

Kromatografske metode analize polifenola u vinima

KUI – 6/2009
Prispjelo 21. srpnja 2008.
Prihvaćeno 3. prosinca 2008.

V. Rastija^a i M. Medić-Šarić^b

^a Katedra za kemiju i biokemiju, Poljoprivredni fakultet Osijek
Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,
Trg Svetog Trojstva 3, 31 000 Osijek, Hrvatska

^b Zavod za farmaceutsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu, Antuna Kovačića 1, 10 000, Zagreb

Vino je bogat izvor različitih skupina polifenola koje uključuju fenolne kiseline, flavonoide i trihidroksistilben – resveratrol. U posljednje vrijeme zanimanje za te supstancije potaknuto je brojnim dokazima o njihovim pozitivnim učincima na zdravlje čovjeka. Do sada su primjenjivane različite metode analize polifenola u vinu uključujući kromatografske, spektrofotometrijske i elektrokemijske metode. U ovom članku opisane su ukratko metode pripreme uzoraka i najnovija dostignuća u analizi polifenola u vinu, temeljnim kromatografskim metodama: tankoslojnom kromatografijom (TLC), tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) uz različite tehnike detekcije te plinskom kromatografijom (GC). Kao posebna tehnika spomenuta je i kapilarna elektroforeza, koja se odnedavno primjenjuje za analizu polifenola u vinu.

Ključne riječi: *Vino, polifenoli, analiza, kromatografske metode*

Uvod

Polifenoli predstavljaju skupinu molekula biljnog podrijetla, čiju strukturu čini aromatski prsten s jednom ili više hidrosilnih skupina. Uobičajena su sastavnica ljudske prehrane te se u različitim količinama nalaze u voću, povrću, vinu, voćnim sokovima, čaju i kavi.¹ Polifenoli iz kože, sjemenki i usploda crnog grožđa ekstrahiraju se u crno vino tijekom procesa vinifikacije. Sastav i količina pojedinih polifenola ovisi o sorti grožđa, klimatskim uvjetima, postupcima uzgoja vinove loze i primijenjenim metodama izrade vina.^{2–4}

Više je razloga za identifikaciju i određivanje polifenola u vinu. Oni utječu na nekoliko važnih osjetilnih karakteristika vina kao što su boja, aroma, gorčina i oporost, time izravno i na kvalitetu vina.⁵ Posljednjih desetak godina brojna istraživanja su pokazala da namirnice koje sadrže polifenole pozitivno utječu na zdravlje i to najvećim dijelom zbog antioksidacijskog učinka tih sastavnica.⁶ Vina, posebice crna, sadrže više masene koncentracije polifenolnih supstancija (od 1000 mg L⁻¹ do 1300 mg L⁻¹), koje pokazuju brojne biološke učinke. Mnoga istraživanja pokazala su kako antioksidacijsko djelovanje tih supstancija u vinu štiti od nastanka ateroskleroze i koronarnih bolesti, pa se smatra da redovita i umjerena konzumacija vina smanjuje mogućnost obolijevanja od tih bolesti.⁷ Osim toga dokazano je njihovo antikancerogeno, protuupalno i antimikrobno djelovanje.⁸ Navedeni razlozi bili su poticaj za razvoj brojnih metoda analize tih biološki aktivnih supstancija u vinima. U tu svrhu najčešće se rabe kromatografske metode analize kao što su tankoslojna kromatografija (TLC)⁹ i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).¹⁰ U novije vrijeme sve se više primjenjuju vezani sustavi tekućinske ili plinske kromatografije sa spektrometrijom masa, tekućinske kromatografije s nuklearnom magnetskom rezonancijom, kapilarna

elektroforeza^{11,12} te ciklička voltometrija koja omogućava brzu detekciju fenolnih antioksidansa kako u hrani tako i u fiziološkim sustavima poput krvi ili urina.^{13–15}

