChateauHautBrion	0,016	3,5394
FirelandCaspeaMadrasa	0,0475	2,61
BadogoniSaperavi	0,041	2,356
GabalaRedDry	0,03988	2,456
BasarKecer	0,062	2,2029
GabalaSemiDry	0,07899	2,0235
SavalanMerlot	0,091	2,13
SavalanSyrah	0,08648	2,0328

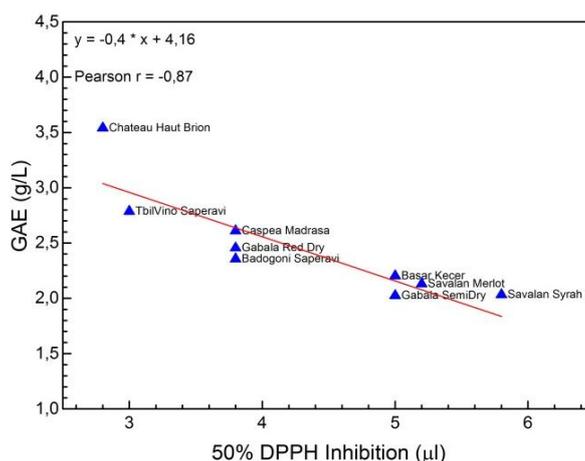


Рис. 2. Зависимость концентрации фенолов в GAE от 50% ингибирования активности DPPH (IC_{50}) образцов вин. Красная линия – аппроксимация линейной функцией.

На рис.2 представлен график зависимости общего содержания фенола в GAE от 50% активности ингибирования DPPH, выраженной в микролитрах действующего вина. Мы могли аппроксимировать данные линейной функцией $Y = -0,4 \times X + 4,16$ и найти достаточно сильную корреляцию между этими двумя параметрами с коэффициентом Пирсона $r = -0,87$. Другой анализ был проведен для установления корреляции между концентрацией антоцианов и антиоксидантной активностью исследуемых видов. Результаты, представленные на рис. 3, показывают корреляцию между концентрацией антоцианов и DPPH на 50% ингибирующей активности. Следует сказать, что с уменьшением концентрации антоцианов антиоксидантная активность возрастает. Корреляция описывается линейной функцией, а коэффициент Пирсона равен 0,95.

Мы наблюдаем наибольшую антиоксидантную активность для Chateau Haut Brion, используемого в качестве контрольного образца. Наиболее близкие

значения активности были показаны образцами Fireland Caspea Matrassa, Badagoni Saperavi и Gabala Red Dry. Другая группа образцов, в которую входят Басар Кечер, Gabala Semi Dry, Savalan Syrahi Savalan Merlot, имеет несколько иные значения, и располагаются отдельной группой на графиках корреляции. Эти результаты вполне ожидаемы и аналогичны данным, имеющимся в литературе. Исследователи также наблюдали увеличение антиоксидантной активности вина при увеличении концентрации общих фенолов (StratilP. et al., 2008). Концентрация фенольных соединений состоит из нескольких компонентов. Во-первых, это полифенольные соединения в самом винограде и, в частности, в косточках и кожуре. При отжиме виноградного сока они экстрагируются в виноградное сусло. Другим источником полифенолов является молочно-кислые *Lactobacteria*, которые в процессе ферментации виноградного сусла синтезируют лактоны, также влияющие на букет и вкус конечного продукта. Третий источник полифенолов – дубовая древесина. Согласно классической технологии, вина должны выдерживаться в течение некоторого времени в дубовых бочках, что приводит к вымыванию танина и лигнина. Было обнаружено, что вина, выдержанные в дубовых бочках, содержат характерные галловую, ванилиновую, эллаговую, синаповую кислоты, соответствующие им альдегиды и эфиры, которые образуются в процессе цепных реакций трансформации лигнина (DeL Alamo-Sanza & Nevares, 2019). Эти соединения так же вносят свой вклад в антиоксидантный эффект вина, который мы наблюдаем.

Однако в процессе анализа зависимости антиоксидантной активности от концентрации антоцианов мы обнаружили обратный эффект. С увеличением концентрации общих фенолов, концентрация антоцианов снижалась, и, по-видимому, это связано с временем выдержки в дубовых бочках. К сожалению, производители не предоставили информацию о времени выдержки на соответствующих этикетках вина. Также известно, что французские вина класса GrandCruе выдерживаются в дубовых бочках в течение года и более.

