



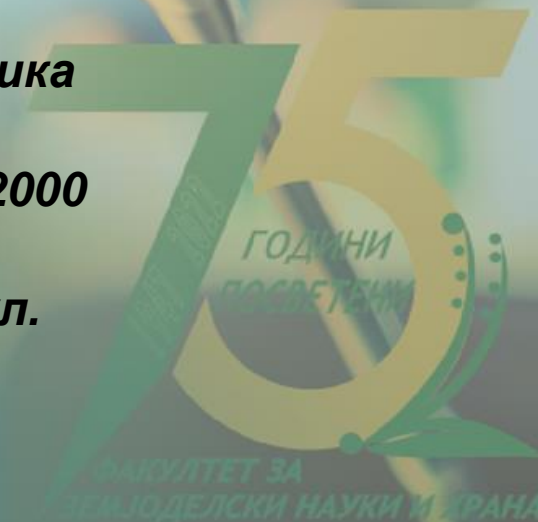
# ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ПОЛИФЕНОЛ ПРОФИЛ НА ВИНА ОД СОРТАТА ПИНО НОАР СО ПРИМЕНА НА UPLC-ESI-IT-MS ТЕХНИКА

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



# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ

## 12 ДЕКЕМВРИ 2022



- 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 (трепкавост) и битерноста (горчливост) на виното
- Одговорни за антиоксидантниот потенцијал на виното





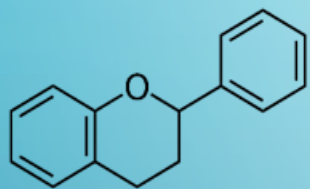
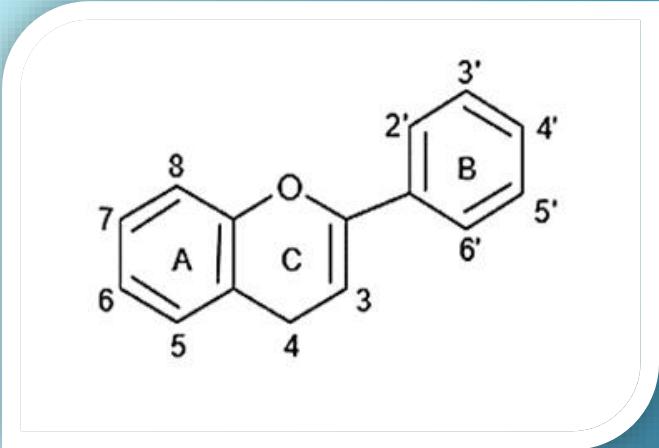
# Вовед - Полифеноли

- **Флавоноиди и нефлавоноиди**
- **Флавоноиди: антоцијани, флаван-3-оли и дихидрофлавоноли**
- **Нефлавоноиди: фенолни киселини и стилбени**

