



УДК 663.253.34:547.973

Аникина Надежда Станиславовна, д.т.н., с.н.с., начальник отдела химии и биохимии вина, hv26@mail.ru;

Погорелов Дмитрий Юрьевич, н.с. отдела химии и биохимии вина, pogdmi@ro.ru;

Михеева Лилия Анатольевна, м.н.с. отдела химии и биохимии вина, lili_mih@ro.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», Россия, Республика Крым, 298600, г. Ялта, ул. Кирова, 31

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОМЕРНЫХ АНТОЦИАНОВ В ВИНОГРАДНЫХ ВИНОМАТЕРИАЛАХ И ВИНАХ

Приведены результаты адаптации официального метода AOAC 2005.2 по определению мономерных антоцианов в виноградных виноматериалах и винах. Модификация метода заключалась в усовершенствовании процедуры пробоподготовки, применимой к условиям анализа и составу отечественных виноградных виноматериалов и вин разных типов. Получены основные метрологические характеристики метода в двух диапазонах измерений – для 1–100 мг/л и 100–300 мг/л. Показано, что значения показателя точности методики не превышают нормы точности и границы относительной погрешности (δ) и составляет 14 % и 10 % соответственно. Получена высокая корреляционная зависимость между результатами определения мономерных антоцианов и красящих веществ ($r = 0,85$). Установлено, что синтетические красители, внесенные для корректировки цвета образца, не вступают в реакцию, специфические для природных антоцианов. Разработан стандарт организации СТО 01580301.008–2016 Соки, сусло, виноматериалы, вина плодовые, напитки слабоалкогольные и безалкогольные. pH-дифференциальный метод позволяет получать новую информацию о состоянии фенольной системы виноградных виноматериалов и вин и может быть применен для выявления добавки синтетических красителей в винопродукцию.

Ключевые слова: pH-дифференциальный метод; AOAC; метрологические характеристики; красящие вещества; синтетические красители.

Anikina Nadezhda Stanislavovna, Dr. Techn. Sci, Senior Staff Scientist, Head of the Department of Chemistry and Biochemistry Wine;

Pogorelov Dmitrii Yurievich, Senior Staff Scientist of the Department of Chemistry and Biochemistry Wine;

Mikheieva Liliia Anatolievna, Junior Staff Scientist of Department of Chemistry and Biochemistry Wine

Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking «Magarach» of RAS», Russia, Republic of Crimea, 298600, Yalta, 31, Kirova Str.

DETERMINATION MONOMERIC ANTHOCYANINS IN GRAPE WINE MATERIALS AND WINES

The data given below contains adaptation results for the official AOAC 2005.2 method used to determine monomeric anthocyanins in grape winematerials and wines. The method was modified to improve sample preparation to better correspond to the test conditions and composition of domestic different type of grape winematerials and wines. We obtained basic metrological characteristics of the method in two measuring ranges from 1 to 100 mg/l and above 100–300 mg/l. It is shown that the accuracy of the method reference range does not exceed precision standards (relative error, δ ,%) 14% and 10% respectively. A high correlation dependence has been registered between monomeric anthocyanins and coloring substances determinations ($r = 0,85$).

It was found that synthetic colorants added to correct the sample color did not enter into reactions specific for natural anthocyanins. A Organization Standard has been developed STO 01580301.008–2016 Juices, must, wine materials, fruit wines, and low alcohol and soft drinks. pH-differential method allows obtaining new information about the phenolic system status of grape winematerials and wines, and can be applied to detect synthetic colorants in wine products.

Keywords: pH-differential method; AOAC; metrological characteristics; total anthocyanins; synthetic colorants.

Цветовые особенности красных вин связаны с составом фенольного комплек-

са, в частности, с содержанием разных форм антоцианов. Антоцианиновые пиг-

менты играют важную роль в качестве продуктов питания из-за их вклада в цвет



и внешний вид. Растущий интерес к содержанию антоцианов в продуктах питания и биологически активных добавках связан с их доказанным потенциальным положительным влиянием на здоровье человека. Содержание антоцианиновых пигментов можно использовать в качестве критерия контроля качества фруктов, соков, биологически активных добавок и натуральных красителей [1-3].

