

KORELACIJA SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA SA ANTIOKSIDATIVNOM AKTIVNOŠĆU CRVENIH VINA SA PODRUČJA REGIJE BANJA LUKA

*Zoran Kukrić¹, Ivan Samelak², Goran Vučić¹, Ladislav Vasilišin¹,
Novak Kukrić³*

Izvod: U ovom radu određena je antioksidativna aktivnost 3 uzorka crvenih vina primjenom gašenja 1,1- difenil- 2- pikrilhidrazil (DPPH)- stabilnog radikala, 2,2'- azino-bis- (3-etilbenzotiazolin- 6- sulfonska kiselina) (ABTS) stabilnog radikala, kao i Briggs-Rauscherove oscilatorne reakcije. Urađena je i korelacija ovih antioksidativnih metoda sa sadržajem ukupnih fenola u navedenim uzorcima crvenih vina. Sadržaj ukupnih fenola se mijenjao u rasponu 1790,67- 3209,97 mgGAE/L. Antioksidativna aktivnost dobijena DPPH testom od 15,45- 17,08 mmol_{Trolox}/L_{vina}, ABTS testom od 23,21- 24,14 mmol_{Trolox}/L_{vina}, te Briggs - Rauscherovom oscilatornom metodom 1,826- 3,848 mmol_{Trolox}/L_{vina} respektivno.

Sadržaj ukupnih fenola pokazuje značajnu korelaciju sa ABTS testom (0.55), te vrlo visoku korelaciju sa Briggs- Rauscherovim oscilatornim reakcijama (0.99).

Ključne reči: crveno vino, Antioksidativna aktivnost, ukupni fenoli, DPPH, ABTS, Briggs- Rauscherove oscilatorne reakcije.

Uvod

Prirodno je da se u ljudskom organizmu stvaraju slobodni radikali. Pretjerana produkcija ovih reaktivnih specija za vrijeme oksidativnog stresa može prouzrokovati oštećenje biomolekula i indukovati razvoj hroničnih kardiovaskularnih bolesti, starenje i rak. Štetni uticaj slobodnih radikala može biti inhibiran sredstvima s antioksidativnom sposobnošću.

Crvena vina imaju visok sadržaj fenolnih jedinjenja i blagotvorno djeluju na zdravlje ljudi upravo zbog svojih antioksidativnih osobina (J. Yang i sar., 2009, Marković i Talić, 2013). Takođe imaju veliki uticaj na organoleptička svojstva, naročito na boju, gorčinu i trpkost (Hernanz i sar., 2007).

Jedna od metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti fenola u vinu je i Briggs-Rauscher oscilatorne reakcije. Nakon dodavanja antioksidansa u Briggs-Rauscher smjesu dolazi do trenutnog gašenja oscilacija. Ovo vrijeme bez oscilacije predstavlja inhibiciju oscilirajuće reakcije (vrijeme inhibicije IT) koja je linearno zavisna od koncentraciji antioksidansa. Kada je inhibicija završena, oscilacije se nastavljaju (Höner i sar., 2002).

¹Tehnološki fakultet Banja Luka, Stepe Stepanovića 75, Banja Luka, Republika Srpska (z.kukric@gmail.com)

² Prirodno-matematički fakultet Banja Luka, Mladena Stojanovića 2, Banja Luka, Republika Srpska

³Makros, Banja Luka, Đure Jakšića 5, Republika Srpska

Cilj rada je da se u tri uzorka crvenog vina sa područja Banjaluke odredi sadržaj fenola te njihova antioksidativna aktivnost koristeći tri različita testa, kao i da se te aktivnosti međusobno uporede.

Materijal i metode rada

U istraživanju su korišćena tri uzorka crvenog vina sorte *Cabernet Sauvignon*. Uzorci su nabavljeni od tri individualna proizvođača sa tri različita lokaliteta uzgoja (Aleksandrovac, Slatina, Verići) na području opštine Banjaluka, i označeni kao V1, V2, V3. Ukupni fenoli su određeni modifikovanom metodom Folin-Ciocalteu (Wolfe, 2003). Rezultati su izraženi kao fenoli ekvivalentni galnoj kiselini, tj. mgGAE/L_{vina}.