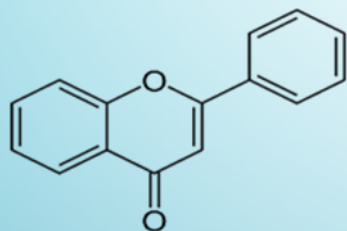


# ФЛАВОНОИДИ

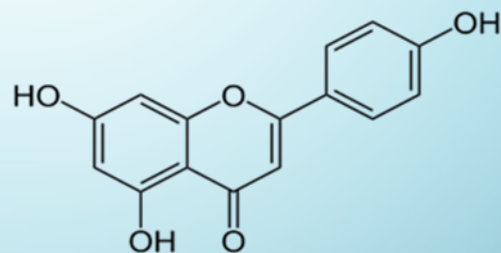
ДВА ФЕНОЛНИ ПРСТЕНИ А И В ПОВРЗАНИ СО ПИРАНОВ ПРСТЕН С



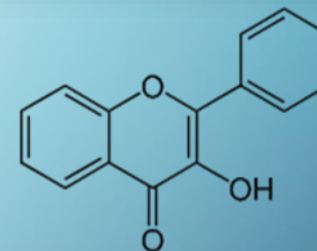
**флаван**



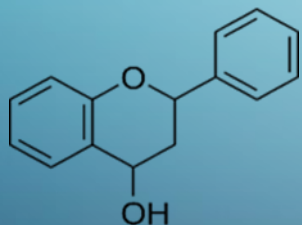
**флаванон**



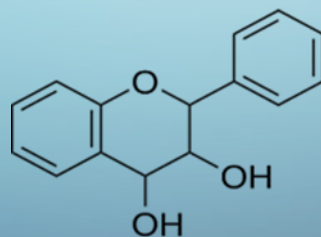
**флавон**



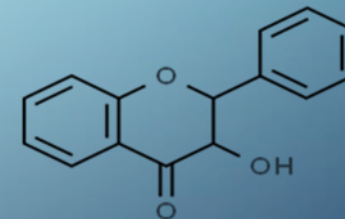
**флаван-3-ол**



**Флаван-4-ол**



**флаван-3,4-диол**

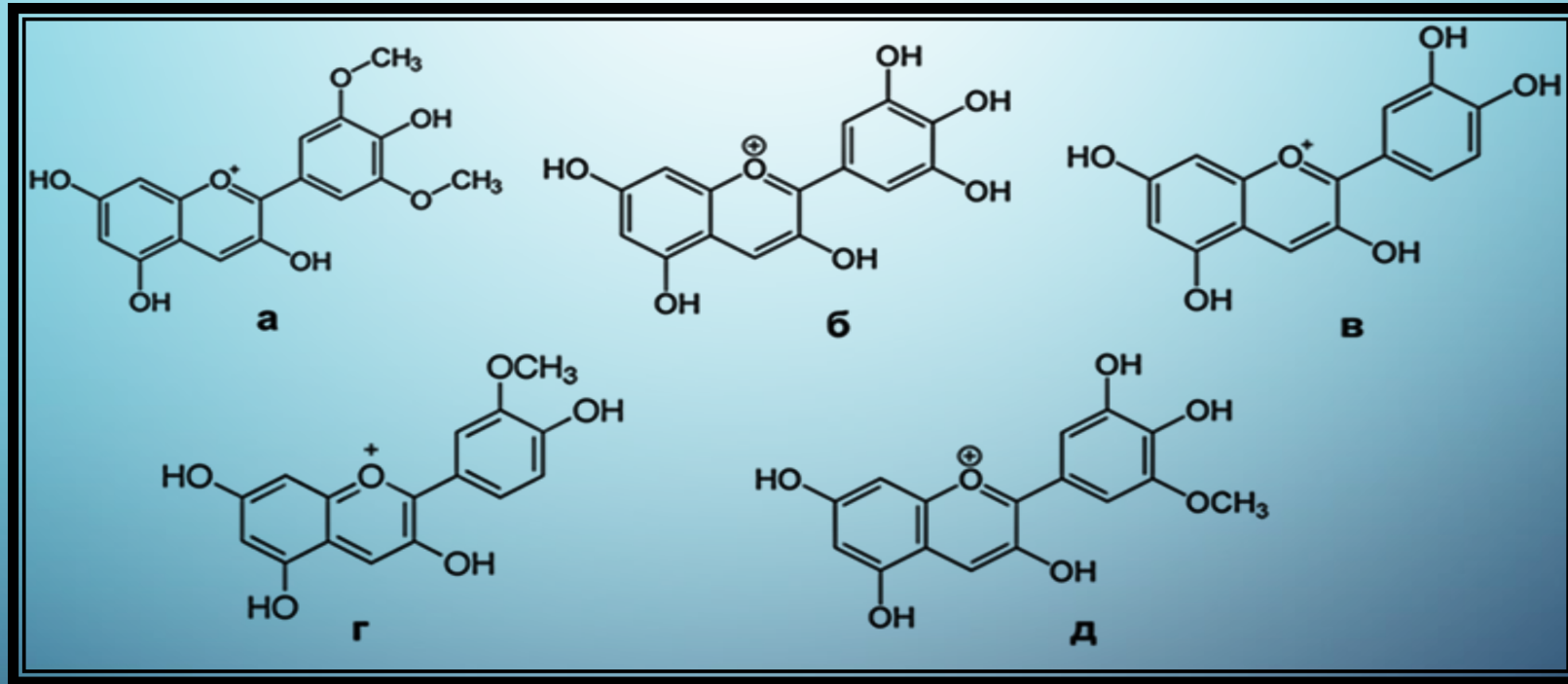


**дихидрофлавонол**



# АНТОЦИЈАНИ

- Антоцијаните се црвени компоненти одговорни за бојата на црвеното грозје и црвеното вино.
- Антоцијаните кои се присутни во грозјето и виното се базираат на пет основни антоцијанидини и тоа:

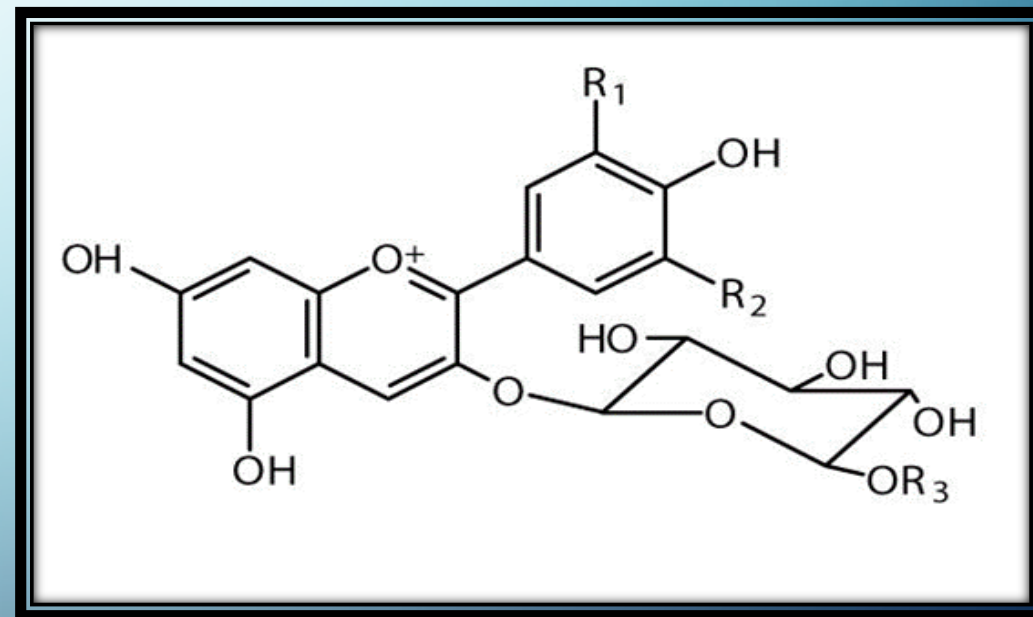


Структурни формули на основните антоцијанидини а) малвидин, б) делфинидин, в) цијанидин, г) пејонидин, д) петунидин

# АНТОЦИЈАНИ

- Антоцијаните во виното постојат во форма на 3-моноглукозиди, ацетилглукозиди и *p*-кумарилглукозиди
- Врска на флавоноидниот дел (агликон) со шеќер
- Врската се случува на C3 атомот, а шеќерот најчесто е глюкоза, ацетилглюкоза или кумароилглюкоза

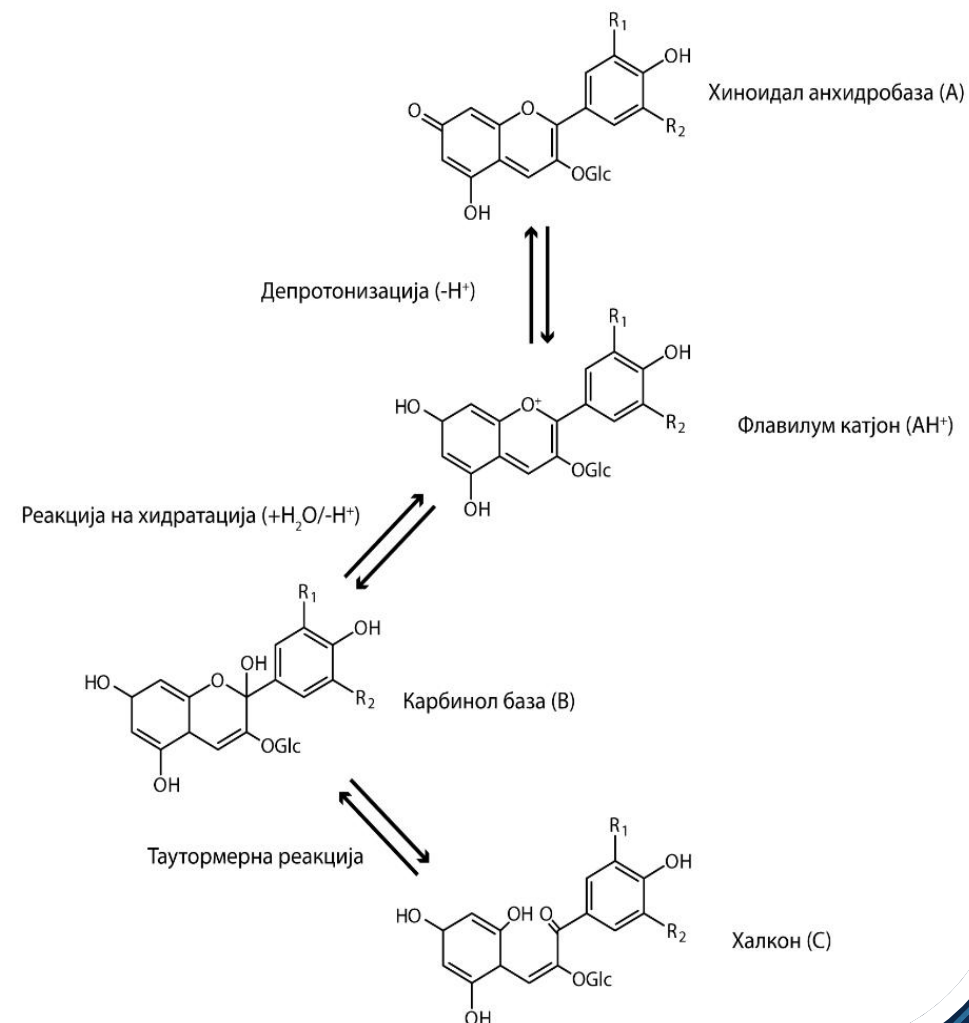
Антоцијани	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Mr
Делфинидин	ОН	ОН	465
Цијанидин	ОН	H	449
Петунидин	OCH <sub>3</sub>	ОН	479
Пеонидин	OCH <sub>3</sub>	H	463
Малвидин	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	493



