

HPLC ODREĐIVANJE KATEHINA U SJEMENKAMA GROŽĐA SORTE PLAVAC MALI

HPLC DETERMINATION OF CATECHINS IN GRAPE SEEDS OF PLAVAC MALI CULTIVAR

Višnja Katalinić, P. Maleš, Ljubica Šimac

SAŽETAK

Sa saznanjem važnosti katehina i mogućnosti njihove primjene u farmakologiji, te važnosti polifenola u kemotaksonomiji biljaka istraživali smo sadržaj katehina (flavan 3-ol monomera) u sjemenkama grožđa autohtone sorte plavac mali. Metodom rada obavljena je uspješna separacija katehina ekstrahiranih iz sjemenki grožđa. Sorta plavac mali sadrži visoke koncentracije flavan 3-ol monomera. Tijekom dozrijevanja grožđa sadržaj (+) katehina i (-) epikatehina se mijenja. Najveće se promjene zbivaju u vremenu šarka.

Ključne riječi: šarak-fenofaza dozrijevanja grožđa, sjemenka grožđa, tehnološka zrelost.

ABSTRACT

Using HPLC technique on reversed-phase, the amounts of (+) - catechin and (-) epicatechin in grape seeds of autochthonous Dalmatian cultivar plavac mali, were analyzed during the growth season. To prevent interference between phenolic compounds, because many of them have similar UV absorption spectra, we fractionated acidic and neutral phenolic compounds on Sep Pak C 18 cartridges. Catechins were separated using HPLC with gradient solvent system at 280 mm. The grape seeds were analyzed during various stages of ripening. The results show the highest concentrations of catechins in the verison. The level decrease quickl throughout maturation. The major flavan-3-ol monomer was (+) - catechin.

Key words: calauring stage, grape seeds, technological ripening stage.

UVOD

Flavani su sekundarni biljni metaboliti. Zbog raznovrsnosti njihovog djelovanja u prirodi, često uočljivog prisustva i široke rasprostranjenosti u biljnom svijetu, ovi spojevi već dulje vremena zaokupljaju pažnju genetičara, kemičara i biokemičara. Usprkos tome, danas se za samo vrlo mali broj flavanoida može točno definirati njihov biološki učinak.

Flavan-3-oli, jedna od grupa flavanoida, predmet su intenzivnih istraživanja posljednjih godina, zbog svog pozitivnog fiziološkog djelovanja (10,11,12). U ovisnosti o stupnju polimerizacije flavan-3-ola, razlikuju se monomeri, dimeri i polimerni oblici (4). Bate-Smith je ustanovio da su ovi spojevi najčešći kod biljaka koje imaju drvenastu strukturu (1). Primjena HPLC tehnike omogućila je separaciju i kvantifikaciju ovih termolabilnih spojeva (2,5,13).

Zbog dosadašnjih saznanja o značaju ovih spojeva i mogućnosti njihove primjene u farmakologiji, te važnosti polifenola u kemotaksonomiji biljaka istraživali smo sadržaj katehina (flavan-3-ol monomera) u sjemenkama grožđa autohtone dalmatinske sorte plavac mali (9).

GRADIVO I NAČIN PROVEDBE POKUSA

Analizirane su sjemenke bobica grožđa plavac mali cv. s područja Mimice (Splitsko-Omiško vinogorje). Uzorci su uzimani svakih tjedan dana u periodu od šarka do faze tehnološke zrelosti tijekom 1990., 1991. i 1992. godine. Veličina uzorka je bila 100 boba grožđa. Sjemenke su pažljivo izdvojene rukom i zamrznute do analize. Pokus je postavljen u tri ponavljanja.

Fenolni spojevi ekstrahirani su nizom sukcesivnih ekstrakcija metodom koju su primijenili Bourzeix i sur. 1986. (2). Separacija neutralnih i kiselih fenola urađena je na Sep Pak C 18 kolonama eluacijom s etil acetatom (5,13). Organsko otapalo je uklonjeno u rotacionom evaporatoru kod 30 °C. Suhi ostatak je preuzet s 50%-tnim metilnim alkoholom. Separacija i kvantifikacija katehina urađena je tehnikom HPLC na reverznoj fazi gradientnom eluacijom s 5%-tnom octenom kiselinom u red. vodi uz dotok metilnog alkohola (5%-tna HAc, 0-100% tijekom 60 min. (10%-tni MeOH); UV VIS detektor kod 280 nm (4). Primijenjena je metoda vanjskog standarda. Rezultati su prosjek dva uzastopna ponavljanja.

Upotrijebljeni standardi su bili proizvod Aldrich Comp.