Antioksidativna aktivnost uzorka na neutralizaciju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH test) određen je metodom Liyana-Pathiranan i Shahidi (Liyana-Pathirana, 2005), a za neutralizaciju 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS⁺ test) korišćena je modifikovana metoda Re i saradnika (Re, 1999).

Rezultati su predstavljeni TEAC vrijednošću (Trolox ekvivalent antioksidativne aktivnosti), tj. kao mmol_{Trolox}/L_{vina} i za DPPH i za ABTS⁺ test. Određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka određen je i Briggs-Rauscher-ovim oscilatornim reakcijama (Cervellati i sar, 2001) koje se odvijaju u nizu međusobno povezanih redox reakcija tačno definisanih sastojaka. Rezultati su predstavljeni kao mmol Trolox/L_{vina}. Sve korištene hemikalije i rastvarači su bili p.a. stepena čistoće. Eksperimenti su rađeni u 3 paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Korištena je analiza varijanse (ANOVA) a najmanja značajna razlika (LSD) pri p<0.05 je izračunata korištenjem programa Origin Pro 8.0. Koeficijent korelacije je određen prema Pearson-u.

Rezultati istraživanja i diskusija

U tabeli 1 prikazane su vrijednosti koncentracije ukupnih fenola, kao i antioksidativne aktivnosti u odnosu na stabilne slobodne radikale ABTS⁺ i DPPH, te antioksidativna aktivnost izražena Briggs- Rauscher-ovim oscilatornim reakcijama za analizirane uzorke crvenih vina. Koncentracija ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima se kretala od 1790.67 (V3) do 3209.97 mg GAE/L (V2). Statističkom analizom rezultata, primjenom analize varijanse Anova, utvrđeno je da se rezultati statistički razlikuju (p<0,05). Rezultati su bili u skladu sa literaturnim (Marković, Talić, 2013; Seruga i dr, 2011; Porgali 2012; Di Majo 2008; Jiang 2012). Ovako velike razlike u sadržaju ukupnih fenola istraženih crvenih vina iz različitih zemalja vjerovatno su rezultat različitih ispitivanih sorti grožđa, položaja vinograda, različite klime, tipa tla, različite tehnike obrade vina i starenja.

Antioksidativna aktivnost uzoraka u odnosu na DPPH radikal je u opsegu 15,44 do 17,08 mmol_{Trolox}/L_{vina} i značajno je manja od aktivnosti prema ABTS radikalima koja se kretala u opsegu od 23,36 do 24,12 mmol_{Trolox}/L_{vina}. Kod DPPH testa statistički značajnu razliku pokazuju uzorci V1 i V3 (p<0,05) dok kod ABTS testa nema statistički značajne razlike među uzorcima. Ukupni antioksidativni kapaciteti određeni DPPH i ABTS testom kod drugih autora pokazuju slične vrijednosti i kretao se DPPH test u opsegu 3,86 – 37,8 mmol_{Trolox}/L_{vina}, a za ABTS test u opsegu 7,9-44,78 mmol_{Trolox}/L_{vina}

(Büyüktuncel i sar., 2014; Fernandez- Pachon i sar., 2004; Seruga i sar., 2011; Li i sar., 2009; Jiang i sar., 2012; Xi i sar., 2013.