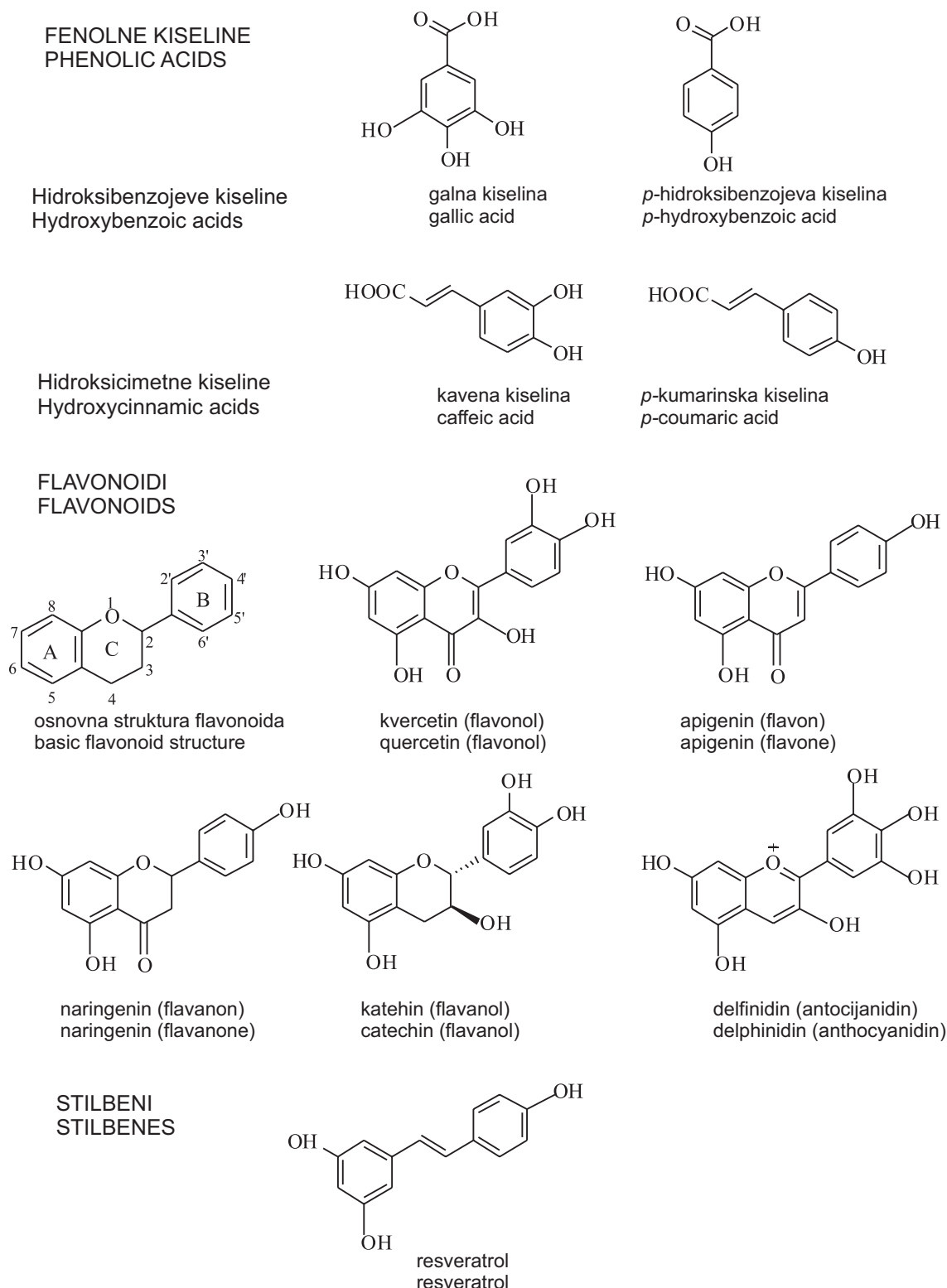
Podjela i kemijska struktura polifenola

Polifenole sačinjavaju: fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni (slika 1). Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida (flavonoidi bez vezanih molekula šećera) posjeduju strukturu tipa C₆–C₃–C₆, odnosno sadrže petnaest atoma ugljika raspoređenih tako da su dvije benzenske jezgre (prsten A i prsten B) povezane s propanskim lancem, koji može ili ne mora formirati treći prsten (prsten C).¹⁶ Najveće i najdetaljnije istražene skupine flavonoida su: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli (katehini) i njihovi polimeri proantocijanidini te antocijanidini. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu. Najpoznatiji predstavnik ove skupine polifenola je resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), koji postoji u dva stereoizomerna oblika: *cis*-(Z) i *trans*-(Z).

Metodologija kromatografske analize polifenola u vinima

Priprava uzoraka za analizu

Zbog izuzetno složenog polifenolnog sastava vina, u svrhu pojednostavljenja kromatograma, razvijene su brojne metode pripreme uzoraka za kromatografsku analizu polifenola u vinu iako u posljednje vrijeme primjena određenih tehni-



Slika 1 – Strukturne formule nekih polifenola prisutnih u vinu
Fig. 1 – Structural formulas of some wine polyphenols

ka detekcije omogućava direktno injektiranje uzoraka bez prethodne priprave, primjerice u sustav HPLC-a.

Ako je potrebna, priprava uzoraka vina podrazumijeva hidrolizu, dealkoholizaciju, filtraciju i ekstrakciju. Način priprave uzoraka vina za analizu polifenola ponajprije ovisi o

tehnikama analize, zatim o skupinama polifenola koje se žele analizirati i o opremljenosti laboratorija.

Budući da se flavonoidi u prirodi, pa tako i u vinu, pojavljuju u obliku *O*-glikozida s različitim šećerima u strukturi kao što su: glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinosa, ksiloza i ru-

tinoza, ove je spojeve u uzorcima nužno hidrolizirati. Postupkom hidrolize nastaju aglikoni, koji su prikladniji za kromatografsku analizu, a i komercijano su lakše dostupni kao standardi. U pripravi uzoraka vina za analizu najčešće se primjenjuje kiselna hidroliza koja najbolje odgovara uvjetima apsorpcije, metabolizma i bioraspoloživosti polifenola iako se uzorak može obraditi još i lužnatom i enzimskom hidrolizom.¹⁷ Dealkoholizacija vina prije postupka ekstrakcije primijenjena je prilikom analize proantocijanidina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti povezanom sa spektrometrijom masa (HPLC-MS).¹⁸

Uobičajene metode ekstrakcije polifenola iz vina su: ekstrakcija tekuće-tekuće (*engl.* liquid-liquid extraction) i ekstrakcija na čvrstoj fazi (*engl.* solid-phase extraction). Za ekstrakciju polifenola iz vina metodom tekuće-tekuće kao organska otapala najčešće se upotrebljavaju dietil-eter i etil-acetat.¹⁹ Za razliku od ekstrakcije metodom tekuće-tekuće, ekstrakcija na čvrstoj fazi ima niz prednosti jer je brža, zahtijeva manji obujam organskih otapala, omogućuje visoku koncentraciju analita u konačnom ekstraktu, a izbor čvrstih faza je velik. Kao čvrste faze najčešće se upotrebljavaju oktadecilsilicijev dioksid C₁₈ (u sustavu obrnutih faza) i ionsko-izmjenjivačka faza.^{20,21}

Postupci hidrolize, dealkoholizacije i ekstrakcije uzoraka vina mogu promijeniti sastav polifenola u vinu zbog oksidacije, hidrolize estera, etera i glikozidnih veza te izomerizacije. Upotreba HPLC-a s detektorom s nizom dioda (DAD) koji mjeri apsorpciju ultraljubičastog (UV) zračenja omogućava analizu polifenola iz vina bez prethodne pripreme uzorka.^{22,23}