Согласно исследованиям отечественных и зарубежных ученых состав фенольного комплекса виноградных виноматериалов и вин неоднороден и имеет свои специфические отличия в сравнении с плодовым и лекарственным сырьем, сильно зависит от ряда факторов и условий, использованных при их производстве, способов и сроков выдержки винопродукции [4, 5]. При длительном хранении вин состав и строение фенольных веществ и антоцианов зачастую трансформируется под влиянием ряда каталитических и окислительно-восстановительных процессов. Как правило, результатом такой трансформации является образование аддуктов антоцианов, карбоновых кислот и процианидинов, имеющих более сложное строение и свои структурные особенности, а также вносящих существенный вклад в органолептику и цвет готового продукта [6]. Цветовые характеристики антоцианов и фенольных веществ напрямую зависят от их молекулярной массы и степени окисленности [7, 8].

Антоцианы – водорастворимые растительные пигменты, обуславливающие красную, синюю и фиолетовую окраску ягод и фруктов, а также их соков, относящиеся к классу флавоноидов и представляющие собой окрашенные растительные гликозиды антоцианидинов. Существуют 6 распространенных форм антоцианидинов (пеларгонидин, цианидин, пеонидин, дельфинидин, петунидин и мальвидин), чьи структуры варьируют в зависимости от гликозидного замещения в 3 и 5 положениях [1, 9].

В 2005 году Международная Ассоциация Официальных Аналитических Химиков (АОАС International) для анализа и физико-химического описания состава пищевой и соковой продукции предложила метод определения содержания общего количества мономерных антоцианов, на основе структурного преобразования антоцианов в диапазоне pH 1,0 - 4,5 (рис. 1). Показано, что мономерные антоцианы необратимо изменяют окраску при сдвиге pH; окрашенная форма оксония существует при pH 1,0, а окрашенный хемикеталь преобладает при pH 4,5, при этом полимерные антоцианы остаются неизменными. Результаты выражают в пересчете на цианидин-3-гликозид [9, 10].

Спектрофотометрический метод (pH-дифференциальный метод АОАС) позволяет определять массовую концентрацию мономерных антоцианов в различных пищевых продуктах (примеры): в соке ягоды

бузины – 3006,8 мг/л, в земляничном соке – 63,6 мг/л, в малиновом соке – 336,7 мг/л, в коктейле из сока клюквы – 13,6 мг/л, в концентрированном виноградном соке – 640,8 мг/л [9]. Содержание мономерных антоцианов в виноградных соках, установленное pH-дифференциальным методом, положительно коррелирует с содержанием фенольных веществ, антиоксидантной активностью и цветовыми характеристиками [11].

Адаптация методики определения общего содержания мономерных антоцианов методом pH-дифференциальной спектрофотометрии первично была осуществлена для анализа растительного сырья лекарственного и фармацевтического назначения, продуктов его переработки, биологически активных добавок соковой продукции [12, 13]. Установлена высокая линейная корреляция ($r > 0,925$, $p \leq 0,05$) между результатами определения содержания мономерных антоцианов в образцах пищевых продуктов, полученных методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и pH-дифференциальной спектрофотометрии [10]. Заявленный метод представляет собой простой и экономичный метод определения антоцианов для лабораторий, не оснащенных жидкостным хроматографом, однако в настоящий момент не является общепринятым при анализе винопродукции. В энхимических исследованиях винограда и вина используются методики, основанные на традиционных методах анализа (колориметрия, ВЭЖХ) [3, 14], и с применением сложного высокотехнологического оборудования (хромато-масс-спектрокопия, метод ядерно-магнитного резонанса [15]).

Таким образом, *цель настоящей работы* – адаптация pH-дифференциального метода определения мономерных антоцианов для анализа виноградных виноматериалов и вин разных типов.

