
ANALYSIS OF POLYPHENOLICS IN VITICULTURAL MATERIAL

Roblová V., Bittová M., Kubáň V.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 5, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: roblovavendula@gmail.com

ABSTRACT

Presented study is focused on the comparison of inherency and content of selected polyphenolic compounds in real samples of grape vine (*Vitis vinifera*) using capillary zone electrophoresis (CZE). The analyzed materials were milled grape seeds, stalks and leaves of two vine cultivars - Veltlínské zelené and Zweigeltrebe. In sample pretreatment, solid-phase extraction (SPE), supercritical fluid extraction (SFE) and/or liquid-liquid extraction (L-L) in dependence on the sample nature were used. The goal of this work was to compare the inherency and content of selected polyphenolic compounds in different plant samples of white and red vine cultivars.

Comparison of individual analysis indicated that the highest content of the polyphenolic compounds was in grape seeds and the lowest in leaves. In case of milled grape seeds, coarser milling resulted in higher amount of identified analytes while in analysis of fine grinding seeds we observed lower analyte representation. These observations could relate with SPE column efficiency and insufficient matrix removing. Also, higher amount of polyphenols was found in Zweigeltrebe samples, it means in the red vine cultivar than in white Veltlínské zelené cultivar. This fact was observed in both stalks and leaves samples. Finally, it was found that the amount of studied polyphenols in stalks and leaves also increased in relation with grape maturing.

Key words: polyphenolic compounds, capillary electrophoresis, viticultural materials

ÚVOD

Polyfenolické látky jsou přírodní látky obsažené v téměř každé vyšší rostlině, kde plní především funkci sekundárních metabolitů. Pro jednotlivé druhy rostlin se struktura a vlastnosti těchto látek liší. V posledních letech se tyto látky stávají středem pozornosti jak vědců z oborů medicíny, biologie, biochemie, ekologie, lesnictví nebo agronomie, tak odborníků na výživu. Již delší dobu je znám jejich pozitivní vliv na zdraví člověka, především v oblasti kardiovaskulárních onemocnění.

Vysoké množství polyfenolů je obsaženo ve slupkách vinných hroznů, z kterých se tyto látky dostávají do vína. Jedním z úkolů této práce byla analýza výskytu vybraných polyfenolických látek také v jiných částech rostliny vinné révy, například ve stoncích a listech. Pro měření byla použita kapilární zónová elektroforéza, která je spolu s vysoce účinnou kapalinou chromatografií (HPLC) jednou s nejužívanějších metod v analýze polyfenolických látek.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Z polyfenolických látek byly pro optimalizaci separačních podmínek, extrakčních postupů a následnou analýzu reálných vzorků byly vybrány tyto analyty: resveratrol, epikatechin, rutin, kyselinu ferulová, myricetin, kvercetin a kyselinu galová. Koncentrace připravených standardů v 50 % methanolu byla $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tab. 1. Označení vzorků z Vinařské oblasti Velké Bílovice, vinařství Skoupil.

stonky	charakteristika	listy	charakteristika	semínka	charakteristika
S1	Veltlínské zelené ^{a)}	L1	Veltlínské zelené ^{a)}	M1	Lehce drcená semínka
S2	Veltlínské zelené ^{b)}	L2	Veltlínské zelené ^{b)}	M2	Hrubě mletá semínka
S3	Veltlínské zelené ^{c)}	L3	Veltlínské zelené ^{c)}	M3	Jemněji mletá semínka
S4	Zweigeltrebe ^{a)}	L4	Zweigeltrebe ^{a)}	M4	Jemně mletá semínka
S5	Zweigeltrebe ^{b)}	L5	Zweigeltrebe ^{b)}	M5	Komerční moučka VITIS
S6	Zweigeltrebe ^{c)}	L6	Zweigeltrebe ^{c)}	-	

- a) Sběr I. Délka letorostů (stonků) 25 cm. b) Sběr II. po odkvětu, délka letorostů (stonků) 50 cm. c) Sběr III. před zaměkáním hroznů, délka letorostů (stonků) 50 až 70 cm.

Vzorky stonků a listů ze sběru I. až III. byly rozstříhány na kousky o délce 2-3 cm, vysušeny do konstantní hmotnosti a rozemlety nejprve nožovým a poté kladívkovým mlýnkem. Dále byl navážen 1 g pevného mletého vzorku a ten byl extrahován po dobu 2 hodin ve 20 ml 50% methanolu v ultrazvukové lázni při teplotě 30°C.

