

SUBSTANCJE BIOLOGICZNIE AKTYWNE W WINIE
BIOACTIVE COMPOUNDS IN WINE

Jan Małyшко*, Monika Karbarz

*Uniwersytet Jana Kochanowskiego, Instytut Chemii,
ul. Świętokrzyska 15, 25-408 Kielce
e-mail: malyszko@ujk.edu.pl

Abstract
Wstęp
1. Flawonoidy
2. Resweratrol
3. Inne substancje bioaktywne
Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane

dr hab. Jan Małyшко jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1958). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskał na Uniwersytecie Warszawskim (1966), a doktora habilitowanego na Uniwersytecie Marii Curie Skłodowskiej (1978). Obecnie jest emerytowanym profesorem chemii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego (UJK) w Kielcach. Jego zainteresowania skupiają się wokół mechanizmu i kinetyki procesów elektrodowych oraz elektrochemii i elektroanalitycznego oznaczania związków o znaczeniu biologicznym.

dr Monika Karbarz ukończyła w 2002 r. studia chemiczne na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Akademii Świętokrzyskiej (obecnie UJK). Jest zatrudniona w Instytucie Chemii UJK w Kielcach. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół elektrochemicznych właściwości naturalnych i syntetycznych antyoksydantów. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej (2008) za rozprawę na temat mechanizmu anodowego utleniania antyoksydantów: troloksu i α -tokoferolu w środowiskach o zróżnicowanej aktywności protonów.

ABSTRACT

Wines are the subject of an increasing number of investigations. The benefits of red wine became widely recognized after the observation of “French paradox” [8–10]. It has been found that there is a low mortality rate from ischemic heart disease among French people despite their high consumption of saturated fatty acids and the prevalence of other risk factors. The health-protective properties of wine are attributed to their antioxidant activity, i.e. the capability to scavenge reactive oxygen species, ROS. An imbalance between antioxidants and oxygen species results in oxidative stress leading to cellular damage. The phenolic compounds present in wine show beneficial physiological properties including protection against coronary heart disease, as well as anti-inflammatory and anti-carcinogenic activity. Most of the beneficial effects of wine are attributed to the presence of flavonoids, resveratrol, phenolic acids and other antioxidants. This paper reviews the significance of different compounds present in wine and their effect on human health.

Chapter 1 focuses on flavonoids: flavonols, flavan-3-ols and anthocyanidins (Fig. 1) [14–29]. This class of compounds can exist both in a simple form, as aglycones, and bounded with sugars, as glycosides. The presence of phenolic hydroxyl group in these compounds is essential for their antioxidant activity and enables to scavenge free radicals *in vivo*.

Chapter 2 describes chemical and physicochemical properties of resveratrol (Fig. 2) [30–41] which is the main antioxidant in wine. Moreover, this compound has been shown to inhibit the oxidation of low density lipoproteins and the aggregation of platelets [44–47]. Resveratrol also exhibits anti-inflammatory and anticancer properties [48, 49].

Chapter 3 reveals that wines are also a good source of other antioxidants [50–55] as phenolic acids (Fig. 3), tyrosol and hydroxytyrosol (Fig. 4), and also melatonin (Fig. 5).

Unfortunately, some wines can include mycotoxins, mainly ochratoxin A [59, 60] (Fig. 6), which is produced by the phytopatogenic fungi, *Aspergillus carbonarius*.

All types of red wine contain different amounts of ethanol and phenolic antioxidants, and therefore it is probable that the cardioprotective effect of red wine is caused by both these kinds of components [57–58]. Epidemiological observations, clinical and experimental *in vitro* research prove that regular and moderate intake of wine, particularly red wine, reduces cardiovascular morbidity and mortality [66–70].