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti izražene različitim antioksidativnim metodama za ispitivane uzorke crvenih vina
 Table 1. Total phenols content and antioxidative activities presented by different antioxidative methods for tested samples of red wines

| Uzorak vina Wine Sample | V1 | V2 | V3 |
|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Ukupni fenoli mgGAE/L Total Phenols mgGAE/L | 2987.65±101.92 ^a | 3209.97±126.09 ^b | 1790.67±75.14 ^c |
| ABTS mmolTrolox/L vina ABTS mmolTrolox/L wine | 23.52 ±5.18 ^a | 24.12±4.73 ^a | 23.36±3.94 ^a |
| DPPH mmolTrolox/L vina DPPH mmolTrolox/L wine | 15.44±3.90 ^a | 16.6 ±7.50 ^{a,b} | 17.08 ±9.84 ^b |
| Briggs-Rausher mmolTrolox/L vina Briggs-Rausher mmolTrolox/L wine | 3.848±0.15 ^a | 3.203±0.16 ^b | 1.826±0.08 ^c |

(± standardna devijacija 3 paralelna ponavljanja)

^{abc}različita slova u eksponentu u tabeli ukazuju na statistički značajnu razliku između vrijednosti, pri nivou značajnosti od p<0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa)

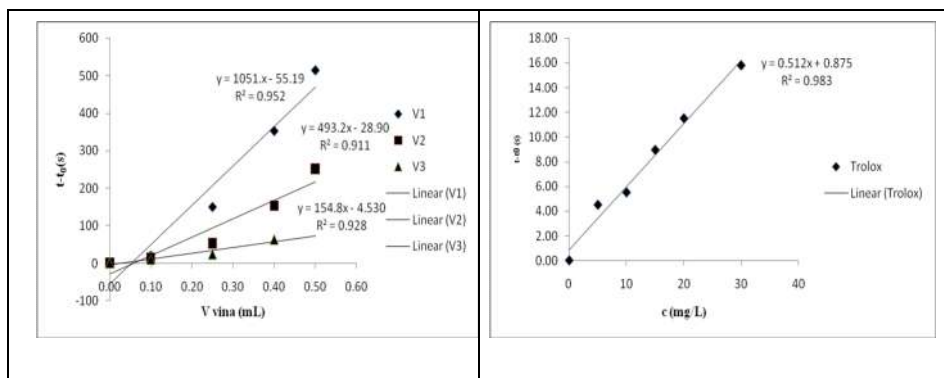
Iz navedenih literaturnih podataka, kao i iz dobijenih rezultata vidljivo je da vrijednosti Trolox ekvivalenta za navedene antioksidativne testove DPPH i ABTS osciluju u širokom rasponu. Ovo je i očekivano jer se prvenstveno razlikuju metodologije navedenih antioksidativnih testova, kao i eksperimentalni uslovi, a prvenstveno i vrste crvenih vina kao i način njihove pripreme.

Antioksidativne aktivnosti određene Briggs- Rausherovim oscilatornim reakcijama prikazana je na grafikonu 1, kao odnos inhibicionog vremena i zapremine ispitivanog vina. Relacija je linearna a veličina nagiba ukazuje na jačinu antioksidativne aktivnosti. Što je veći nagib to antioksidant ima veću aktivnost. Vrijednosti nagiba su bile za V3-154,8, V2-493,2 i V1-1051, i bile su u saglasnosti sa literaturim podacima (Marković i sar. 2015, Marković i Talić 2013). Takođe, kapacitet antioksidansa (u ovom slučaju vino) je kvantifikovan izračunavanjem „Relativnog djelovanja antioksidansa“ (Relative Antioxidant Performance RAP), koji predstavlja odnos nagiba standardnog jedinjenja (u ovom slučaju Troloxa, grafikon 2) i uzorka. Vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobijene Briggs - Rausherovim oscilatornim reakcijama imale su vrijednosti 3,848 (V1); 3,203 (V2) i 1,826 (V3) mmol_{Trolox}/L_{vina} i međusobno su se statistički razlikovale.

Izvršena je korelaciona analiza antioksidativnih aktivnosti koje su određene na tri načina sa sadržajem ukupnih fenola u uzorcima vina, kao i međusobna korelacija samih antioksidacionih metoda što je prikazano u tabeli 2. Ukupni fenoli pokazuju visoku povezanost sa Brigs-Rauscher-ovim reakcijama i značajnu povezanost sa ABTS testom što je u potpunosti u skladu sa literaturnim podacima (Marković i sar., 2015; Marković i Talić, 2013), međutim prema DPPH testu pokazuju značajnu ali negativnu povezanost.