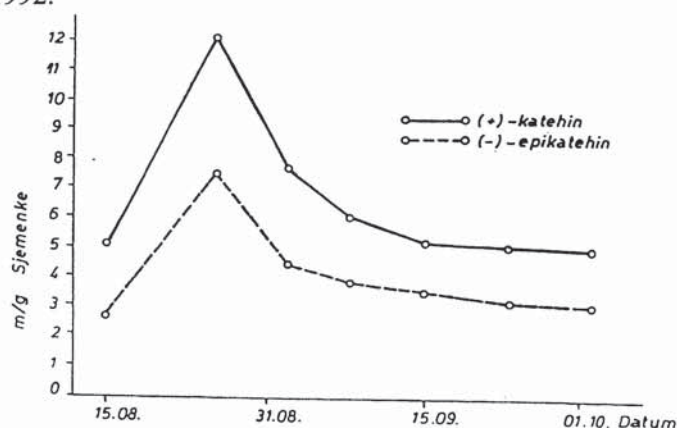
ISHODI ISTRAŽIVANJA

Primijenjena metoda omogućila je uspješnu separaciju katehina ekstrahiranih iz sjemenki grožđa. (+) - katehin i (-) - epikatehin su identificirani pomoću retencionih vremena standarda. Prethodna frakcionacija neutralnih i

kiselih fenolnih spojeva je učinkovita i potvrđuje dosadašnje rezultate (5,13). Gradientna elucija provedena uz dodatak metilnog alkohola, znatno skraćuje vrijeme separacije flavana u neutralnoj frakciji u odnosu na metodu predloženu od Bourzeixa i sur. (1986.) (2).

Slika 1. Kretanje količine katehina u sjemenkama grožđa plavac mali cv. iz berbe 1992.

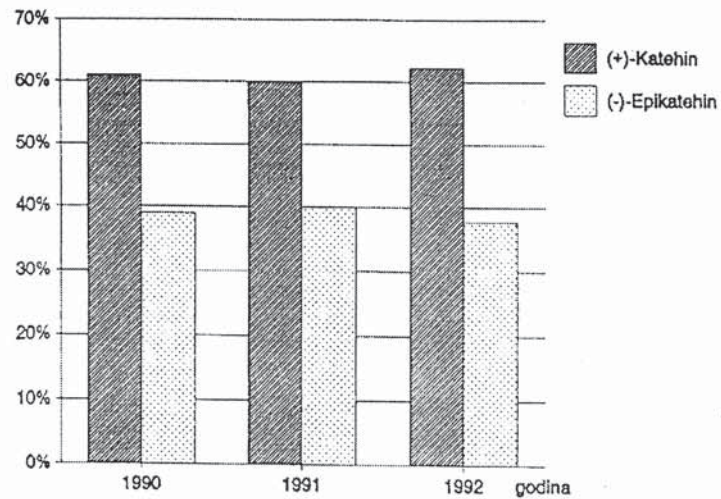
Figure 1. Catechin contents changes in grape seeds, plavac mali cv., vintage 1992.



Prema rezultatima istraživanja katehina u sjemenkama grožđa sorte plavac mali, ova sorta sadrži visoke koncentracije ispitivanih flavan-3-ol monomera. Prosječna koncentracija katehina u fazi tehnološke zrelosti, na osnovi podataka za 1990., 1991. i 1992. godinu, iznosila je 7067 mg/kg sjemenki. Najviša koncentracija od 8390 mg/kg sjemenki izmjerena je 1991. god. Dobiveni podaci su u skladu s rezultatima istraživanja različitih autora (2,6,7,8) prema kojima je grožđe, a posebice sjemenke grožđa, izuzetno bogato ovim spojevima. Međutim, dok je prema Bourzeixu odnos (+)-katehina i (-)-epikatehina u sjemenkama grožđa 1:1, prema našim rezultatima (+)-katehin je dominirajuća komponenta. Znatno više koncentracije (+)-katehina, u odnosu na (-)-epikatehin, u sjemenkama grožđa plavac mali, dokazane su kako u fazi tehnološke zrelosti tako i tijekom promatranog razdoblja dozrijevanja (sl. 1). Odnos (+)-katehina i (-)-epikatehina u fazi tehnološke zrelosti iznosio je 1,57; 1,50 i 1,66 navedeno uzastopno za 1990., 1991. i 1992. godinu berbe. Kvalitativna distribucija za tri promatrane godine dana je na sl. 2. Ova razlika u odnosu promatranih katehina koja odstupa od dosadašnjih saznanja (2) mogla bi se smatrati svojstvom sorte. To bi značilo da sorta utječe ne samo na količinu katehina nego i na njihov međusobni odnos.