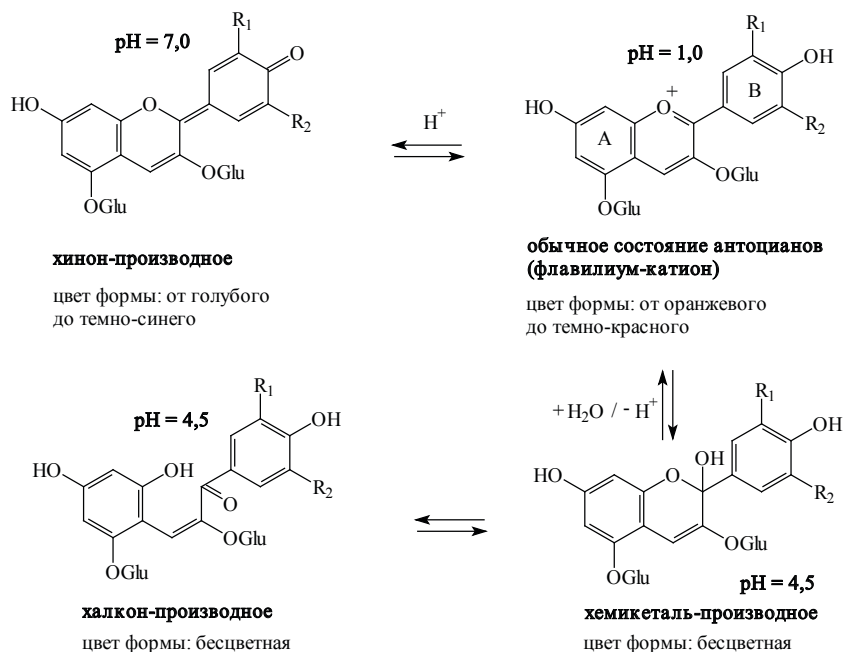


Рис. 1. Преобладающие структурные формы антоцианов при различных уровнях pH

ние окончательного результата проводят по следующей формуле (в пересчете на цианидин-3-моногликозид):

$$C = (A_1 - A_2) \cdot \frac{M \cdot K}{l \cdot \epsilon} \cdot 1000$$

где A_1 – разность значений оптических плотностей проб при длинах волн 520 нм (D_{520}) и 700 нм (D_{700}) соответственно в растворе с рН 1,0; A_2 – разность значений оптических плотностей проб при длинах волн 520 нм (D_{520}) и 700 нм (D_{700}) соответственно в растворе с рН 4,5; M – молекулярная масса цианидин-3-моногликозида, 449 г/моль; K – кратность разбавления; ϵ – коэффициент молекулярной экстинкции цианидин-3-моногликозида, 26900 л/(моль·см); l – расстояние между рабочими гранями в кювете, 1 см; 1000 – коэффициент пересчета в мг/л.

Массовую концентрацию суммы мономерных антоцианов рассчитывают с учетом разведения пробы, вычисления проводили до первого десятичного знака после запятой, а результат выражали в мг/л. Расхождение между двумя параллельными определениями (в процентах от среднего значения), выполненных в условиях повторяемости, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) готн при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Нами были проведены метрологические исследования метода согласно РМГ 61-2010 «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки» [17]. Измерения осуществлялись в 5 повторностях тремя исследователями в пределах одной лаборатории. В качестве образцов для оценивания были выбраны красные столовые и ликерные вина. В результате исследований установлены основные метрологические характеристики метода (табл. 1), которые представлены в разработанном нами стандарте организации (СТО) [18].

Поскольку отсутствует контрольный метод измерения содержания суммы мономерных антоцианов в виноградном сусле, виноматериалах и винах, значения показателя точности сравнивали с ближайшим аналогом – ГОСТ 32709-2014 Продукция соковая. Методы определения антоцианинов [19]. Сравнение двух документов (табл. 2) показывает, что СТО учитывает особенности аналитических измерений в виноградных соках, сусле, виноматериалах и винах и другой винопродукции, которые отсутствуют в ГОСТ 32709. Значения показателя точности разработанного метода не превышает нормы точности (границы относительной погрешности, δ , %), представленной в ГОСТ 32709.