Dále byla provedena centrifugace po dobu 15 min při 5000 otáčkách/min, aby byla z roztoku oddělena pevná část vzorku. Získaný supernatan byl filtrován přes filtry s velikostí pórů 0,45 μm . Takto připravené vzorky byly zmrazeny a uchovávány při teplotě -10°C .

Pro odstranění matrice byla pro vzorky hroznových semínek vybrána extrakce kapalina – kapalina, 10 ml vzorku bylo 10 minut vytřepáváno s 10 ml diethyletheru. Poté byl oddělený extrakt odpařen do sucha a rozpuštěn v 1,5 ml 50% methanolu. Stonky byly zpracovány stejným postupem, ale objem vzorku a rozpouštědla použitý pro extrakci byl 5 ml. Na úpravu vzorků listů vinné révy byla použita SPE extrakce. Pro SPE extrakci byly použity kolonky Strata-X s 200 mg sorbentu C-18. Prvním krokem extrakce byla promytí kolonky 2 ml 100% MeOH a 2 ml destilované vody, poté byl nanesen 1,5 ml vzorku, který byl promyt 2 ml 5% MeOH. V posledním kroku byl vzorek eluován 100% MeOH. Po celou dobu extrakce byla průtoková rychlost 0,8 ml za minutu.

Jednotlivá měření byla prováděna na přístroji CE 3D Agilent Technologies. Byla použita nepokrytá křemenná kapilára efektivní délky 40 cm s průměrem 75 μm . Jako základní elektrolyt byl použit 17 mmol.l⁻¹ tetraboritan sodný s 10 % přídavkem methanolu. Kapilára byla termostatována na teplotu 25°C, separace probíhala při napětí 15 kV a vzorek byl dávkován tlakem 20 mbar po dobu 5 sekund.

VÝSLEDKY A DISKUZE

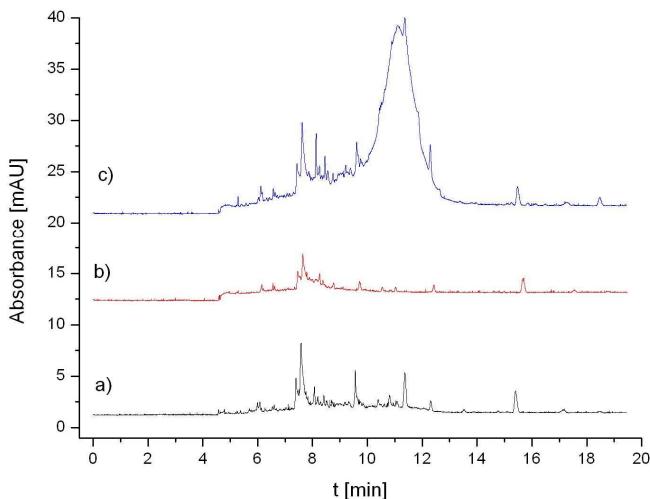
Jako první byly měřeny vzorky hroznových semínek. V této sadě vzorků se i přes nízký obsah, podařilo identifikovat největší množství hledaných analytů. Také bylo zjištěno, že jemnost mletí zpracování vzorků má vliv na zjištěné množství polyfenolických látek. V porovnání s jemně namletými vzorky bylo u vzorků drcených hroznových semínek možné identifikovat největší počet analytů. Důležitým krokem při analýze těchto vzorků byla kapalinová extrakce, díky níž byl odstraněn nežádoucí vliv matrice na separaci a usnadněno určení analytů viz *Graf 1*.