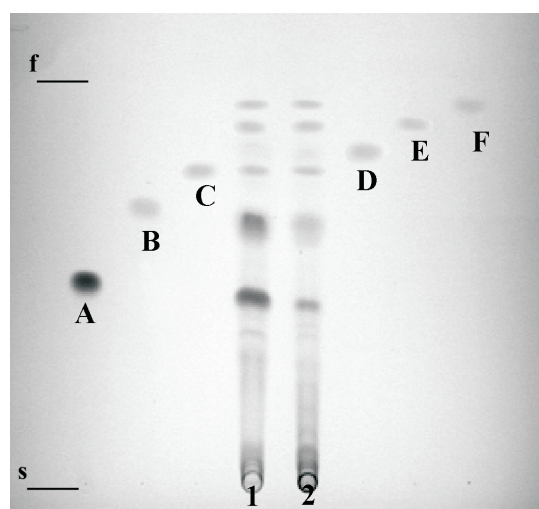
Kromatografske metode analize

Tankoslojna kromatografija

Početkom šezdesetih godina prošlog stoljeća započelo se za analizu flavonoida primjenjivati tankoslojnu kromatografiju, te je iz primjene istisnuta kromatografija na papiru. Tankoslojna kromatografija je jednostavna i relativno jeftina tehnika koja se danas u svrhu istraživanja polifenola u vinima primjenjuje za kvalitativnu i kvantitativnu analizu te za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. U tu svrhu najčešće se upotrebljavaju TLC ploče presvučene slojem silikagela. Pošto polifenoli apsorbiraju u ultraljubičastom dijelu spektra, detekcija se nakon prskanja ploča s polietilenglikolom ili 1 %-tnom alkoholnom otopinom aluminijske klorida uglavnom provodi pod UV svjetlom u područjima valnih duljina od $\lambda = 250$ nm do 260 nm ili od $\lambda = 350$ nm do 365 nm.¹¹

Tankoslojna kromatografija često se primjenjuje i za dokazivanje supstancija u pojedinim frakcijama dobivenim pripremanjem uzoraka kolonskom kromatografijom ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Tako su kromatografijom na koloni ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi u uzorcima grožđa i vina razdvojeni proantocijanidini različitog stupnja polimerizacije.^{24,25} Tankoslojna kromatografija izvedena je na standardnim TLC-pločama presvučenim slojem silikagela, a kao pokretna faza upotrijebljena je smjesa otapala ψ (toluen, aceton, octena kiselina) = 3 : 3 : 1. Za analizu antocijanina najpogodnija je tehnika tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC) primjenom sustava obrnutih faza.²⁶

Najčešći problem u kromatografskoj analizi je vrednovanje djelotvornosti pokretnih faza kao i odabir njihove optimalne kombinacije za dokazivanje određene skupine supstancija. Neovisno o kromatografskoj metodi (tankoslojna kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) optimalna kombinacija pokretnih faza uključuje one koje se međusobno najviše razlikuju u identifikacijskim obilježjima, primjerice faktorima zaostajanja (R_f) u tankoslojnoj kromatografiji. Za određivanje optimalne kombinacije dviju ili više pokretnih faza primjenjuju se dvije metode: teorija informacije i numerička taksonomija.²⁷ U svrhu kvalitativne analize polifenola u ekstraktima crnih vina tim spomenutim metodama ispitana je učinkovitost jedanaest pokretnih faza, a za najprikladniju odabrana je ψ (benzen, etil-acetat, mravlja kiselina) = 30 : 15 : 5.⁹ Slika 2 prikazuje razdvajanje polifenola ekstrahiranih iz uzoraka vina upotrebom spomenute pokretne faze.

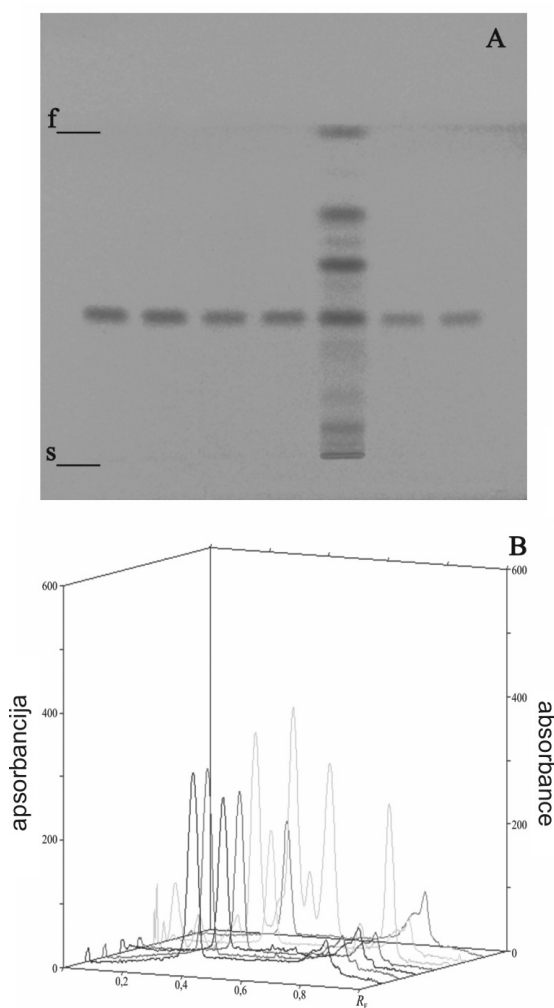


Slika 2 – Razdvajanje polifenola ekstrahiranih iz uzoraka vina "Merlot"(1) i "Frankovka" (2) uz pokretnu fazu: ψ (benzen, etil-acetat, mravlja kiselina) = 30 : 15 : 5 na TLC-ploči presvučenoj silikagelom (60 F₂₅₄). A) galna kiselina; B) kavena kiselina; C) apigenin; D) kemferol; E) p-kumarinska kiselina; F) naringenin. Ploče su promatrane pod UV svjetlom na 254 nm. (s = start; f = fronta pokretne faze).⁹