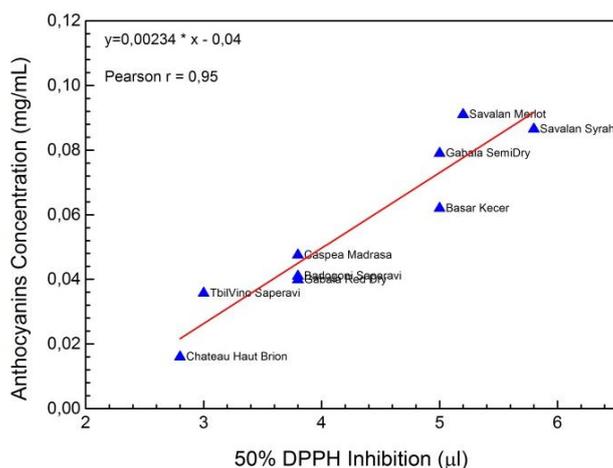


Рис. 3. Зависимость концентрации антоцианов вина от 50% ингибирования активности DPPH (IC_{50}) образцов вин. Красная линия – аппроксимация линейной функцией

Мы можем объяснить это тем, что антоцианы являются нестабильными соединениями на воздухе и медленно окисляются в процессе выдержки в бочках. Это объяснение подтверждается и тем фактом, что образец Chateau Haut Brion

урожая 2006 года выдерживался в дубовых бочках. Специфика технологии выдержки в бочках предполагает медленную диффузию воздуха через древесину дуба во внутренний объем, что приводит к окислению антоцианов винограда. Фактически, образец Chateau Haut Brion имел красно-коричневый цвет, который не был характерен для молодого вина имеющего рубинового красный цвет.

Традиционная классификация качества вина основывается на его цвете, запахе и вкусе, а не на содержании биологически активных соединений. Определяемые в настоящее время лабораторные характеристики, такие как концентрация этанола, органических кислот, сахаридов и сульфитов, в большей степени относятся к органолептическим параметрам вина. Но определения параметров ТРС и антиоксидантной активности указывают на влияние конкретного вина на здоровье и может быть использованы в качестве маркеров качества и степени позитивного воздействия на здоровье. В настоящее время исследователями используются различные методы оценки содержания фенольных соединений и антиоксидантной активности вин, и практически нет анализа сравнения значений, полученных разными методами. В нашей работе анализируя один и тот же образец различными методами, мы установили корреляции значений трех параметров вина. Значения, найденные с помощью методов определения общей фенольной и антиоксидантной активности (DPPH), сильно коррелируют друг с другом, а также, что немаловажно, с цветом вина. Слабая корреляция между содержанием общих фенолов/или антиоксидантной активности с интенсивностью окраски красных вин может указывать на применение искусственных красителей красного вина, смешивание белого и красного вина. Таким образом, мы можем использовать эти параметры как определенный тип стандартов для оценки качества вина.

Литература

- Andreu-Navarro, A., Russo, P., Aguilar-Caballos, M. P., Fernández-Romero, J. M., & Gómez-Hens, A. (2011). Usefulness of terbium-sensitised luminescence detection for the chemometric classification of wines by their content in phenolic compounds. *Food Chemistry*, 124(4), 1753-1759.
- Bellomo, G. (1991). Cell damage by oxygen free radicals. *Cytotechnology*, 5(1), 71-73.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., & Giammanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111(1), 45-49.
- Duthie, G., & Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology*, 11(1), 43-47.
- Fernández-Pachón, M.S., Villano, D., Garcia-Parrilla, M.C., & Troncoso, A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 113-118.
- Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E., & Lanaridis, P. (2006). Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 99(4), 784-793.
- La Torre, G. L., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicanò, T., & Dugo, G. (2006). Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chemistry*, 94(4), 640-650.

- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.
- Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food chemistry*, 112(2), 454-460.
- Lopez-Velez, M., Martinez-Martinez, F. & Del Valle-Ribes, C. (2003) The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 233-244.
- Lucena, A.P.S., Nascimento, R.J.B., Maciel, J.A.C., Tavares, J.X., Barbosa, J.M. & Oliveira, E.J. (2010) Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines., *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 30-36
- Del Alamo-Sanza, M., & Nevares, I. (2019). Wine Aging Technologies. *Wine Aging Technologies*, 1.
- Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G.M. and Duran, N. (2003). Phenolic Compounds and Total Antioxidant Potential of Commercial Wines. *Food Chemistry*, 82, 409-416.
- Mateus, N., & de Freitas, V. (2001). Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5217-5222.
- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J.C. and Camara, J.S. (2007) Relationship between Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Red, Rose and White Wines, *Food Chemistry*, 105, 204-214.
- Porgali, E., Buyuktuncel, E. (2012) Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of natively red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*, 45, 145-154.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.
- Šeruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208-1216.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Staško, A., Brezová, V., Mazúr, M., Čertík, M., Kaliňák, M., & Gescheidt, G. (2008). A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 2126-2135.
- Stoclet, J. C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M. H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., & Schini-Kerth, V. B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 299-313.
- Stratil, P., Kuban, V., & Fojtova, J. (2008). Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(4), 242-253.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., & Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2800-2802.