

III СТУДЕНТСКА КОНФЕРЕНЦИЈА  
КРИТИЧНИ ПРАШАЊА ВО ЗЕМЈОДЕЛСТВОТО И ЖИВОТНАТА  
СРЕДИН

**ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА ПОЛИФЕНОЛИ ВО  
ВИНА ОД СОРТАТА  
ВРАНЕЦ СО ПРИМЕНА НА UPLC-ESI-IT-MS**

**Александар Пиперевски<sup>1,2</sup>, Виолета Иванова-Петропулос<sup>2</sup>, Виктор Шандор<sup>3</sup>, Ференц Килар<sup>3</sup>, Дејан Миланов<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Винарска визба „Имако Вино“, Михајло Апостолски 34/5 2000 Штип, Република С. Македонија

<sup>2</sup>Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Крсте Мисирков, бб, 2000 Штип, Република С. Македонија

<sup>3</sup>Институт за биоанализа, Медицински факултет, Универзитет во Печ, ул. Сигети 2, 7624, Печ, Унгарија

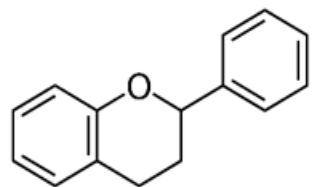
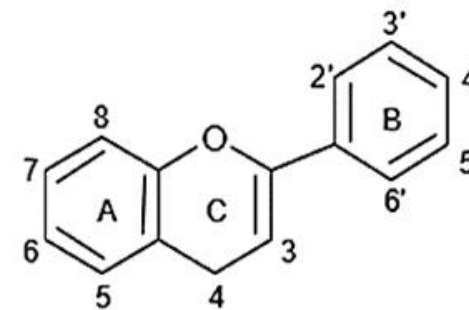
- **Полифенолите се голема и комплексна група на соединенија одговорни за карактеристиките на, квалитетот и бојата на грозјето и виното, особено за бојата на црвените вина.**
- **Квалитетот на вината во најголема мера зависи од полифенолниот состав**
- **Најважни компоненти кои ги одредуваат бојата, вкусот, астригентноста(трепкавст) и битерноста (горчливост) на виното**
- **Одговорни за антиоксидантниот потенцијал на  
ВИНОТО**

# Вовед - Полифеноли

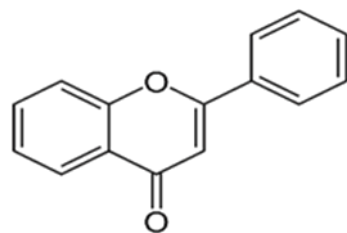
- ▶ *Флавоноиди и нефлавоноиди*
- ▶ *Флавоноиди:* антоцијани, флаван-3-оли, флавоноли
- ▶ *Нефлавоноиди:* фенолни киселини и нивни деривати и стилбени

# Флавоноиди

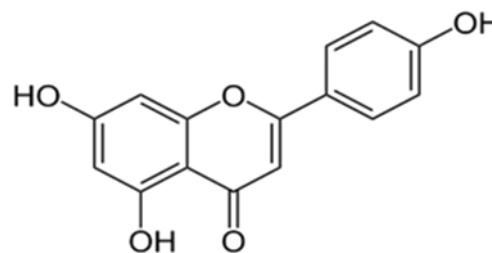
Два фенолни прстени А и В поврзани со пиранов прстен С