СТРУКТУРНА ФОРМУЛА НА АНТОЦИЈАНИ МОНОГЛУКОЗИДИ

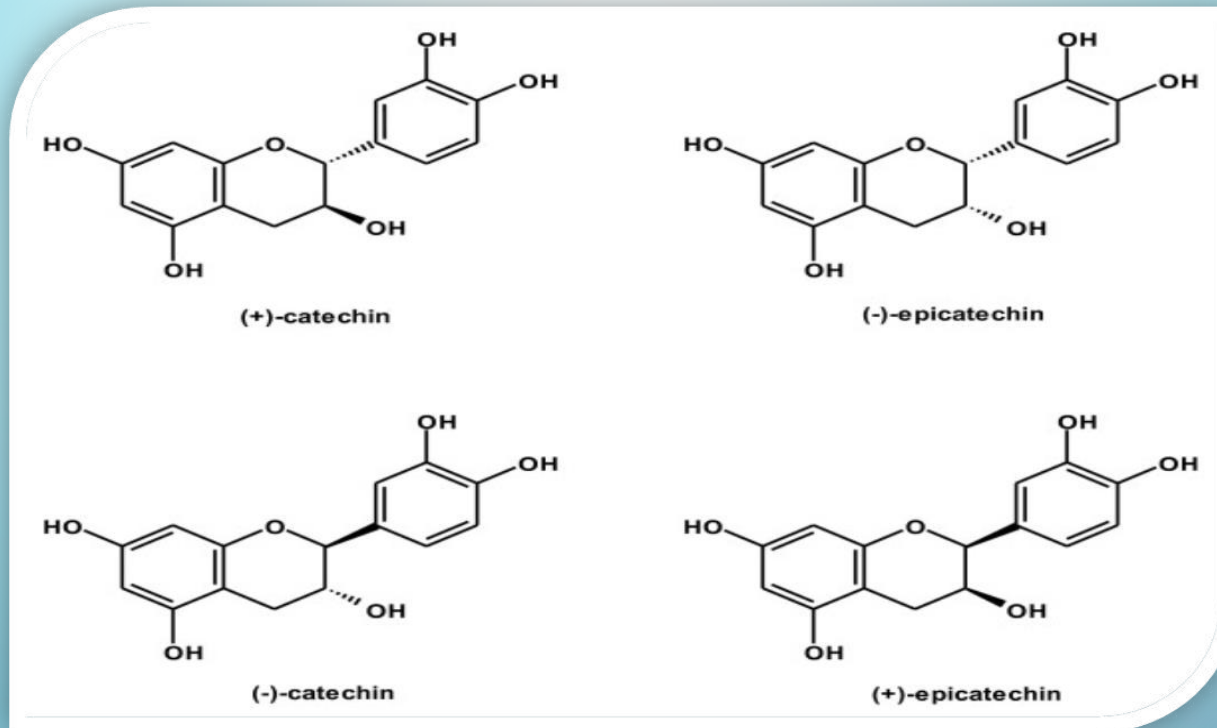
# АНТОЦИЈАНИ

- Бојата на антоцијаните директно е поврзана со рН на средината
- Во воден раствор во рамнотежа постојат неколку структури на антоцијани и тоа: флавилиум катјон (црвена боја), хиноидна база (виолетово – пурпурна боја), хемикетал(на) или карбинол(на) псевдо база (без боја) и халкон форма (жолта боја)