Fig. 2 – Separation of phenolic compounds from wine samples "Merlot"(1) and "Frankovka" (2) using the mobile phase: ψ (benzene, ethyl acetate, formic acid) = 30 : 15 : 5, performed on a TLC plate coated with silica gel (60 F₂₅₄). A) gallic acid; B) caffeic acid; C) apigenin; D) kaempferol; E) p-coumaric acid; F) naringenin. The plate was observed under UV light at 254 nm. (s = start line; f = solvent front).⁹

Tankoslojnu kromatografiju moguće je primijeniti i za kvantitativnu analizu uzoraka. Kvantitativna analiza uzoraka tankoslojnom kromatografijom danas se najčešće provodi pomoću skenirajućeg denzitometra. Denzitometar je uređaj koji omogućava pretraživanje tankog sloja sa zrakom svjetla određene valne duljine radi mjerenja apsorpcije UV zračenja, svjetla u vidljivom području ili fluorescencije, pri čemu se dobivaju vrijednosti za kvantitativno određivanje razdvojenih sastojaka. Skenirajuća denzitometrija ima veliku prednost nad vizualnom inspekcijom ili video-denitometrijom, jer ima mogućnost upotrebe monokromatske svjetlosti u području valnih duljina (λ) od 190 nm do 800

nm za mjerenje maksimuma apsorpcije ili fluorescencije pojedinih supstancija. Stoga je primjenom te tehnike moguće identifikaciju polifenola u vinu provoditi, osim uobičajenim uspoređivanjem R_F -vrijednosti analiziranih supstancija s R_F -vrijednostima odgovarajućih standardnih supstancija, i uspoređivanjem s njihovim apsorpcijskim ili fluorescencijskim UV spektrima. Kvantitativno vrednovanje temelji se na usporedbi visine ili površine kromatografske krivulje (pika) analiziranog sastojka s visinom ili površinom pika baždarnog standarda na istoj ploči. Primjer denzitometrijskog određivanja galne kiseline u uzorku crnog vina prikazan je na slici 3.²⁸



Slika 3 – A) Fotografija kromatografske ploče (presvučene silikagelom (60 F_{254})), pokretna faza: ψ (benzen, etil-acetat, mravlja kiselina) = 30 : 15 : 5, snimljena pri $\lambda = 254$ nm prilikom određivanja koncentracije galne kiseline u uzorku crnog vina (s = start; f = fronta pokretne faze); B) Trodimenzijski dijagram (denzitogram) dobiven skeniranjem iste kromatografske ploče denzitometrom. Skeniranje je provedeno mjerenjem apsorpcije UV zračenja valne duljine 254 nm.²⁸

Fig. 3 – A) Photograph of the chromatographic plate (coated with silica gel (60 F_{254})), mobile phase: ψ (benzene, ethyl acetate, formic acid) = 30 : 15 : 5, recorded at $\lambda = 254$ nm during the determination of gallic acid in a sample of red wine (s = start line; f = solvent front); B) Three-dimensional diagram (densitogram) obtained by scanning the same chromatographic plate using a densitometer.²⁸

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Od svih kromatografskih tehnika tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima najširu primjenu u analizi polifenola. Do sada su metodama koje uključuju analizu HPLC-om identificirane i kvantificirane brojne polifenolne supstancije u vinu. Odabir metode ovisi ponajprije o načinu pripreme uzoraka vina, skupini spojeva koje se žele analizirati te opremljenosti laboratorija.

Izuzev rijetkih primjera, metoda primjenom sustava normalnih faza koje se upotrebljavaju samo za analizu flavanola i njihovih polimera – proantocijanidina,^{18,20,29} za analizu više skupina polifenola istodobno najčešće se primjenjuju kromatografski sustavi obrnutih faza.^{19,22,23,30–32}

Osim odabira kolone, vrlo je važan i odabir pokretnih faza i načina eluiranja. Način eluiranja najčešće je gradijentan uz uporabu dvaju sustava otapala, jednog polarnog kao što je vodena otopina octene, perklorne, fosforne ili mravlje kiseline te drugog manje polarnog otapala, najčešće zakiseljenog metanola ili acetonitrila.^{23,30,33–35} Također se primjenjuju i sustavi s tri^{36–38} i četiri³⁹ otapala koji ponekad mogu sadržavati soli. U literaturi se također spominje i jednostavno izokratno ispiranje tijekom kojeg se ne mijenja sastav pokretne faze. Takav način eluiranja primijenjen je u analizi mircetina i kvercetina u uzorcima crnog vina, gdje je pokretna faza bila otopina acetonitrila zakiseljena s trifluorocetenom kiselinom.⁴⁰

Vrijeme trajanja analize (*engl.* run time) obično je od 30 min do 150 min, dok je protok pokretne faze (*engl.* flow rate) $Q = (0,15 - 1,8)$ mL min⁻¹. Temperatura kolone je obično u rasponu od $\vartheta = 20$ °C do 45 °C, a obujam injektiranog uzorka od $V = 10$ μ L do 20 μ L.⁴¹

Polifenoli apsorbiraju u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra, stoga se rutinska detekcija tih spojeva u analizi HPLC-om temelji na mjerenju apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog (Vis) zračenja, pomoću UV-Vis detektora. Dokazivanje svih skupina polifenola nije moguće mjerenjem apsorpcije pri samo jednoj valnoj duljini, jer svaka skupina ima apsorpcijske maksimume u različitim područjima valnih duljina. Posebna vrsta UV-Vis detektora je detektor s nizom dioda (DAD) koji ima mogućnost snimanja cijelog UV spektra nekoliko puta tijekom formiranja kromatogramskog pika ispitivanog sastojka. Primjena DAD-a ima niz prednosti: mogućnost mjerenja apsorpcije analita na više valnih duljina te odabir najpogodnije valne duljine za analizu provjeru čistoće ispitivanog sastojka (*engl.* peak purity).^{10,22,42}