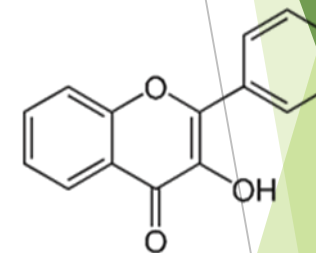
флаван



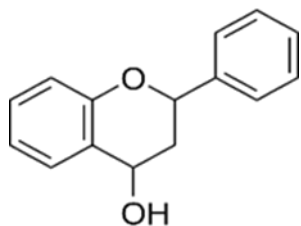
флавانون



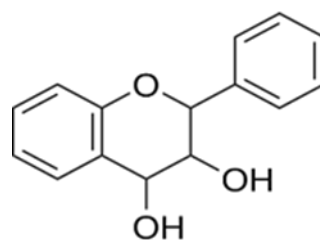
флавон



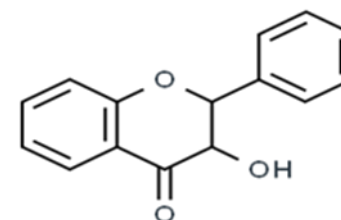
флаван-3-ол



Флаван-4-ол

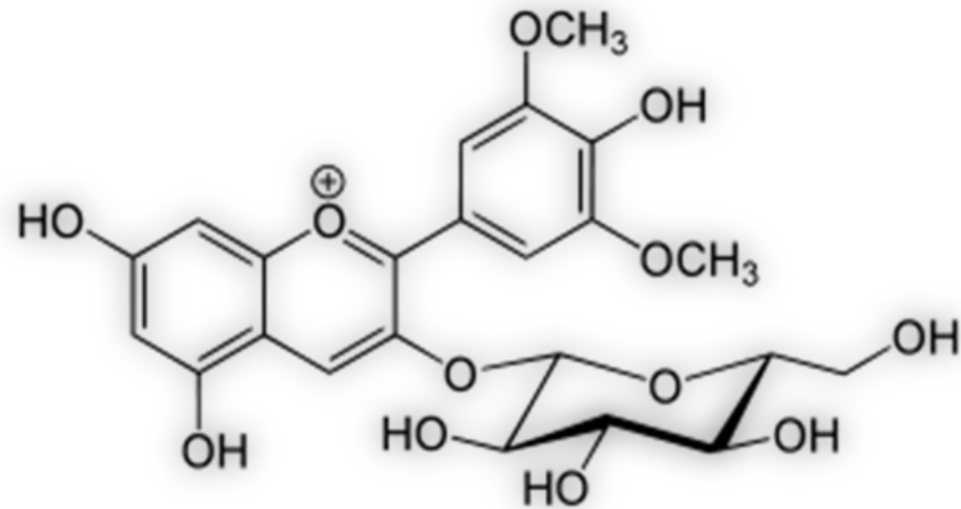


флаван-3,4-диол



дихидрофлавонол

# Антоцијани

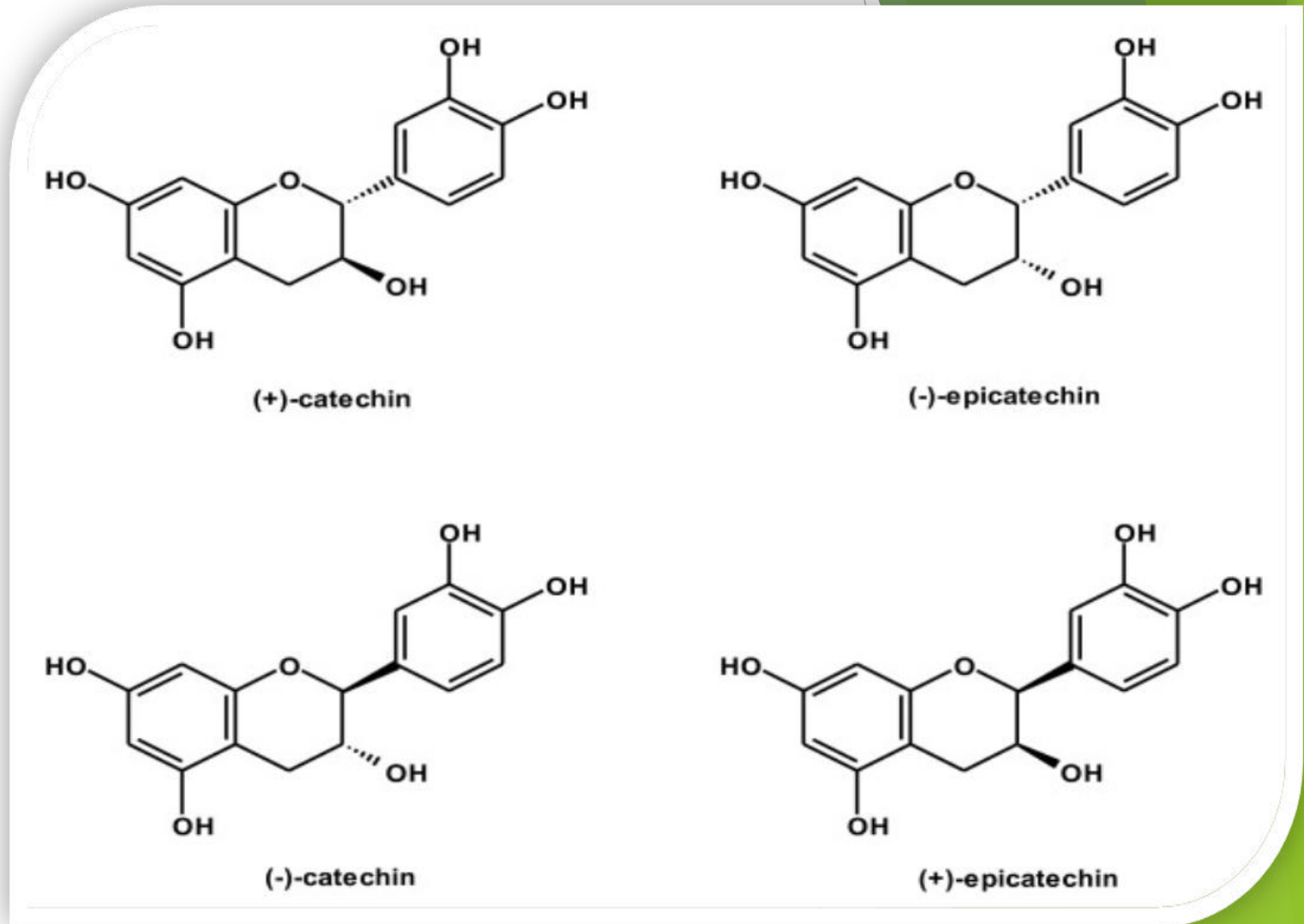


Структурна формула на антоцијани моноглукозиди

- *Малвидин, делфинидин, пејонидин, цијанидин, петунидин, застапени како:*
- *3-Моноглукозиди*
- *Ацетилглукозиди*
- *p-Кумарилглукозиди*

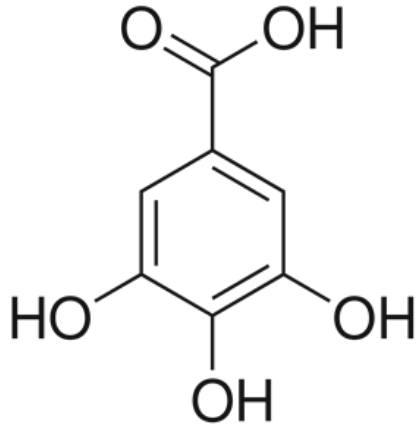
# Флаван-3-оли

- ❖ **Мономери: (+)-катехин и (-)- епикатехин**
- ❖ **Димери: Процианидини (B1, B2, B3, B4)**
- ❖ **Полимери, проантоцијаниди**