Keywords: antioxidant activity, flavonoids, melatonin, phenolic acids, red wine, resveratrol,

Słowa kluczowe: aktywność antyoksydacyjna, flawonoidy, kwasy fenolowe, melatonina, resweratrol, wino czerwone

WSTĘP

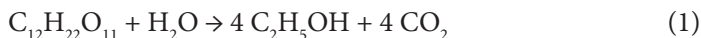
Tradycyjne wino jest napojem otrzymanym przez fermentację alkoholową owoców winorośli właściwej, zwanej również latoroślą winną (*Vitis vinifera* L.). Uprawna winorośl została prawdopodobnie wyhodowana z dzikiego euroazjatyckiego podgatunku winorośli leśnej, występującego do dzisiaj m.in. na Krymie, Kaukazie i Zakaukaziu [1]. Uprawę winorośli prowadzono już kilka tysięcy lat p.n.e., początkowo na Bliskim Wschodzie, skąd przedostała się do Grecji, a następnie do Italii. Od Rzymian przejęli ją Galowie zamieszkujący południową Francję. W czasach nowożytnych odmiana europejskiej winorośli uprawnej przewieziono do Ameryki, a później do południowej Afryki i Australii. W średniowieczu i na początku czasów nowożytnych uprawa winorośli rozpowszechniła się również w Polsce, czego dowodem mogą być dawne nazwy ulic i dzielnic w wielu miastach, takie jak „Winnice” lub „Winogrady”. Podobnym reliktem jest herb Lublina przedstawiający koziołka skaczącego na krzew winny. Ostre zmiany klimatyczne w XVII wieku (nadejście tzw. małej epoki lodowej) doprowadziły do upadku winnic i winiarstwa w naszym kraju. Obecne złagodzenie klimatu przyczynia się do odrodzenia uprawy winorośli na Podkarpaciu [2]. Co więcej, Uniwersytet Jagielloński oferuje ostatnio studia podyplomowe w zakresie enologii (winiarstwa) [3].

W skład świeżych owoców winorośli, czyli winogron wchodzi cukry (do 20%), pektyny, garbniki oraz kwasy organiczne: jabłkowy, winowy, cytrynowy i glukuronowy, jak również niektóre aminokwasy. Zawierają one również flawonoidy i inne związki fenolowe, witaminy A, B₁, B₂ i C, jak i antocyjanidyny (tylko ciemne odmiany) [4]. Największą ilość winogron wykorzystuje się jako surowiec do wyrobu wina. W krajach śródziemnomorskich wino stało się już w starożytności powszechnie używanym napojem. Nie dziwi zatem, że wiele odniesień do wina zawiera Biblia. We wczesnym chrześcijaństwie chleb i wino uchodziły za symbole jedzenia i picia. Wino często mieszano w różnych proporcjach z wodą.

W starożytności i średniowieczu wino znajdowało zastosowanie jako środek leczniczy, zarówno do leczenia ran (właściwości ściągające i antyseptyczne), o czym donosi Biblia w przypowieści o dobrym Samarytaninie, jak i do leczenia chorób wewnętrznych. Do używania wina jako lekarstwa zachęcał również św. Paweł pisząc w Pierwszym Liście do Tymoteusza: „Samej wody już nie pij, używaj natomiast po trosze wina ze względu na żołądek i częste twe słabości!” [5].

Do produkcji wina wykorzystuje się zarówno białe, jak i czerwone winogrona. Wina białe otrzymuje się przez fermentację soku wyciśniętego za pomocą prasy (również z czerwonych winogron) i oddzielonego od miazgi. Wina czerwone uzyskuje się z czerwonych winogron poddawanych wstępnej maceracji. Zmiażdżone jagody pozostają w kontakcie z sokiem przez ponad osiem dni. Wskutek tego barwniki i substancje biologicznie aktywne zawarte w skórce przechodzą do moszczu stając się składnikami wina. Skracając czas pozostawania moszczu razem z miazgą, np. do jednej doby, można otrzymać wino różowe. Fermentacja wina trwa dosyć długo, do kilku tygodni. W zależności od potrzeb prowadzi się ją do końca lub przerywa

w odpowiednim momencie, np. przez podgrzanie moszczu. Fermentacja alkoholowa jest procesem anaerobowym polegającym na przetworzeniu cukrów, w tym głównie glukozy i fruktozy, w alkohol etylowy i ditlenek węgla według prostego równania



W rzeczywistości proces ten jest bardziej skomplikowany, gdyż składa się z wielu reakcji, z których część prowadzi do wytworzenia produktów ubocznych. Zestawienie reakcji można znaleźć w artykule Churcha [6]. Obecność produktów ubocznych jest bardzo istotna, gdyż wpływa na tzw. bukiet wina, a więc jego barwę, smak i zapach.