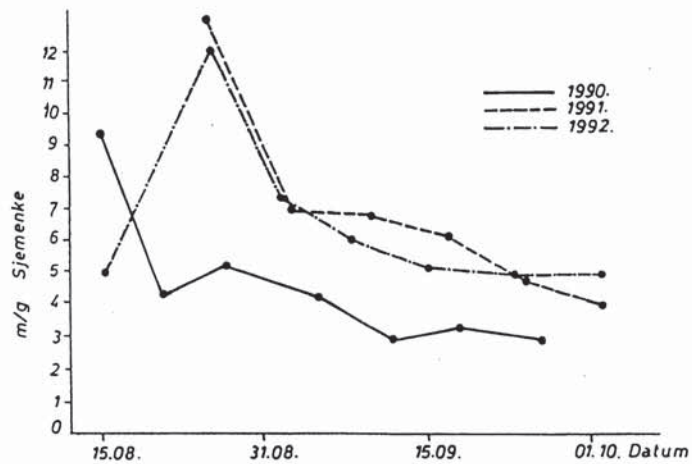
Slika 2. Kvalitativna distribucija katehin monomera u sjemenkama grožđa plavac mali cv. u fazi tehnološke zrelosti

Figure 2. Catechin monomer quality distribution in grape seeds plavac mali cv. in the phase of technological ripeness



Slika 3. Kretanje količine (+)-katehina u sjemenkama grožđa plavac mali cv. tijekom tri godine berbe

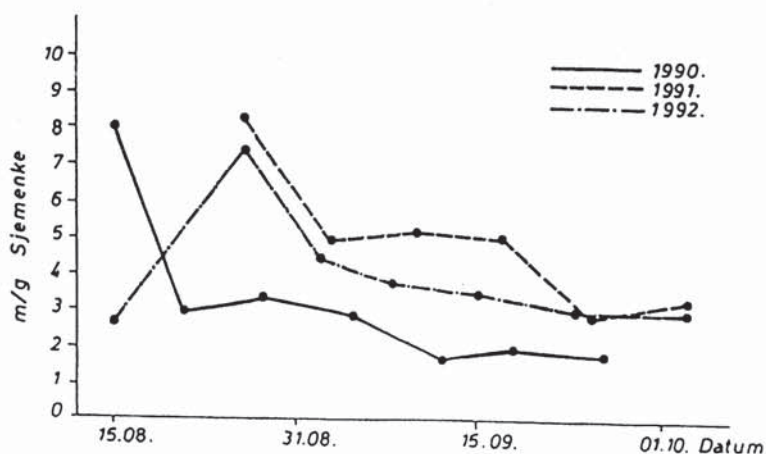
Figure 3. (+)-Catechin contents changes in grape seeds plavac mali cv. during three years vintage



Promatranjem kretanja sadržaja (+)-katehina i (-)-epikatehina tijekom dozrijevanja upućuje na nagle promjene koje se zbivaju u razdoblju šarka u sjemenkama grožđa. Nakon šarka dolazi do naglog pada koncentracije katehina. U zadnjim tjednima dozrijevanja te promjene nisu više tako uočljive (sl. 8, sl. 4). Za razdoblje dozrijevanja karakteristična je intenzivna akumulacija antocijana u pokožici bobice grožđa. Kako se antocijanidini od katehina strukturalno razlikuju postojanjem samo jedne hidroksilne grupe više u C prstenu bila je logična pretpostavka da put nastajanja antocijanidina vodi preko flavan-3-ola. Međutim, ukoliko su točna razmatranja o nezavisnom putu nastajanja antocijanidina i flavan-3-ola (14), ostaje otvoreno pitanje što se događa s ovim posljednjim tijekom dozrijevanja bobice grožđa, i koji je razlog tako visoke akumulacije (+)-katehina i (-)-epikatehina u doba šarka.

Slika 4. Kretanje količine (-)-epikatehina u sjemenkama grožđa plavac mali cv. tijekom tri godine berbe

Figure 4. (-)-Epicatechin contents changes in seeds plavac mali cv. during three years vintage



ZAKLJUČCI

Sjemenke grožđa plavac mali cv. bogate su katehinima. Dominirajuća komponenta je (+)-katehin. Povišene koncentracije (+)-katehina u odnosu na (-)-epikatehin mogu se smatrati svojstvom sorte plavac mali.

Sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina se mijenja u ovisnosti o stupnju zrelosti grožđa. Maksimalne koncentracije katehina određene su u razdoblju šarka.