Povećanje selektivnosti i osjetljivosti HPLC-analize moguće je postići uvođenjem dodatnog elektrokemijskog detektora uz detektor s nizom dioda. Ta je metoda detekcije postala izuzetno važna za određivanje polifenola sadržanih u vinu u vrlo malim koncentracijama.^{43,44}

Upotreba fluorescencijskog detektora spojenog u seriju s apsorpcijskim UV-Vis detektorom omogućuje razlikovanje fluorescirajućih od nefluorescirajućih supstancija čiji su pikovi preklapljeni te njihovu kvantifikaciju. Na slici 4 prikazani su kromatogrami ekstrakta uzorka crnog vina dobiveni uporabom apsorpcijskog UV detektora (slika A) i fluorescencijskog detektora (slika B). Usporedbom prikazanih kromatograma može se vidjeti da se pikovi epikatehina i al-

dehida siringične kiseline preklapaju u kromatogramu dobivenom uz UV detekciju, dok je u kromatogramu dobivenom fluorescencijskom detekcijom pik epikatehina dobro razlučen, a pik aldehida siringične kiseline nije vidljiv. Također se može primijetiti i veća osjetljivost fluorescencijskog detektora za određivanje vanilinske kiseline.⁴⁵

S obzirom da resveratrol pobuđuje kemiluminiscencijsku reakciju između kalijeva permanganata i formaldehida u kiselj sredini, primjenom kemiluminiscencijskog detektora moguće je s velikom osjetljivošću odrediti resveratrol u crnim vinima.⁴⁶

Najbolje razlučivanje sastojaka u HPLC-analizi postiže se detekcijom analita uporabom spektrometrije masa (MS). Spektrometrijom masa dokazuju se polifenoli sličnih vremena zadržavanja na koloni i identificiraju nepoznate supstancije sadržane u uzorku. Tehnikom HPLC-MS omogućeno je istodobno razdvajanje i određivanje polarnih fenolnih kiselina i manje polarnih flavonoida u vinu.⁴⁷ Selektivnost HPLC-analize moguće je poboljšati detekcijom tandemnom spektrometrijom masa (MS-MS), pomoću koje je primjerice određeno 35 antocijanina u grožđu i vinu sorte Cabernet Sauvignon.⁴⁸

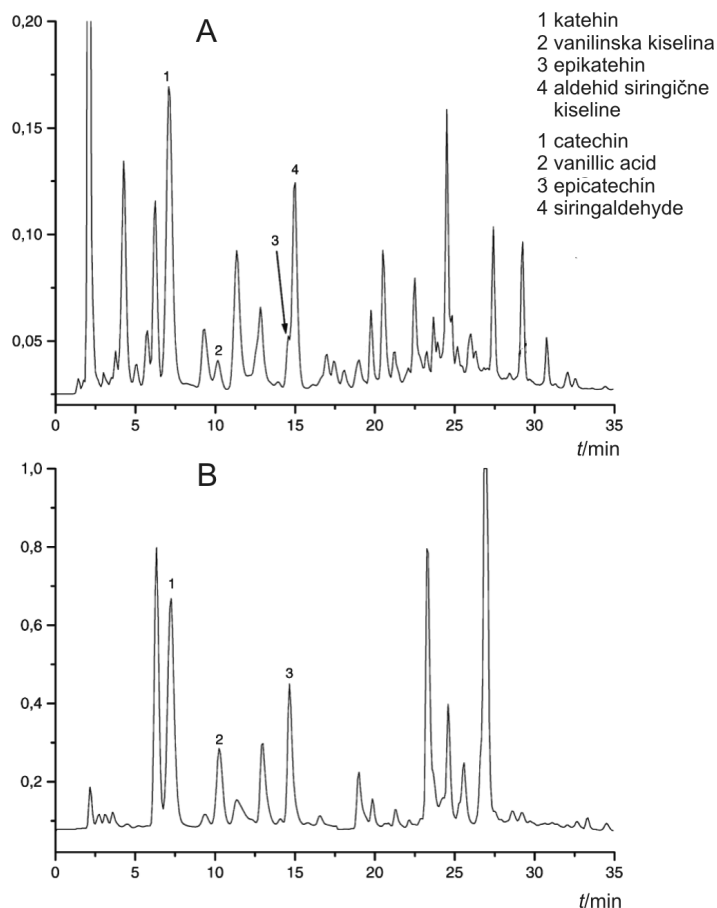
Za analizu termički nestabilnih ili slabo hlapljivih supstancija od posebnog značenja je ionizacija uzorka izravno iz otopine, kao i izravno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. U tu svrhu razvijena je ionizacijska tehnika elektroraspršenjem (ESI) kojom se pri atmosferskom tlaku ioni iz otopine prevode u plinovitu fazu.⁴⁹ Spektrometrija masa uz elektroraspršenje kao način ionizacije (ESI-MS) danas se primjenjuje za analizu različitih vrsta tvari, a moguća je primjena i u analizi polifenola. Pokazano je da je u kromatogramima ekstrakata vina analiziranih sustavom HPLC-ESI-MS-MS intenzitet pikova flavonoida i *cis*-resveratrola 2,5 do 4 puta veći nego u kromatogramima istih uzoraka analiziranih sustavom HPLC-MS uz paralelnu detekciju UV i fluorescencijskim detektorom.⁵⁰ Bravo i suradnici⁵¹ su pri HPLC-analizi polifenola upotrebljavali MS detektor s kemijskom ionizacijom pri atmosferskom tlaku (APCI). Metoda se pokazala pogodnom za identifikaciju većine polifenolnih supstancija, osim ferulične kiseline i derivata vanilinske kiseline.