Przed rozpoczęciem fermentacji (dodaniem drożdży winiarskich) wprowadza się do moszczu słabo zakwaszony roztwór disiarczuanu(IV) potasu ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) lub wodorosiarczuanu(IV) potasu (KHSO_3). Substancje (oznaczone odpowiednio symbolami E224 i E228) pełnią funkcję konserwantów i służą do wyzwalania SO_2 [7]. Dodatek siarczuanu(IV) służy przy produkcji wina do zniszczenia niepożądanego flory bakteryjnej i dzikich szczepów drożdży. Po zakończeniu dojrzewania wina a przed jego butelkowaniem wprowadza się ponownie SO_2 aby zapobiec utlenianiu zawartych w nim antyoksydantów tlenem powietrza.

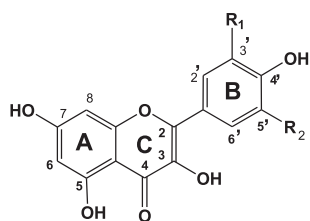
Winami nazywane są również napoje alkoholowe otrzymywane w wyniku fermentacji innych owoców, tzw. wina owocowe, np. jabłkowe. W poniższym artykule będziemy zajmowali się wyłącznie winami tradycyjnymi, tzw. gronowymi.

Mimo wytwarzania i spożywania wina od tysięcy lat nauka o jego wartościach zdrowotnych jest stosunkowo młoda. Przełomowym momentem stało się odkrycie pewnego zjawiska zwanego francuskim paradoksem (ang. *French paradox*). Polega ono na tym, że sposób odżywiania mieszkańców południowo-zachodniej Francji oraz Włoch pozostaje w zupełnej niezgodzie z tym, co zalecała do niedawna oficjalna medycyna, zwłaszcza amerykańska. Mimo spożywania dużej ilości tłuszczów nasyconych wskaźnik zachorowalności na chorobę wieńcową serca jest w tym regionie wielokrotnie niższy niż w krajach północnej Europy [8], nie wspominając już o Stanach Zjednoczonych Ameryki i Kanadzie. Kiedy w latach 90. ubiegłego stulecia zauważono to zjawisko, zaczęto doszukiwać się jego przyczyny nie tylko w jadłospisie bogatym w warzywa i owoce, lecz również w regularnym spożywaniu znacznych ilości czerwonego wina [9, 10].

1. FLAWONOIDY

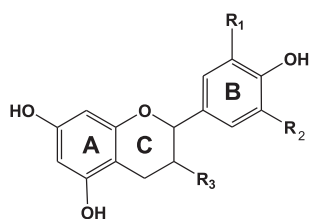
Podstawowymi składnikami wina są: woda i etanol. Oprócz nich każde wino zawiera nawet do kilkudziesięciu innych składników, które warunkują właściwości organoleptyczne, a przede wszystkim smak. Są wśród nich nie tylko produkty uboczne fermentacji alkoholowej, jak glicerol i inne alkohole, lecz również substancje biologicznie aktywne pochodzące ze skórki winogron. W większości są to naturalne fenole i polifenole o właściwości antyoksydantów (przeciwutleniaczy).