Трансформации на антоцијаните во зависност од рН на средината

# ФЛАВАН-3-ОЛИ



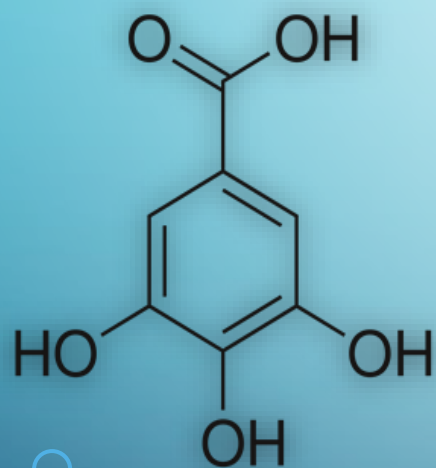
Структурни формули на флаван-3-ол мономери

- ❖ **МОНОМЕРИ:** (+)-КАТЕХИН И (-)-ЕПИКАТЕХИН
- ❖ **ДИМЕРИ:** ПРОЦИЈАНИДИНИ (В1, В2, В3, В4), ДИМЕРИ
- ❖ **ПОЛИМЕРИ:** ПРОАНТОЦИЈАНИДИНИ

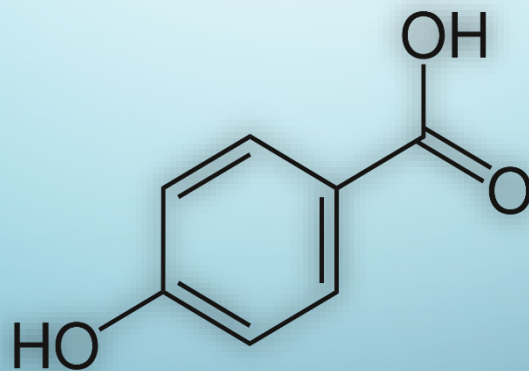


# НЕФЛАВОНОИДИ

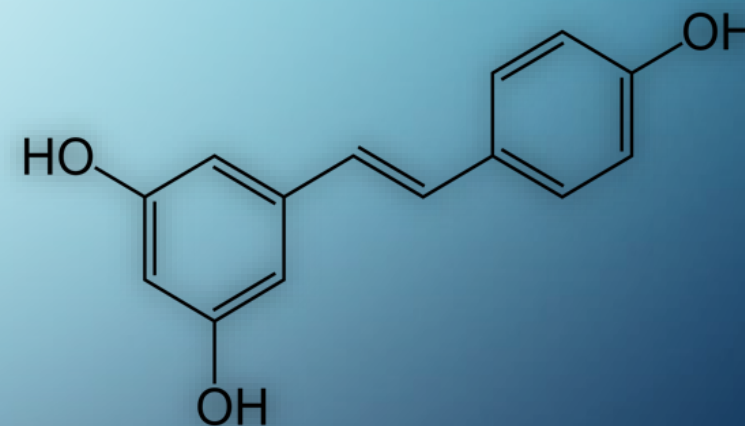
- ❑ Главни нефлавоноиди во виното и грозјето кои содржат еден ароматичен прстен се деривати на хидроксициметни и хидроксибензоеви киселини.
- ❑ Друга група на нефлавоноиди се стилбените и стилбен глюкозидите.



*Гална киселина*



*p-Дихидроксибензоева киселина*



*Ресвератрол*

# **СОРТИ НА ГРОЗЈЕ ВО РЕПУБЛИКА С. МАКЕДОНИЈА**

## **ПИНО НОАР**

- **Стара француска сорта (Бургундија).**
- **Кај нас е застапена во Велешко, Кумановско, Овчеполско виногорје.**
- **Гроздот е мал валчесто издолжен а зрното е со средно дебела лушпа и со темносина боја.**
- **Има висока отпорност на зимски и ниски температури**
- **Виното добиено од оваа сорта е комплексно, хармонично и со рубин црвена боја, ароми на црна рибизла со зачински хербални ноти како и комплексен вкус на малина и јагода.**



# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

## *Производство на примероци од 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 Hightperformance Liquid Chromatografy (Agilent 1290 UHPLC instrument)**
- ❖ **Agilent 6530 Accurate- Mass Q-TOF**
- ❖ **CORTEX UPLC C18** колона (2,1 x 150 mm , 1,6  $\mu\text{m}$ )
- ❖ **Градиентно елуирање (елуент А 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  во вода, елуент В 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  во метанол)**
- ❖ **Волумен на примерок 10 $\mu\text{L}$**
- ❖ **Филтрација 0,45 $\mu\text{m}$  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 на ниво однос 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 и тоа (гална киселина, ферулна киселина,  $p$  - кумарна киселина,  $p$  - дихидроксибензоева киселина, кафена киселина, сирингетинска киселина, рутин, , кварцетин и ресвератрол).
- Калибрациони криви
- Валидација на методата
  - LOD, LOQ, повторливост, репродукцибилност, интер дневна и интра дневна прецизност



# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ

## 12 ДЕКЕМВРИ 2022



## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

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

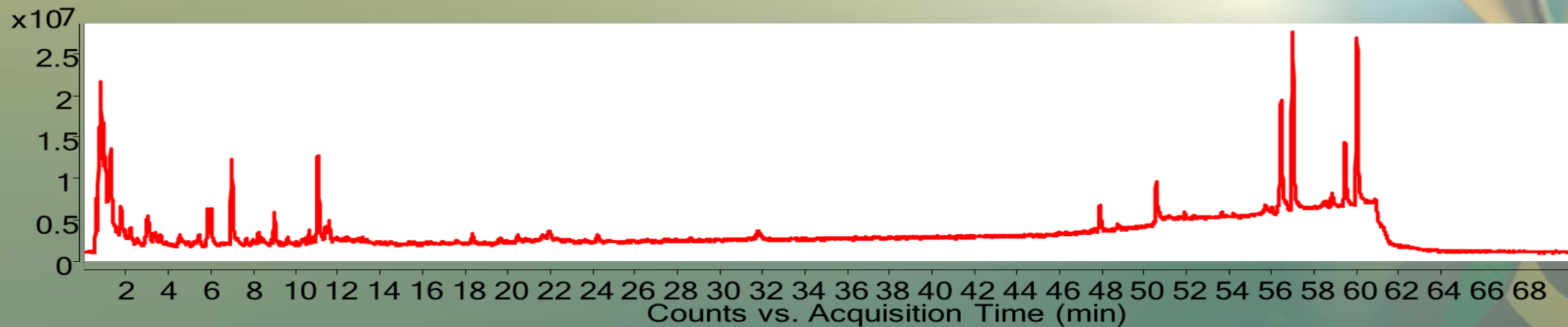
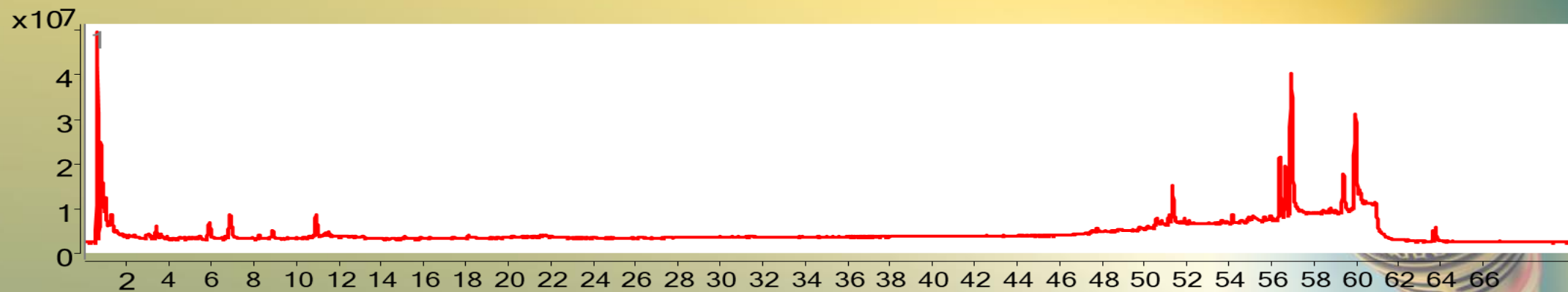
Идентификувани соединенија	Број на идентификувани соединенија
Антоцијани	12
Флаван-3-оли	11
Фенолни киселини	10
Флаваноли	7
Стилбени	4
Дихидровлаваноли	4



# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ 12 ДЕКЕМВРИ 2022



## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА



UPLC-хроматграми на вино

# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ 12 ДЕКЕМВРИ 2022



## 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



# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ

## 12 ДЕКЕМВРИ 2022



## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

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

Флавоноли	$t_R$	$t_R(\pm)$	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

# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ

## 12 ДЕКЕМВРИ 2022



## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

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

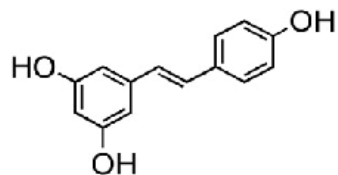
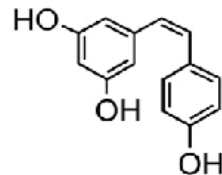
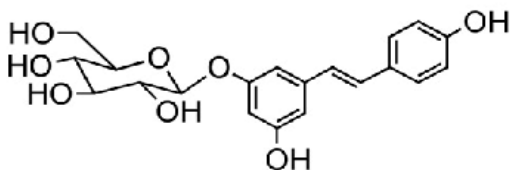
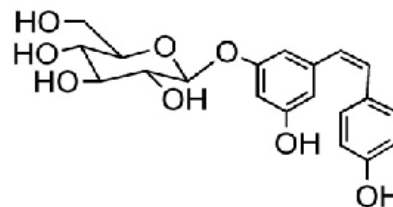
Флаван-3-оли	t <sub>R</sub>	t <sub>R</sub> (±)	MS (m/z)	MS-MS (m/z) фрагменти
(+)-Катехин	7,1	0,01	289	245, 205, 179
(-)-Епикатехин	11,0	0,02	289	245, 205, 179
(-)-Епикатехин-3-О-галат	15,1	0,02	441	289, 169
Процијанидин В2	5,4	0,03	577	451, 425, 407
Процијанидин В3	6,1	0,01	577	451, 425, 407
Процијанидин 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

*trans*-Resveratrol*cis*-Resveratrol*trans*-Resveratrol-3-*O*-glucoside*cis*-Resveratrol-3-*O*-glucoside

# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ

## 12 ДЕКЕМВРИ 2022



## 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> -кумароилглукозид	22,1	0,04	611	303
Малвидин-3- <i>p</i> -кумароилглукозид	25,1	0,01	639	331



# 13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ

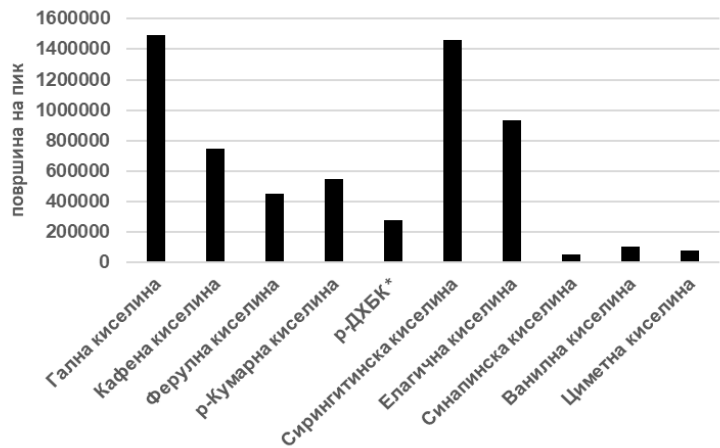
## 12 ДЕКЕМВРИ 2022



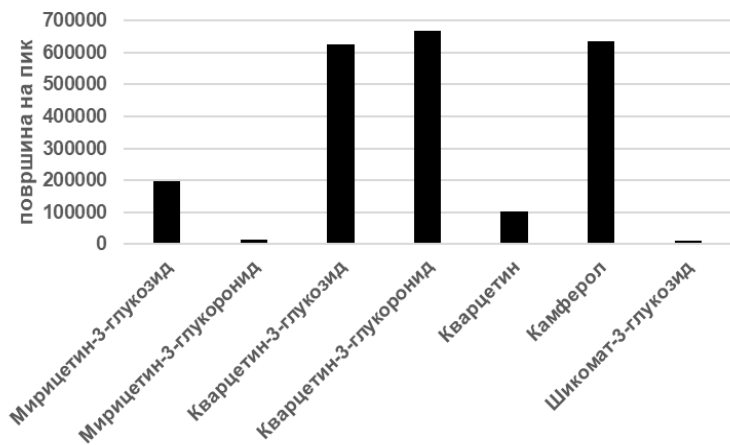
## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### Релативна квантификација на фенолните компоненти