Identifikace analytů byla provedena přídavkem roztoků jednotlivých standardů ke vzorku. Dalšími kroky při identifikaci bylo porovnávání migračních časů separovaných analytů se standardy a porovnání absorpčních spekter separovaných analytů se spektry standardů. Největší množství analytů bylo identifikováno ve vzorku hroznových semínek M1 viz *Graf 2*. Identifikované analyty ve vzorcích hroznových semínek byly kvantifikovány metodou přídavku standardu. Koncentrace jednotlivých analytů v prvním přídavku byla 0,01 mg.ml⁻¹ a ve druhém 0,02 mg.ml⁻¹. Jejich obsah ve vzorcích hroznových semínek je uveden v *Tabulce 2*

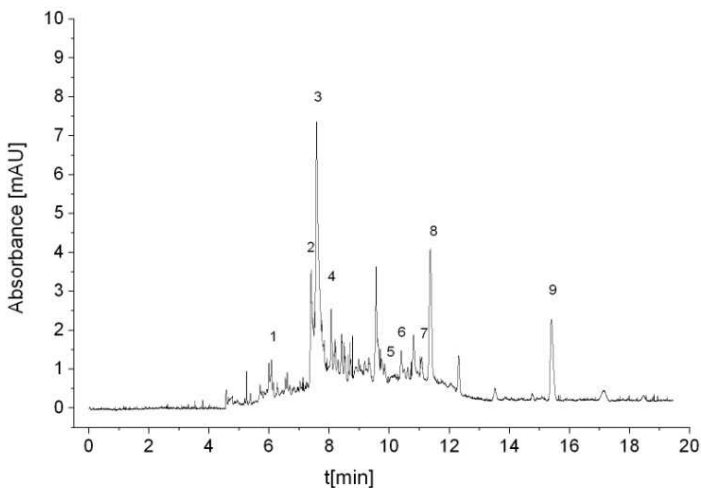
Tab. 2. Obsah jednotlivých analytů ve vzorcích hroznových semínek

analyt	M1	M2	M3	M4	M5
	μg/ml	μg/ml	μgm/l	μg/ml	μg/ml
tras-resveratrol	6,9	5,0	---	---	12,0
katechin epikatechin	78,6	114,5	60,5	43,4	27,6
rutin	N/A	12,5	46,7	15,1	N/A
kyselina ferulová	N/A	N/A	N/A	---	N/A
kyselina p-kumarová	N/A	---	---	---	---
myricetin	N/A	---	---	N/A	---
kvercetin	N/A	---	---	N/A	---
kaempferol	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
kyselina galová	14,9	90,1	16,5	15,2	12,7

N/A = analyt pod limitem kvantifikace, --- = neidentifikovaný analyt.

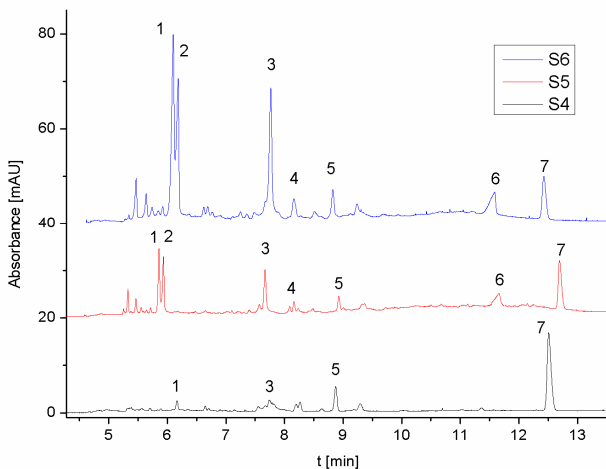


Graf 1. Porovnání metod na úpravu vzorků hroznových semínek: a) vzorek M1 po L-L extrakci, b) vzorek M1 po SPE extrakci, c) vzorek M1 bez úprav.



Graf 2. Identifikace analytů ve vzorku hroznových semínek M1, 1 resveratrol, 2 katechin, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kys. ferulová, 6 kys. p-kumarová, 7 myricetin, 8 kvercetin, 9 kys. galová.

Dalším bodem práce byla analýza stonků vinné révy. Stonky se rozdělují podle stáří na jednoleté, dvouleté nebo staré dřevo. Jednoleté dřevo patří k nedřevnatým zeleným částem rostliny, ale asi v polovině léta začíná i tato část dřevnatět. Na jednoletém dřevě vyrůstají v uzlech květy, z kterých se po odkvetení tvoří hrozny. Vzorky tvořily stonky bílé odrůdy Veltlínské zelené a stonky červené odrůdy Zweigeltrebe, které byly odebrány ve 3 fázích během růstu a zrání hroznů.