Uz elektroraspršenje, kao tehniku ionizacije u spektrometriji masa, za analizu antocijanina iz grožđa i vina primjenjuje se i matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (MALDI).⁵²

Tehnika HPLC uz detekciju UV-Vis pokazala se ograničenom u analizi polifenola velike molekulske mase, pogotovo polimernih pigmenta. Zbog njihove strukture i niskih koncentracija u vinu otežana je mogućnost njihova razdvajanja i detekcije, pa se u tu svrhu primjenjuju druge metode.

Gel-propusna kromatografija

Gel-propusna kromatografija (GPC) je vrsta kromatografije isključenjem po veličini (*engl.* size exclusion chromatography), gdje je nepokretna faza nabubreni gel. Ta se metoda primjenjuje za frakcijsko razdvajanje monomernih i polimernih polifenolnih supstancija iz crnih vina prije analize sustavom HPLC-MS.⁵³ Pomoću gel-propusne kromatografije moguće je procijeniti prosječnu masu i stupanj poli-



Slika 4 – HPLC-kromatogrami ekstrakta crnog vina dobiveni uporabom UV detektora (A) i fluorescencijskog detektora (B)⁴⁵

Fig. 4 – HPLC chromatograms of red wine extract obtained by UV detection (A) and fluorescence detection (B)⁴⁵

merizacije supstancija nastalih prilikom taloženja proantocijanidina u crnim vinima.⁵⁴

Plinska kromatografija

Iako se plinska kromatografija (GC) većinom primjenjuje za analizu hlapljivih sastavnica vina, primjerice terpena, u novije vrijeme primjenjuje se i za analizu polifenolnih supstancija, ali uz prethodnu derivatizaciju analita. Godine 1996. Betés-Saura i suradnici⁵⁵ objavili su rad u kojemu je opisana identifikacija derivata hidroksibenzojeve kiseline u vinu vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa, koristeći metodu praćenja odabranih iona (SIM). Istom su metodom Minuti i suradnici⁵⁶ odredili 22 supstancije u vinu od kojih je 18 polifenola.

Ostale metode analize

Kapilarna elektroforeza

U posljednje se vrijeme kapilarna elektroforeza (CE) pokazala kao brza, učinkovita i relativno jeftina metoda za analizu polifenola u vinu.^{57–59} Korištenje kapilarne elektroforeze isključuje uobičajenu složenu pripremu uzoraka te reducira obujam potrebnog uzorka za analizu na manje od $V = 1 \mu\text{L}$. Međutim, određivanje niskih koncentracija analita u uzor-

ku zahtijeva prethodno koncentriranje uzorka. Pazourek i suradnici⁶⁰ koristili su ekstrakciju na čvrstoj fazi za koncentriranje uzoraka prije analize kapilarnom elektroforezom. Metodom "otiska prsta" (*engl.* fingerprints) i primjenom umjetnih neuronskih mreža moguće je iz dobivenih elektroferograma s velikom točnošću utvrditi sortu vina i godinu berbe.

Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (MECC) vrsta je kapilarne elektroforeze koja omogućava razdvajanje neutralnih analita pod utjecajem električnog polja. Princip razdvajanja se temelji na različitoj raspodjeli analita između micela koje predstavljaju nepokretnu fazu i vodene faze koja ih okružuje. Međudjelovanje između flavonoida i micela je snažno, stoga se selektivnost može modificirati koncentracijom micela. Tom je metodom uspješno analizirano 12 polifenolnih supstancija u vinu.⁶¹

Zaključak

U svrhu separacije, identifikacije i kvantifikacije polifenola u vinu razvijene su brojne kromatografske metode, a odabir tehnike najviše ovisi o svrsi istraživanja, skupinama polifenola koje se žele analizirati te opremljenosti laboratorija.

TLC je najjednostavnija i najjeftinija tehnika, koja je bila djelomično istisnuta iz primjene zbog postupnog uvođenja HPLC-metoda te se prije svega primjenjivala kao pregledna (*engl.* screening) metoda analize polifenola koja je prethodila nekoj detaljnijoj instrumentalnoj analizi. Velik iskorak u primjeni TLC-a za kvalitativnu i kvantitativnu analizu polifenola postignut je uvođenjem video-denzitometra te posebice skenirajućeg denzitometra, čijom se primjenom omogućava vrlo točna identifikacija i kvantifikacija ispitivanih supstancija. Danas su HPLC-DAD, GC i CE uobičajene tehnike separacije, identifikacije i kvantifikacije polifenolnih spojeva u vina, koje daju zadovoljavajuće rezultate. Povezivanjem HPLC-a sa spektrometrijom masa, tandemnom spektrometrijom masa te spektrometrijom masa uz posebne tehnike ionizacije (ESI, APCI, MALDI) znatno se povećava selektivnost, sposobnost dokazivanja i učinkovitost metoda. Daljnji razvoj metoda za analizu polifenola u vinu, osobito ide u smjeru povezivanja spomenutih tehnika s nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR), posebice za identifikaciju antocijanina i proantocijanidina (polimera flavanola), čiji su standardi vrlo teško dostupni i skupi.