Среди большинства аналитических методов, наибольшей популярностью пользуются способы, основанные на оценке спектральных и колориметрических характеристик пробы, как

наиболее доступные и простые в исполнении. В энохимии широко используют экспресс-метод определения массовой концентрации красящих веществ, основанный на способности антоцианов переходить в кислой среде в ярко окрашенную форму, интенсивность которой фиксируют при длине волны 530 нм [16].

Аналитические исследования двумя методами объектов виноградской и не виноградской природы (рис.2) показали достаточно высокую корреляцию между результатами измерений (коэффициент корреляции $r = 0,85$). В образцах виноматериалов и вин (№ 1-8) содержание красящих веществ превышало содержание мономерных антоцианов в 2-3

Таблица 1
Основные метрологические характеристики метода

Наименование показателя ($P = 0,95; n = 2$)	Значение показателя при диапазоне измерения массовой концентрации, мг/л	
	5-100	100-300
Предел повторяемости (сходимости) r , мг/л	3,0	11,2
Предел воспроизводимости R , мг/л	7,7	30,0
Граница абсолютной погрешности, $\pm \Delta$	5,5	21,2
Предел обнаружения метода, мг/л	1,0	



Рис. 2 Соотношение массовых концентраций антоцианов, определенных разными методами, в различных объектах: 1 – виноматериал из винограда сорта Каберне-Совиньон; 2 – виноматериал из винограда сорта Мерло; 3 – вино красное столовое из винограда сорта Саперави; 4 – вино красное столовое сухое; 5 – вино ликерное типа портвейн; 6 – вино ликерное типа кагор; 7 – вино розовое столовое; 8 – сок черники; 9 – сок черной смородины; 10 – экстракт цветов гибискуса; 11 – вино розовое столовое + синтетический краситель; 12 – виноматериал белый столовый + натуральный краситель

Сравнительный анализ ГОСТ 32709 и СТО 01580301.008

ГОСТ 32709 [19]	СТО 01580301.008 [18]
1. Область применения	
Соки и продукция на их основе	Соки, сусло, виноматериалы виноградные и плодовые, тихие и игристые вина, слабоалкогольная продукция
2. Предел измерений	
Общий предел 5-5000 мг/л Диапазон определения: 5-500; 100-1000; 1000-5000 мг/л. Выражение результата в единицах массовой концентрации (мг/л) для однородных жидких проб и массовой доли (млн ⁻¹) для проб, содержащих взвеси	Общий предел 5- 300 мг/л Диапазон определения: 5-100; 100-300 мг/л. Выражение результата в единицах массовой концентрации (мг/л)
3. Ссылка на прототипы	
Нет	Является гармонизацией общепринятого международного метода AOAC 2005.02
4. Предварительная подготовка пробы	
Разбавление пробы по навеске для вязких и плохо осветляющихся жидкостей, либо с применением аликвоты пробы по объему. Отделение фугата либо фильтрация в небольшом объеме аликвоты	Отделение взвесей центрифугированием, обязательная дегазация в случае анализа игристых и сатурированных диоксидом углерода вин. Учет кратного разбавления аликвоты перед делением взвесей в случае их наличия
5. Подготовка реактивов	
Слабые растворы соляной кислоты, хлорида калия и ацетата натрия, без учета разбавления пробы в конечной формуле при расчете	Концентрации рабочих буферных растворов соответствуют прототипу
6. Обработка конечного результата	
Выражение либо в долях (млн ⁻¹), либо в единицах массовой концентрации (мг/л). Одинаковые по значению погрешности для каждого из диапазонов, вне зависимости от выбранного способа выражения результата. Границы относительно погрешности δ , % – 7-14%	Выражение в единицах, общепринятых при описании состава винопродукции (мг/л). Границы относительно погрешности δ , % – 10-14%
Содержание суммы антоцианов в пробе независимо от состояния фенольных веществ на момент анализа, что может приводить к получению заниженного результата в сравнении с другими общепринятыми в виноделии методами	Содержание только мономерных форм антоцианов в пробе на момент анализа. Содержание полимерных форм антоцианов и их аддуктов и веществ более сложного строения фенольной природы устраняется условиями определения, что согласуется с прототипом метода
7. Проверка приемлемости полученных результатов	
Есть	Нет (недостаток метода)