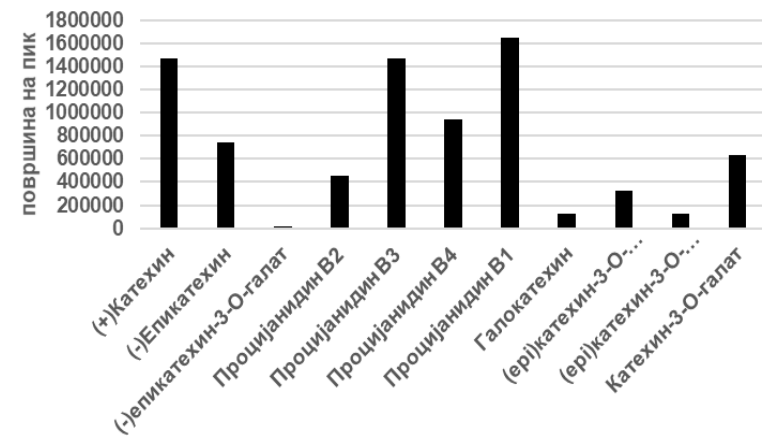
#### Фенолни киселини



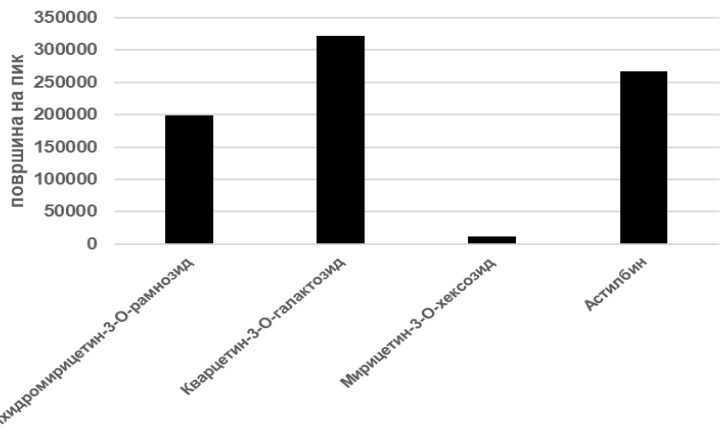
#### Флавоноли



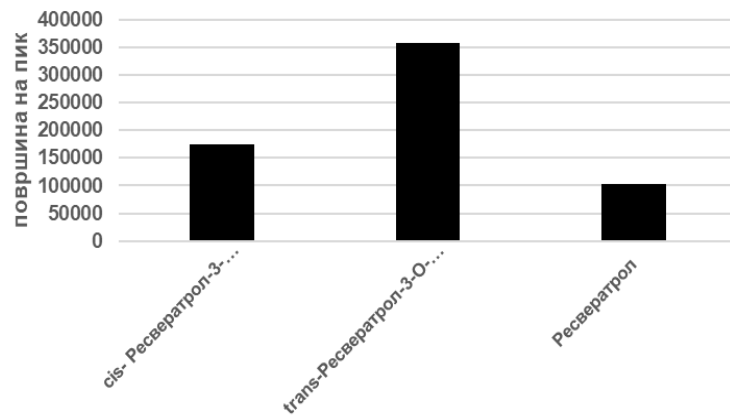
#### Флаван-3-ол



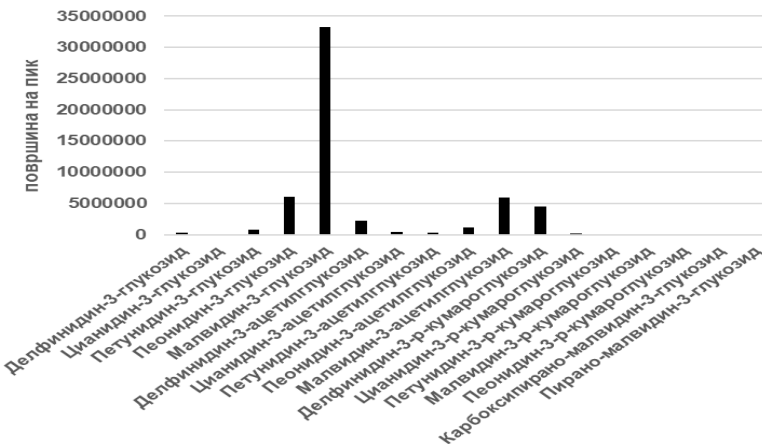
#### Дихидроксифлавоноли



#### Стилбени



#### Антоцијани





## 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**.



# 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**.

**13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ**  
**12 ДЕКЕМВРИ 2022**



**БЛАГОДАРНОСТ**

**CEERUS MOBILITY GRANT**  
**СIII-RO-0010-16-2122-M-154132**



**13 - та СМОТРА НА СТУДЕНТСКИ ТРУДОВИ**  
**12 ДЕКЕМВРИ 2022**



***БЛАГОДАРАМ НА ВАШЕТО ВНИМАНИЕ***