ZAHVALA

Ovaj rad napravljen je u okviru znanstvenih projekta 006-0061117-1237 i 079-0000000-3211, koje financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske

Popis kratice Abbreviations

APCI	– Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku – Atmospheric pressure chemical ionization
CE	– Kapilarna elektroforeza – Capillary electrophoresis

DAD	– Detektor s nizom dioda – Diode array detector
ESI	– Ionizacija elektroraspršenjem – Electrospray interface
GC	– Plinska kromatografija – Gas chromatography
GPC	– Gel-propusna kromatografija – Gel permeation chromatography
HPLC	– Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – High-performance liquid chromatography
HPLC-MS	– Vezani sustav tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – spektrometrija masa – High-performance liquid chromatography-mass spectrometry
HPTLC	– Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti – High-performance thin-layer chromatography
MALDI	– Matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem – Matrix-assisted laser desorption ionization
MECC	– Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija – Micellar electrokinetic capillary chromatography
MS	– Spektrometrija masa – Mass spectrometry
MS/MS	– Tandemna spektrometrija masa – Tandem mass spectrometry
NMR	– Nuklearna magnetska rezonancija – Nuclear magnetic resonance
SIM	– Praćenje odabranih iona – Selective ion monitoring
TLC	– Tankoslojna kromatografija – Thin-layer chromatography
UV	– Ultraljubičasto – Ultraviolet
Vis	– Vidljivo – Visible

Popis simbola List of symbols

Q	– obujmni protok, mL min ⁻¹ – volume flow rate, mL min ⁻¹
R	– faktor zaostajanja – lagging factor
t	– vrijeme, min – time, min
V	– obujam, mL, L – volume, mL, L
γ	– masena koncentracija, mg L ⁻¹ – mass concentration, mg L ⁻¹
θ	– temperatura, °C – temperature, °C
λ	– valna duljina, nm – wave length, nm
ψ	– obujmni omjer – volume ratio

Literatura:

References:

1. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, *Am. J. Clin. Nutr.* **79** (2004) 727.
2. N. Landrault, P. Poucheret, P. Ravel, F. Gasc, G. Cros, P.-L. Teissedre, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 3341.
3. P. Zafrilla, J. Morillas, J. Mulero, J. M. Cayuela, A. Martínez-Cachá, F. Pardo, J. M. L. Nicolás, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 4694.
4. M. Netzel, G. Strass, I. Bitsch, R. Könitz, M. Christmann, R. Bitsch, *J. Food Eng.* **56** (2003) 223.
5. I. Lesschaeve, A. C. Noble, *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (2005) 330S.
6. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.* **13** (2002) 572.
7. S. C. Renaud, M. de Lorgeril, *Lancet* **339** (1992) 1523.
8. M. López, F. Martínez, C. Del Valle, C. Orte, M. Miró, *J. Chromatogr. A* **922** (2001) 359.
9. V. Rastija, A. Mornar, I. Jasprića, G. Srećnik, M. Medić-Šarić, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **17** (2004) 26.
10. C. Proestos, A. Bakogiannis, C. Psarianos, A. A. Koutinas, M. Kanellak, M. Komaitis, *Food Control* **16** (2005) 319.
11. E. de Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **1112** (2006) 31.
12. I. Molnár-Perl, *Zs. Fűzfai, J. Chromatogr. A* **1073** (2005) 201.
13. P. A. Kilmartin, *Antiox. Redox. Signal.* **6** (2001) 1957.
14. P. A. Kilmartin, Z. Honglei, A. L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 1957.
15. P. A. Kilmartin, Z. Honglei, A. L. Waterhouse, *Am. J. Enol. Vitic.* **53** (2002) 294.
16. K. R. Markham, *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, 1982, str. 1–5.
17. D. Tura, K. Robards, *J. Chromatogr. A* **975** (2002) 71.
18. S. A. Lazarus, G. E. Adamson, J. F. Hammerstone, H. H. Schmitz, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 3693.
19. S. Malovana, F. J. García Montelongo, J. P. Pérez, M. A. Rodríguez-Delgado, *Anal. Chim. Acta* **428** (2001) 245.
20. M. Pinelo, V. F. Laurie, A. L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 2839.
21. D. W. Jeffery, M. D. Mercurio, M. J. Herderich, Y. Hayasaka, P. A. Smith, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 2571.
22. E. Revilla, J. M. Ryan, *J. Chromatogr. A* **881** (2000) 461.
23. F. Fang, J.-M. Li, Q.-H. Pan, W.-D. Huang, *Food Chem.* **101** (2007) 428.
24. A. G. H. Lea, P. Bridle, C. F. Timberlake, V. L. Singleton, *Am. J. Enol. Vitic.* **30** (1979) 289.
25. B. Sun, C. Leandro, J. M. R. da Silva, I. Spranger, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 1390.
26. M. Lambri, M. Jourdes, Y. Glories, C. Saucier, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **16** (2003) 88.
27. M. Kaštelan-Macan, M. Medić-Šarić, S. Turina (ur.), *Plošna kromatografija*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006, str. 205–216.
28. V. Rastija, *Kromatografska analiza polifenola u vinima iz Hrvatske*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2007.
29. J. A. Kennedy, A. L. Waterhouse, *J. Chromatogr. A* **866** (2000) 25.
30. S. Kallithraka, E. Tsoutsouras, E. Tzourou, P. Lanaridis, *Food Chem.* **99** (2006) 784.
31. A. B. Cerezo, W. Tesfaye, M. J. Torija, E. Mateo, M. C. García-Parrilla, A. M. Troncoso, *Food Chem.* **109** (2008) 606.
32. L. Mercolini, M. A. Saracino, F. Bugamelli, A. Ferranti, M. Malaguti, S. Hrelia, M. A. Raggi, *J. Sep. Sci.* **31** (2008) 1007.
33. R. R. Robbins, S. R. Bean, *J. Chromatogr. A* **1038** (2004) 97.
34. M. Ibern-Gómez, C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, A. L. Waterhouse, *Am. J. Enol. Vitic.* **53** (2002) 218.
35. H. M. Merken, G. R. Beecher, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 577.
36. I. H. Gutiérrez, E. Sánchez-Palomo Lorenzo, A. V. Espinosa, *Food Chem.* **92** (2005) 269.
37. S. González-Manzano, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, *Anal. Chim. Acta* **513** (2004) 283.
38. A.-V. Sakkiadi, M. N. Stavrakakis, S. A. Haroutounian, *Lebensm. Wiss. Technol.* **34** (2001) 410.
39. S. de Pascual-Teresa, D. Treutter, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 4209.
40. M. S. McDonald, M. Hughes, J. Burns, M. E. J. Lean, D. Matthews, A. Crozier, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 368.
41. R. J. Robbins, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 2866.
42. L. Bovanová, E. Brandšteterová, *J. Chromatogr. A* **880** (2000) 149.
43. P. Mattila, J. Astola, J. Kumpulainen, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 5834.
44. S. Silva, A. A. Matias, A. Nunes, C. Duarte, A. V. Coelho, M. R. Bronze, *Ciência Téc. Vitiv.* **20** (2005) 17.
45. M. A. Rodríguez-Delgado, S. Malovana, J. P. Pérez, T. Borges, F. J. García Montelongo, *J. Chromatogr. A* **912** (2001) 249.
46. J. J. Ren, H. Y. Liu, Y. H. Hao, P. G. He, Y. Z. Fang, *Chinese Chem. Lett.* **18** (2007) 985.
47. W. Andlauer, C. Stumpf, P. Fürst, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 3533.
48. H. Wang, E. J. Race, A. J. Shrikhande, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 7989.
49. N. Galić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 117.
50. G. Stecher, C. W. Huck, M. Popp, G. K. Bonn, *Fresen. J., Anal. Chem.* **371** (2001) 73.
51. M. N. Bravo, S. Silva, A. V. Coelho, L. Vilas Boas, M. R. Bronze, *Anal. Chim. Acta* **563** (2006) 84–92.
52. A. C. Muñoz-Espada, K. V. Wood, B. Bordelon, B. A. Watkins, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 6779.
53. Z. Guadalupe, A. Soldevilla, M.-P. Sáenz-Navajas, B. Aye-starán, *J. Chromatogr. A* **1112** (2006) 112.
54. C. Saucier, G. Bourgeois, C. Vitry, D. Roux, Y. Glories, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 1045.
55. C. Betés-Saura, C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 3040.
56. L. Minuti, R. M. Pellegrino, I. Tesei, *J. Chromatogr. A* **1114** (2006) 263.
57. D. P. Makris, E. Psarra, S. Kallithraka, P. Kefalas, *Food Res. Int.* **36** (2003) 805.
58. B. C. Prasongsidh, G. R. Skurray, *Food Chem.* **62** (1998) 355.
59. R. C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Durán, *Food Chem.* **82** (2003) 409.
60. J. Pazourek, D. Cajdosova, M. Spanila, M. Farkova, K. Novotna, J. Havel, *J. Chromatogr. A* **1081** (2005) 48.
61. M. A. Rodríguez-Delgado, J. P. Pérez, R. Corbella, G. González, F. J. García Montelongo, *J. Chromatogr. A* **871** (2000) 427.