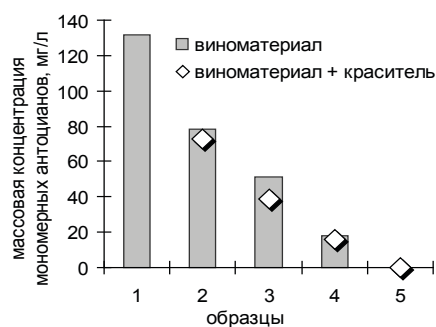


Рис. 3. Содержание мономерных антоцианов в модельных образцах: 1 – красный виноматериал; 2–4 купажи №1–3 (представлены в методической части); 5 – белый виноматериал

раза. Соотношение исследуемых показателей в соках черники и черной смородины (№ 8–9) составляло 1:10, в соке цветов гибискуса (№ 10) – 1:3. В варианте с добавкой синтетических красителей (№ 11) мономерные антоцианы не были определены. Содержание красящих веществ в пробе с добавкой натурального красителя (№ 12) превысило содержание мономерных антоцианов в 26 раз.

Исследование содержания в виноградных виноматериалах и винах фенольных веществ, определённых с реактивом Фолина-Чокальтеу, и мономерных антоцианов, определённых рН-дифференциальным методом, не выявило тесной связи между этими показателями ($r = 0,1$), что обусловлено особенностями состава и дисперсностью фенольного комплекса, а также различной способностью мономерных и полимерных фракций фенольных веществ реагировать на сдвиг рН-среды. Общее же содержание суммы фенольных веществ, определённых по методу Фолина-Чокальтеу, слабо зависит от молекулярной массы и структурных особенностей антоцианов.

Варьирование массовой концентрации фенольных веществ путем разбавления красного столового виноматериала белым показало, что содержание мономерных антоцианов снижалось пропорционально уменьшению доли красного виноматериала в купаже (рис. 3). Внесение в модельные образцы смеси синтетических красителей для корректировки цвета не оказало влияния на значение показателя содержания мономерных антоцианов, поскольку данные добавки не вступают в реакции, специфические для природных

антоцианов (СТО 01580301.008), в отличие от колориметрического способа определения массовой концентрации красящих веществ, что является ее несомненным преимуществом.

Таким образом, получены метрологические характеристики и разработан стандарт организации на рН-дифференциальный метод определения мономерных антоцианов в виноградных виноматериалах и винах разных типов, который позволяет получать новую информацию о состоянии их фенольной системы и может быть применен при выявлении добавки синтетических красителей в винопродукцию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wrolstad R.E. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products/ Wrolstad R.E., Durst R.W., Leeb J. // Trends in Food Science & Technology, 2005. – № 6. – P. 423–428.
2. The application of the single pH and pH differential methods for the determination of the anthocyanin contents in strawberry and blueberry juice / Wild About Blueberries TIPS, RECIPES & MORE, April 8, 2016. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.wildblueberries.com/research/the-application-of-the-single-ph-and-ph-differential-methods-for-the-determination-of-the-anthocyanin-contents-in-strawberry-and-blueberry-juice>. – Дата обращения (17.01.2017).
3. Аникина Н.С. Методические основы идентификации аутентичности виноградных виноматериалов и вин / Н.С.Аникина // Магарач. Виноградарство и виноделие. Сб. научн. трудов. – Ялта, 2012. – Том XLII. – С.86–89.
4. Danişman G. Kinetic Analysis of Anthocyanin Degradation and Polymeric Colour Formation in Grape Juice during Heating / Danişman G., Ganiler E., Toklucu A. // Czech J. of Food Sci. – V. 33. – 2015. – №2. – PP.103–108. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/148541.pdf> – Дата обращения (09.02.2017).
5. Aşkin B. Color, phenolic composition, and antioxidant properties of hardaliye (fermented grape beverage) under different storage conditions / Aşkin B., Atik A. // Turkish J. of Agricult. and Forestry – V. 40. – 2016. – PP. 803–812. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-16-40-6/tar-40-6-1-1602-111.pdf> – Дата обращения (09.02.2017).
6. Marquez A. Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation during Winemaking / Marquez A., Serratos M., Merida J. – J. of Chem. – V. 2013. – 15 p. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.researchgate.net/profile/Julietta_Merida/publication/258397486_Pyranoanthocyanin_Derived_Pigments_in_Wine_Structure_and_Formation_during_Winemaking/links/00b7d533a6aebb7b39000000.pdf – Дата обращения (09.02.2017).
7. Ribereau-Gayon P. Handbook of Enology. The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments // Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. – Vol. 2. – 2006. – 450 p.