DPPH test pokazuje laganu povezanost sa ABTS testom dok sa Brigs-Rauscher-ovim reakcijama značajnu ali negativnu povezanost. Povezanost ABTS testa i Brigs-Rauscher-ovih reakcija je značajna što ukazuje na sličan reakcioni mehanizam.

Kao što je rečeno, nije pronađena značajna korelacija između antioksidativne aktivnosti određene pomoću DPPH i Briggs- Rauscherove reakcijske metode. To je , vjerovatno, zbog različitih antioksidativnih mehanizama uključenih u korišćene metode. Neki nalazi iz literature pokazuju visoke korelacije za vino između navedenih analiza (Marković i Talić, 2013; Katalinić, 2004,). Međutim, naši su rezultati u saglasnosti s onima koje je dobio Fotakis (Fotakis i sar., 2015) i koja je pokazala slabu povezanost ovih reakcionih metoda.



Grafikon 1. Nagib pri Briggs Rausherovim oscilatornim reakcijama za ispitivane uzorke vina
Graph 2. Slope at Briggs Rausher's oscillatory reactions for examined wine samples

Grafikon 2. Nagib pri Briggs Rausherovim oscilatornim reakcijama za Trolox
Graph 3. Slope at Briggs Rausher's oscillatory reactions for Trolox

Tabela 2. Koeficijent korelacije za date metode
Table 2. Correlation coefficient for the given methods

| | Ukupni fenoli Total phenols | DPPH | ABTS | B-R-T |
|---------------|--------------------------------|---------|--------|----------|
| Ukupni fenoli | 1 | -0,5559 | 0,5502 | 0,9946 |
| DPPH | | 1 | 0,3882 | -0.46669 |
| ABTS | | | 1 | 0,6336 |
| B-R-T | | | | 1 |

Zaključak

Očito da se antioksidativna aktivnost ne može pripisati samo sadržaju ukupnih fenola nego se moraju uzeti u obzir i ostali sekundarni metaboliti koji su prisutni u vinu. Takođe, da bi se donio određen zaključak pri ispitivanju antioksidativnih osobina nekog uzorka ne bi se trebalo osloniti samo na jedan antioksidativni test nego pri određenim uslovima koristiti više testova koji su na raspolaganju. Jedna od prednosti korišćenja Briggs-Rauscher oscilatornih reakcija je pH vrijednost izvođenja ovih reakcija koja je oko 2, što je slično onom pH u fluidima glavnog probavnog procesa

(ljudski želudac), tako da se mogu dobiti *in vitro* informacije o antioksidativnoj aktivnosti u "stvarnim uslovima digestije". Ove informacije mogu pomoći u procjeni ishrane za održavanje zdravlja i prevencije bolesti.