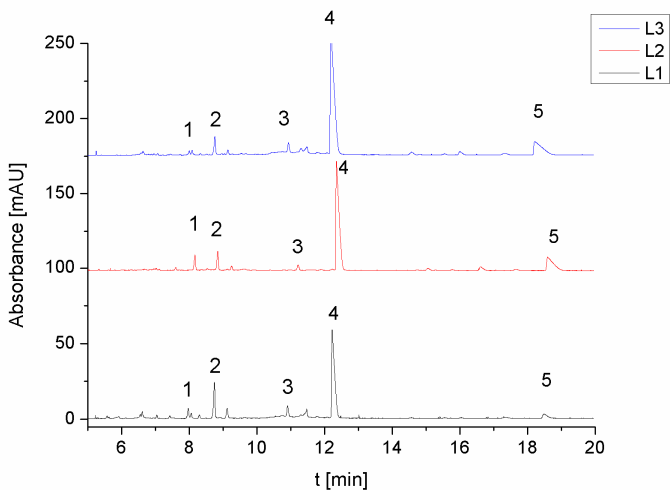


Graf 3. Porovnání elektroforeogramů vzorků stonků odrůdy Zweigeltrebe, 1 cis-resveratrol, 2 trans-resveratrol, 3 katechin/epikatechin, 4 rutin, 5 kys. ferulová, 6 kvercetin, 7 kvercetin glukuronid.

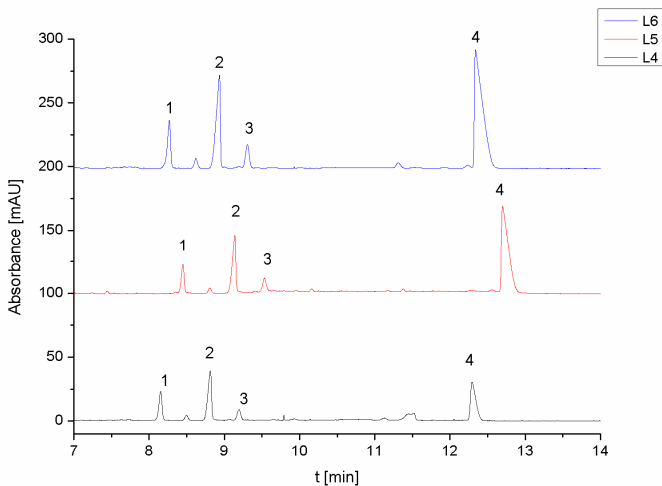
Za výše uvedených separačních podmínek se nepodařilo separovat katechin a epikatechin, proto jsou v uvedených elektroforeogramech uváděny jako jeden pík s migračním časem 7,76 minut. Ve vzorcích se podařilo identifikovat dalších šest zástupců polyfenolických látek. Majoritně zastoupenými analyty zde byly resveratrol, v obou svých formách, katechin/ epikatechin a analyt, který byl později pomocí LC-MS identifikován pravděpodobně jako kvercetin glukuronid.

Při porovnání vzorků ze sběrů během zrání hroznů, můžeme pozorovat nárůst počtu i obsahu hledaných analytů viz *Graf 3*. S prodlužující se délkou stonků a se zráním hroznů se zvyšoval i obsah polyfenolických látek ve vzorcích stonků vinné révy. U všech vzorků ze sady červené odrůdy Zweigeltrebe byl celkový obsah polyfenolů až dvakrát vyšší než u vzorků odrůdy Veltlínské zelené, kde byl majoritním analytem katechin/epikatechin a opět kvercetin glukuronid.

Poslední sadu vzorků tvořily listy vinné révy, u kterých bylo opět porovnáváno zastoupení a obsah polyfenolických látek mezi červenou a bílou odrůdou vinné révy, a také během zrání hroznů. Při porovnání elektroforeogramů byl zjištěn téměř stejný počet píků polyfenolických látek u obou odrůd viz *Graf 4*, 5. Při analýze vzorků listů vinné révy se opět nepodařilo separovat epikatechin a katechin, proto jsou tyto analyty uváděny, jako jeden pík s migračním časem 7,89 minut viz *Graf 4*. Dominantní složkou ve vzorcích listů byl analyt identifikovaný jako kvercetin glukuronid, který byl identifikovaný ve všech vzorcích listů u obou odrůd vinné révy.



Graf 4. Porovnání elektroforeogramů vzorků listů odrůdy Větlínské zelené, 1 katechin/epikatechin, 2 rutin, 3 kvercetin, 4 kvercetin glukuronid, 6 kyselina kávová.