8. Fei He. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines II. Anthocyanin Derived Pigments and Their Color Evolution // Fei He, Na-Na Liang, Lin Mu, Qiu-Hong Pan, Jun Wang, Malcolm J. Reeves et al. – Molecules. – 2012. – V. 17. – PP. 1483–1519. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pdfs.semanticscholar.org/0abb/43cb8cfa71dde62ff659797bcce975a12ba0.pdf> – Дата обращения (09.02.2017).

9. Lee J. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study / J. Lee, R. Durst, R. Wrolstad // J. of AOAC Int. – 2005. – V. 88. – № 5. – P. 1269–1278.

10. Lee J. Comparison of two methods for anthocyanin quantification // Lee J., Rennaker C., Wrolstad R. / Acta horticulturae. – 2009. – V. 2. – № 810. – PP.831–834. : [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://handle.nal.usda.gov/10113/28983>. – Дата обращения (13.01.2017).

11. Burin V.M. Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice / Burin V.M., Falcão L.D., Gonzaga L.V. et al // Ciênc. Tecnol. Aliment. – V. 30. – №4. – 2010. – pp. 1027–1032. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v30n4/v30n4a30.pdf> – Дата обращения (09.02.2017).

12. Перова И. Б. Исследование содержания и специфического профиля антоцианов лекарственного растительного сырья: диссертация ... кандидата фармацевтических наук: 14.04.02 / Перова Ирина Борисовна; [Место защиты: Первый медицинский университет им. И.М.Сеченова]. – Москва, 2015. – 171 с.

13. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 240 с.

14. Остроухова Е.В., Пескова И.В., Пробейголова П.А. Технологическая оценка винограда красных сортов из разных природно-климатических зон Крыма / Е.В.Остроухова, И.В. Пескова, П.А. Пробейголова // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2014. – № 2. – С. 21–23.

15. Шестернин В.И. Разработка технологии натуральных красных вин и винных напитков из ранних сортов винограда, культивируемого в Алтайском крае: дисс. ... канд. техн. наук: 05.18.01 / Шестернин Владимир Игоревич. – Бийск, 2015. – 200 с.

16. Методы теххимического контроля в виноделии / Под ред. В.Г. Гержиковой. – Симферополь: Таврида, 2009. – 304 с

17. РМГ 61–2010 «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки». Москва: Стандартинформ, 2013. – 58 с. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.meganorm.ru/Index2/1/4293795/4293795453.htm> – Дата обращения (10.01.2017).

18. СТО 01580301.008–2016 Соки, сусло, вино-материалы, вина плодовые, напитки слабоалкогольные и безалкогольные. Определение массовой концентрации суммы мономерных антоцианов рН-дифференциальным методом. – Ялта, 2016. – 11 с.

19. ГОСТ 32709–2014 Продукция соковая. Методы определения антоцианов. – М.: Стандартинформ, 2014. – 17 с.

Поступила 09.02.2017
©Н.С.Аникина, 2017
©Д.Ю.Погорелов, 2017
©Л.А.Михеева, 2017