SUMMARY

Chromatographic Methods for the Analysis of Polyphenols in Wines

V. Rastija^a and M. Medić-Šarić^b

Wine is an excellent source of various classes of polyphenols, including phenolic acids, flavonoids, and trihydroxystilbene resveratrol (Fig. 1). Polyphenols play a major role in wine quality since they contribute to the sensory characteristics of wine, particularly color and astringency. A recent interest in these substances has been stimulated by abundant evidence of their beneficial effects on human health, such as anticarcinogenic, antiinflammatory and antimicrobial activities. Therefore, numerous studies have been performed in the attempt to analyze polyphenols in wine. This paper reviews the current advances in the determination of polyphenols in wine by the major chromatographic techniques such as thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC).

The great complexity of the polyphenolic content of wine and the difficulty in obtaining some of the standards usually require sample preparation before analysis. Two methods for sample preparation, liquid-liquid extraction and solid-phase extraction, are most commonly applied. Hydrolysis is applied frequently, but not exclusively, to remove the sugar moieties from glycosides.

TLC on silica gel plates is useful for the rapid and low-cost separation and identification of the polyphenols present in wine (Fig. 2). Densitometric quantitative analysis of polyphenols in wine extracts is usually performed by scanning the TLC plates with UV light at wavelengths of 350–365 nm or 250–260 nm (Fig. 3). For the evaluation of the most efficient mobile phase and an optimal choice of the combination of two or more mobile phases, two methods may be applied: information theory and numerical taxonomy.

HPLC currently represents the most popular technique for the analysis of polyphenols in wine. For this purpose, a reversed-phase HPLC method that uses gradient elution with binary elution system is usually employed. Routine detection is based on measurement of UV-Vis absorption with a diode array detector (DAD). Enhancing selectivity and sensitivity for the determination of certain polyphenols requires the application of different detection techniques, such as fluorimetry (Fig. 4), electrochemistry, chemiluminescence, and/or mass spectrometry coupled with ionization techniques: electrospray (ESI), matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), and atmospheric pressure chemical ionization (APCI).

Gas chromatography (GC) methods developed for the analysis of polyphenols require derivatization to the volatile compounds and mass-spectrometric detection in the selective ion-monitoring mode (GC/MS-SIM).

A special technique, capillary electrophoresis (CE), is a powerful tool for the analysis of polyphenol contents of white and red wines, with an opportune sample preconcentration step. Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) has extended the utility of capillary electrophoresis to the separation of neutral analytes under the influence of an electric field. Fractionation of monomeric and polymeric pigments of higher molecular mass by gel permeation chromatography (GPC) improved the analysis of these compounds by CE.

^a Department of Chemistry and Biochemistry,
Faculty of Agriculture, Josip Juraj Strossmayer
University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek 31107, Croatia

^b Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy
and Biochemistry, University of Zagreb,
A. Kovačića 1, Zagreb, 10000, Croatia

Received July 21, 2008
Accepted December 3, 2008