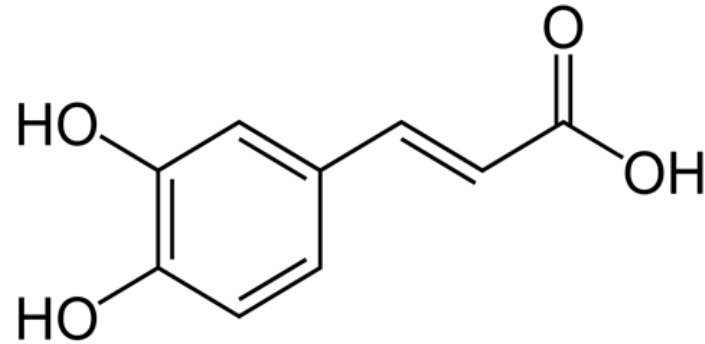


Структурни формули на флаван-3-ол мономери

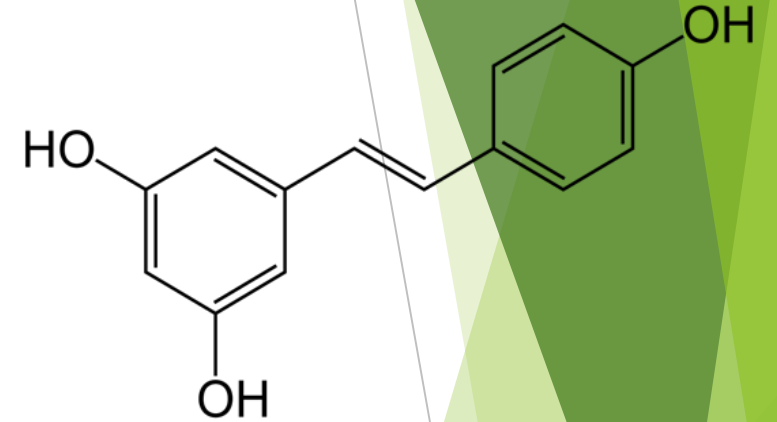
# Нефлавоноиди



*Гална киселина*



*Ферулна киселина*



*Ресвератрол*

- *Фенолни киселини*
- *Стилбени*

# Сорти на грозје во Република С. Македонија Вранец

- ▶ Водечка сорта за производство на црвено вино во нашата земја
- ▶ Застапена е во сите виногорја
- ▶ Оваа сорта зрее во втората декада на септември и најдобри резултати дава на средно плодни и умерено влажни почви.
- ▶ Вината се темно црвено обоени, полни на вкус, богати со обоени материји и екстракт и имаат карактеристичен мирис на зрела вишна и шумско овошје.





# Експериментален дел

## Производство на вино

- Грозје со оптимална шеќерност (22 ° Brix)
- Додавање на ензими пектиназа
- Додавање на SO<sub>2</sub> (30 mg/L)
- *Saccharomyces cerevisiae* (Sodinal FSERMACTIV ROUGE 20g/100L претходно активирани во топла вода на 30°C)
- Температура на ферментацијата ( 24°C).
- Суплементи со азот (диамониум фосфат 100g/100L)
- Ладна стабилизација (0-5 °C)
- Пред да бидат анализирани вината се чувани 3 месеци на темно место.

# Експериментален дел

- ❖ *Анализа на примероците вино*
- ❖ UPLC- Ultra Highperformance Liquid Chromatography (**Agilent 1290 UHPLC instrument**)
- ❖ **Agilent 6530 Accurate- Mass Q-TOF**
- ❖ CORTEX UPLC **C18** колона (**2,1 x 150 mm , 1,6 μm**)
- ❖ Градиентно елуирање (елуент А 1% CH<sub>3</sub>COOH во вода, елуент В 1% CH<sub>3</sub>COOH во метанол)
- ❖ Волумен на примерок 10 μL
- ❖ Филтрација со 0,45 μm филтри

# Експериментален дел

- ▶ UPLC – MS екстрахираните јонски хроматограми на идентификуваните компоненти беа пресметани со сумирање на интензитетите на нивните специфични маси во масениот спектар.
- ▶ Интензитетите на јоните се екстрахирани според односите маса/полнеж ( $m/z$ ) на молекуларните  $M^+$  и на квази-молекуларни ( $[M-H]^-$ ,  $[M+H]^+$ ) јони на детектираните компоненти

## Стандардни раствори

- 9 стандардни раствори на фенолни компоненти (гална киселина, ферулна киселина, *p* - кумарна киселина, *p* - дихидроксибензоева киселина, кафена киселина, сиригетинска киселина, рутин, кварцетин и ресвератрол).

## Калибрациони криви

## Валидација на методата

- LOD, LOQ, повторливост, репродукцибилност, интер дневна и интра дневна прецизност

# Резултати и дискусија

- Утврден сложен полифенолен профил на вината
- Идентификувани 59 полифенолни компоненти, поделени во неколку групи и тоа:

Идентификувани соединенија	Број на идентификувани соединенија
Фенолни киселини	10
Стилебени	10
Флаваноли	7
Диихидрофлаваноли	4
Флаван-3-оли	11
Антоцијани	12

# Резултати и дискусија

## Фенолни киселини во негативен јонски мод [M-H]<sup>-</sup>

Фенолни киселини	$t_R$	$t_r(\pm)$	MS (m/z)	MS-MS (m/z) фрагменти
Гална киселина	1,8	0,02	169	125
Кафена киселина	8,1	0,01	153	109
Ферулна киселина	13,8	0,04	193	193
<i>p</i> -Кумарна киселина	11,4	0,01	163	179, 149, 134
<i>p</i> -Дихидроксибензоева киселина	3,3	0,11	153	315, 285
Сирингитинска киселина	9,5	0,05	197	183, 153, 138
Елагова киселина	3,2	0,06	300	284, 275, 229
Синапинска киселина	3,2	0,04	223	208, 179, 164
Ванилинска киселина	3,8	0,01	167	124, 123, 108
Циметна киселина	2,3	0,01	147	104, 103