LITERATURA

- Bate-Smith E. C.** (1975): Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry*, 14: 1107-1113.
- Bourzeix M., D. Weiland, N. Heredia** (1986): Etude des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne. *Bull. de O.I.V.*, 59, 669-670: 1172-1254.
- Dumon Marie-Claude** (1990): Recherches analytiques sur les pycogenols, These, Universite de Boreaux II.
- Glories Y.** (Recherche sur la matiere colorante des vins rouges. These Doctorat es Sciences, Universite de Bordeaux 2, 18.
- Jaworski A. W., Lee C. Y.** (1987): Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 2:257-259.
- Kovač V., M. Bourzeix, N. Heredia, Emilia Alonso** (1991): Sadržaj katehina i procijanidola u grožđu i vinu nekih belih sorti. *Jug. vin. i vin.* 1:10-14.
- Lee C. Y., A. Jaworski** (1987): Phenolic compounds in white grapes grown in New York. *Am. J. Enol. Vitic*, 38, 4:277-281.
- Lee C. Y., A. Jaworski** (1989): Major phenolic compounds in ripening white grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 1:43-46.
- Males, P.** (1981) . Plavac mali. Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split.
- Masquelier J., J. Michaud** (1979): Action bactericide et antivirale du vin. 104. Congres National des Societes Savantes, Bordeaux, Sciences II, 447-457.
- Masquelier J.** (1982): Action protectrice es procyanidines. *Sympos. Inter. Aliment et Consom du vin.*, Verone, Italia, 147-155.
- Masquelier J.** (1988): Effets physiologique du vin. *Bull. O.I.V.*, 689-690:554-578.
- Oszmianski J., T. Ramos, M. Bourzeix** (1988): Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. Enol Vitic.*, 39, 3:259-262.
- Stafford H. A.** (1993): Proanthocyanidins and flavan-3-ol biosynthesis: comparison with antocyanidin pathway and future needs. *Polyphenolic phenomena. A. Scalbert, INRA*, 73-81.

Adresa autora - Author's adress:

Primljeno: 18. 12. 1997.

Dr. Višnja Katalinić
Dr. Petar Maleš
Dr. Ljubica Šimac

Institut za jadranske kulture i
melioraciju krša - Split
Put Duilova b. b., Split

DOSTIGNUĆA U OPLEMENJIVANJU PŠENICE
Bc INSTITUTA ZA OPLEMENJIVANJE I PROIZVODNJU
BILJA ZAGREB U HRVATSKOJ*

**ACHIEVEMENTS IN WHEAT BREEDING OF THE Bc INSTITUTE
FOR BREEDING AND PRODUCTION OF FIELD CROPS- ZAGREB
IN CROATIA****

S. Tomasović, P. Javor, R. Mlinar, B. Sesar

SAŽETAK

Oplemenjivanje ozime pšenice u Bc Institutu - Zagreb ima vrlo dugu tradiciju. Rad na oplemenjivanju ozime pšenice započeo je u tadašnjem Zavodu za ratarstvo u Botincu davne 1947. godine pod vodstvom dr. sc. Josipa Potočanca, koji je zasnovao model Bc pšenica baziran na povećanom broju biljaka po jedinici površine kombiniranjem svojstava talijanskih sorti s američkima. S izvjesnim promjenama taj su model kasnije prihvatili oplemenjivači Bc Instituta: Javor P., S. Tomasović i R. Mlinar. U 1971. godini priznate su sorte Zlatna Dolina i Sanja. To je bio veliki napredak u usporedbi sa sortama stvorenima prije njih. Sorta Zlatna Dolina bila je 15% većeg uroda u širokoj proizvodnji nego tada vodeća talijanska sorta Libellula (Martinić-Jerčić, 1990.). Poslije Zlatne Doline priznato je 70 visokorodnih sorti ozime pšenice od kojih je jedna sorta ozimog duruma stvorena u Bc Institutu - Zagreb. Mnoge od tih sorti prihvatili su proizvođači pšenice u zemlji i izvan zemlje gdje je priznato 16 sorata (Italija, Mađarska, Čehoslovačka, Bugarska, Slovenija). Oplemenjivanje ozime pšenice je složen posao. U Bc Institutu-Zagreb to se odvija u sklopu nekoliko programa, čiji je osnovni cilj stvaranje polupatuljastih i srednje visokih sorata s povećanjem kakvoće zrna i brašna. Oplemenjivači: Javor, Tomasović i Mlinar postavili su za cilj postići urod zrna od 15 t/ha (12-15 t/ha), jer već u 1983. i 1984. godini sa Zg-sortama pšenice ostvareni su urodi od 10 t/ha i više u širokoj proizvodnji, održavanje visoke stabilnosti uroda putem oplemenjivanja na najznačajnije bolesti pšenice (crna žitna hrđa, pepelnica, Septoria spp. i Fusarium spp.), te daljnje povećanje

* Ovaj je članak predstavljen na Petoj internacionalnoj konferenciji o pšenici, 10.-14. lipnja 1996., Ankara, Turska.

** This paper was presented on 5th International Wheat Conference, June 10-14, 1996, Ankara, Turska.