Graf 5. Porovnání elektroforeogramů vzorků listů odrůdy Zweigeltrebe, 1 katechin/epikatechin, 2 rutin, 3 kyselina ferulová, 4 kvercetin glukuronid.

ZÁVĚR

První část práce byla věnována úpravě rostlinných vzorků. Bylo třeba najít postup zpracování pro jednotlivé sady vzorků tak, aby bylo možné identifikovat co největší množství hledaných analytů ve vzorcích. Vzorky byly připraveny extrakcí v ultrazvukové lázni a na jejich další úpravu byly použity tři rozdílné extrakční techniky, extrakce pevnou fází, extrakce kapalina- kapalina a nadkritická fluidní extrakce. U SFE extrakce, byly použity známé postupy extrakce používané při analýze polyfenolických látek v slupkách hroznových bobulí. Tyto postupy však nebyly pro vzorky vhodné, použitím SFE nebylo dosaženo očekávaných výsledků. Byla by nutná optimalizace parametrů SFE a proto metoda nebyla dále používána. Pro vzorky listů vinné révy byla nejlepší metodou pro úpravu SPE extrakce. U vzorků hroznových jader a stonků docházelo při SPE ke ztrátám analytů, pravděpodobně v důsledku zanášení extrakční kolonky maticí vzorku. Pro vzorky hroznových jader a stonků byla jako metoda pro úpravu vzorků vybrána extrakce kapalina-kapalina.

V druhé části práce bylo úkolem identifikovat co největší počet polyfenolických látek a porovnat jejich výskyt a obsah v jednotlivých sadách vzorků. Nejvíce analytů bylo identifikováno v sadě vzorků hroznových jader, byly zde zastoupeny jak jednoduché polyfenolické kyseliny tak zástupci skupiny flavonoidů. Ve vzorcích stonků a listů byl detekován pík s migračním časem 12,24 minut, který nebylo možné identifikovat přidávkem roztoku standardu. Tato látka byla identifikována metodou LC-MS pravděpodobně jako kvercetin glukuronid. Tato látka byla ve všech vzorcích listů v majoritním zastoupení. Dalšími analyty identifikovanými v listech byly rutin, kvercetin, katechin a epikatechin.

U vzorků stonků se výrazně lišilo zastoupení resveratrolu. Obsah resveratrolu ve vzorcích narůstal od S1 po S6, kde bylo jeho množství největší. Dále byl ve všech vzorcích stonků identifikován rutin, kyselina ferulová, kvercetin a kvercetin glukuronid. Kvantifikace vybraných polyfenolických látek ve vzorcích stonků a listů metodou přidavku standardu nebyla dosud provedena.

Při porovnání kvantitativních charakteristik píků stanovených analytů, ve vzorcích stonků a listů lze říct, že obsah polyfenolů je celkově vyšší ve vzorcích odrůdy červeného vína Zwiegltrebe než u vína bílého (Veltlínské zelené). Srovnáním výsledků lze také konstatovat, že se obsah polyfenolických látek během dozrávání hroznů zvyšuje nejen v hroznech, ale také v dalších částech vinné révy jakými jsou stonky a listy.

LITERATURA

PERES, R. G., et al. Multivariate optimization, validation, and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines. *J. Sep. Sci.* 2009, 32, s. 3822-3828.

DOBIÁŠOVÁ, Z.; PAZOUREK, J.; HAVEL, J. Simultaneous determination of trans-resveratrol and sorbic acid in wine by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 2002, 23, s. 263-267.

KUBÁŇ, P.; ŠTĚRBOVÁ, D.; KUBÁŇ, V. Separation of phenolic acids by capillary electrophoresis with indirect contactless conductometric detection. *Electrophoresis* . 2006, 27, s. 1368-1375.

MATĚJČEK, D., et al. Application of solid-phase extraction for determination of phenolic compounds in barrique wines. *Anal Bioanal Chem.* 2003, 377, s. 340-345.

CHAFER, A., et al. Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, s. 2050-2056.

DE RIJKE, E., et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr A.* 2006, 1112, s. 31-63.

NICOLAOU, I. N.; KAPNISSI-CHRISTODOULOU, C. P. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis : Determination of the most effective wine sample pre-treatment method. *Electrophoresis.* 2010, 31, s. 3895-3902.