Literatura

- Büyüktuncel, E., Porgali, E., Colak, C. (2014). Comparison of Total Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Local Red Wines Determined by Spectrophotometric Methods. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1660-1667
- Cervellati, R., Höner, K., Furrow, S.D., Needens, C., Costa, S. (2001). The Briggs-Rauscher Reaction as a Test of measure the activity of antioxidants. *Helv. Chim. Acta*, 84, 3533-3547.
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., Giammanco, M. (2008) The Antioxidant Capacity of Red Wine in Relationship with Its Polyphenolic Constituents. *Food Chemistry*, 111, 45-49.
- Fernández-Pachón, M.S., Villano, D., Garcí a-Parrilla, M.C. and Troncoso, A.M. (2004) Antioxidant Activity of Wines and Relation with Their Polyphenolic Composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 113-118.
- Fotakis C., Christodouleas D., ZervouM., PapadopoulosK. and Calokerinosa A. C.(2012). Classification of wines based on different antioxidant responses to spectrophotometric analytical. *Analytical Letters*, 45,581–591
- Hernanz, D., Recamales, A.F., Gonzales- Miret, M.I., Gomez- Miguez, M.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *Int. J. Food Eng.*, 80, 327-335.
- Höner, K., Cervellati, R. (2002). Measurements of antioxidant capacity of fruits and vegetables using the BR reaction method. *European Food Research and Technology*, 215(5), 437-442.
- Jiang, B. and Zhang, Z.W. (2012) Comparison on Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Cabernet Sauvignon and Merlot Wines from Four Wine Grape-Growing Regions in China. *Molecules*, 17, 8804-8821.
- Katalinić, V., Miloš, M., Modun, D., Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparasion with (+)-catechin. *Food Chem.*, 86, 593–600.
- Li, H., Wang, X.Y., Li, Y., Li, P.H. and Wang, H. (2009) Polyphenolic Compounds and Antioxidant Properties of Selected China Wines. *Food Chemistry*, 112, 454-460.
- Liyana-Pathiranan, C.M., Shahidi, F. (2005). Antioxidant Activity of Commercial Soft and Hard Wheat (*Triticum aestivum* L.) as Affected by Gastric pH Conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (7), 2433-2440.
- Marković, M., Talić, S. (2013). Antioksidacijska aktivnost odabranih hercegovačkih vina. *Kem. Ind.*, 62 (1-2), 7-12.
- Marković, M., Martinović Bevanda, A., Talić S.; (2015) *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 44, 1-4
- Porgali, E. and Buyuktuncel, E. (2012) Determination of Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Native Red Wines by High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometric Methods. *Food Research International*, 45, 145-154.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9–10), 1231–1237.
- Seruga, M., Novak, I. and Jakobek, L. (2011) Determination of Polyphenols Content and Antioxidant Activity of Some Red Wines by Differential Pulse Voltammetry, HPLC and Spectrophotometric Methods. *Food Chemistry*, 124, 1208- 1216.
- Wolfe K., Wu, X., Liu, R.H. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (3), 609-614 .
- Xi, Z.M., Meng, J.F., Huo, S.S., Luan, L.Y., Ma, L.N. and Zhang, Z.W. (2013) Exogenously Applied Abscisic Acid to Yan73 (*V. vinifera*) Grapes Enhances Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Its Wine. *International Journal of Food Sciences Nutrition*, 64, 444-451.
- Yang, J., Martinson, T.E., Liu, R.H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.

CORRELATION OF THE TOTAL FENOL CONTENT WITH THE ANTI-OXIDATIVE ACTIVITY OF RED WINES FROM THE REGION OF BANJA LUKA

*Zoran Kukrić¹, Ivan Samelak², Goran Vučić¹, Ladislav Vasilišin¹,
Novak Kukrić³*

Abstract

In this paper, the antioxidant activity of 3 red wine samples was determined using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH)- radical scavenging assay, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assay, so as Briggs-Raushers oscillatory reactions. Correlation of these antioxidant methods with the total phenol content in these red wine samples was also performed. The total phenol content was found to vary from 1790,67- 3209,97 mgGAE/L_{wine}. Antioxidant activity determined by DPPH method 15,45- 17,08 mmol_{Trolox}/L_{wine}, ABTS method 23,21- 24,14 mmol_{Trolox}/L_{wine}, and Briggs- Raushers oscillatory reactions 1,826- 3,848 mmol_{Trolox}/L_{wine} respectively.

The total phenol content shows significant correlation with ABTS method (0,55), and very significant correlation with Briggs- Raushers oscillatory reactions (0,99)

Key words: Red Wine, Antioxidant activity, Total phenols, DPPH, ABTS, Briggs-Raushers oscillatory reactions.

¹Tehnološki fakultet Banja Luka, Stepe Stepanovića 75, Banja Luka, Republika Srpska (z.kukric@gmail.com)

² Prirodno-matematički fakultet Banja Luka, Mladena Stojanovića 2, Banja Luka, Republika Srpska

³ Makros, Banja Luka, Đure Jakšića 5, Republika Srpska