# Резултати и дискусија

## Флавоноли во позитивен јонски мод [M-H]<sup>+</sup>

Флавоноли	t <sub>R</sub>	t <sub>R</sub> (±)	MS (m/z)	MS-MS (m/z) фрагменти
Мирицетин-3-глукозид	11,8	0,06	493	319
Мирицетин-3-глукуронид	21,9	0,01	465	303
Кверцетин-3-глукозид	21,6	0,02	303	303
Кверцетин-3-глукуронид	21,6	0,02	303	303
Кверцетин	31,2	0,04	285	/
Кемферол	3,1	0,04	285	255, 227

# Резултати и дискусија

## Флаван-3-оли во негативен јонски мод [M-H]<sup>-</sup>

Флаван-3-оли	t <sub>R</sub>	t <sub>R</sub> (±)	MS (m/z)	MS-MS (m/z) фрагменти
(+)-Катехин	7,1	0.01	289	245, 205, 179
(-)-Епикатехин	11,0	0.02	289	245, 205, 179
(-)-Епикатехин-3-О-галат	15,1	0.02	441	289, 169
Процијанидин В2	5,4	0.03	577	451, 425, 407
Процијанидин В3	6,1	0.01	577	451, 425, 407
Процијанидин В4	7,2	0.02	577	451, 425, 407
Процијанидин В1	9,1	0.02	577	451, 425, 407
Галокатехин	2,4	0.01	305	261, 221, 219
(епи)-Катехин-3-О-ванилат	1,6	0,02	439	271, 261, 167
(епи)-Катехин-3-О-кумарат	0,6	0.01	435	341, 289, 269
Катехин-3-О-галат	1,4	0.03	441	331, 271, 227

# Резултати и дискусија

Стилбени во негативен јонски мод [M-H]<sup>-</sup>

Стилбени	t <sub>R</sub>	t <sub>R</sub> (±)	MS (m/z)	MS-MS (m/z) фрагменти
<i>cis</i> -Ресвератрол-3-О-глукозид	4,2	0,01	389	227
<i>trans</i> -Ресвератрол-3-О-глукозид	4,7	0,02	389	227
Ресвератрол	1,4	0,01	227	185, 159



# Резултати и дискусија

## Антоцијани во позитивен јонски мод $[M-H]^+$

Антоцијани	$t_R$	$t_R(\pm)$	MS ( $m/z$ ) M <sup>+</sup>	MS-MS ( $m/z$ ) фрагменти
Делфинидин-3-глукозид	22,8	0.02	465	303
Цијанидин-3-глукозид	24,4	0.01	449	287
Петунидин-3-глукозид	21,4	0.04	479	317
Пејонидин-3-глукозид	11,0	0.01	463	301
Малвидин-3-глукозид	11,8	0.07	493	331
Делфинидин-3-ацетилглукозид	20.1	0.04	507	303
Цијанидин-3-ацетилглукозид	18.4	0.01	491	287
Петунидин-3-ацетилглукозид	18.4	0.02	521	317
Пејонидин-3-ацетилглукозид	20.9	0.02	505	301
Малвидин-3-ацетилглукозид	21.1	0.02	535	331
Делфинидин-3- <i>p</i> -кумарилглукозид	22.1	0.04	611	303
Малвидин-3- <i>p</i> -кумарилглукозид	25.1	0.01	639	331

# Заклучок

- ❖ Масената спектроскопија е осетлива техника за идентификување на голем број соединенија во виното.
- ❖ Валидирана е UPLC метода за квантификација на полифенолните компоненти.
- ❖ Користена е UPLC метода кај која со намалување на големината на честичките на стационарната фаза е намалена должината на колоната, а со тоа е намален протокот и разделувањето е побрзо и со поголема резолуција.
- ❖ Помала потрошувачка на елуенти и времето за анализа е скратено на пола во споредба со регуларната HPLC метода.
- ❖ Голем придонес за винската индустрија.

***CEEPUS MOBILITY GRANT CIII-RO-0010-16-2122-M-154132***

**БЛАГОДАРАМ НА ВАШЕТО  
ВНИМАНИЕТО**