Antyoksydanty są związkami chroniącymi komórki zwierzęce przed nadmiarem reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak tlen singletowy $^1\text{O}_2$ oraz wolne rodniki: anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- , rodnik wodoronadtlenkowy HO_2^- i rodnik hydroksylowy $\cdot\text{OH}$. Wynikiem braku równowagi między RFT i antyoksydantami jest stres oksydacyjny, prowadzący do uszkodzenia komórek przez niekorzystne oddziaływanie z DNA, białkami i lipidami [11]. Ze stresem oksydacyjnym wiąże się proces starzenia oraz szereg chorób, jak miażdżyca, choroby reumatoidalne, choroby zwyrodnieniowe systemu nerwowego (Parkinsona i Alzheimerera) oraz choroby nowotworowe. Przed szkodliwym nadmiarem RFT bronią organizm enzymy antyoksydacyjne oraz substancje niskocząsteczkowe nazywane antyoksydantami. Te ostatnie są reduktorami, które wchodzi w reakcje z czynnikami utleniającymi (ang. *preventive antioxidants*) lub przejściowymi produktami utlenienia, zwykle wolnymi rodnikami (ang. *chain-breaking antioxidants*). Niektóre antyoksydanty, nazywane endogennymi, są wytwarzane przez organizm ludzki. Są to m.in. glutation, koenzym Q_{10} , estron, estradiol, melatonina oraz kwas moczowy. Większość antyoksydantów jest dostarczana z pożywieniem, a więc ma charakter egzogenny. Opis metod oznaczania aktywności antyoksydacyjnej można znaleźć w dostępnych opracowaniach monograficznych [12, 13].



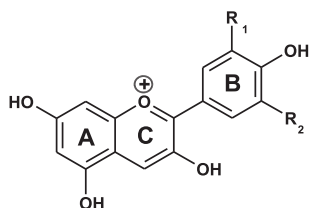
Flawonole

Flawonoid	R ₁	R ₂
kwercetyna	OH	H
mirycetyna	OH	OH



Flawan-3-ole (katechiny)

Flawonoid	R ₁	R ₂	R ₃
katechina (+)C	OH	H	OH
epikatechina (-)EC	OH	H	OH



Antocyjanidyny

Flawonoid	R ₁	R ₂
cyjanidyna	OH	H
delfinidyna	OH	OH
malwidyna	OCH ₃	OCH ₃
petunidyna	OCH ₃	OH

Rysunek 1. Struktury cząsteczkowe flawonoidów: flawonoli, flawan-3-oli i antocyjanidyn
 Figure 1. Molecular structures of flavonoids: flavonols, flavan-3-ols and anthocyanidins

Najliczniejszą grupę antyoksydantów o charakterze polifenoli tworzą flawonoidy. Związki te występują licznie w różnych częściach większości roślin, zwłaszcza w owocach i nasionach, a stąd też znajdują się w produktach spożywczych. Struktura cząsteczek wszystkich flawonoidów opiera się na szkielecie 2-fenylochromanu. Flawonoidy różnią się między sobą rodzajem, liczbą i położeniem podstawników. W winach występują flawonoidy należące do trzech grup: flawonoli, flawan-3-oli oraz antocyjanidyn [14]. Struktury tych związków wraz z przykładami są przedstawione na Rysunku 1. Najbardziej interesującą grupę stanowią antocyjanidyny, których obecność warunkuje barwę wina. Cechą odróżniającą je od innych flawonoidów jest dodatni ładunek cząsteczki, zwykle równoważony przez jony chlorkowe. W środowisku kwaśnym i obojętnym barwa antocyjanidyn zależy od pH, natomiast w środowisku zasadowym tracą zabarwienie w wyniku przemian w formy chalkonowe. Podczas dojrzewania barwa młodego czerwonego wina następuje zmiana barwy jako wynik reakcji kondensacji z udziałem antocyjanidyn oraz tworzenie się adduktów antocyjanidyn i flawan-3-oli [15].

Część flawonoidów znajduje się w winach jako glikozydy, w których są związane przez grupę hydroksylową za pomocą wiązania β -glikozydowego z monosacharydami (glukozą lub galaktozą) [16]. Antocyjanidyny tworzą oprócz 3-O-glikozydów, nazywanych antocyjanami, również 3,5-O-diglikozydy. W większej jeszcze proporcji w stosunku do aglikonów występują glikozydy w soku winogronowym. Flawonoidy są w tej postaci lepiej rozpuszczalne w wodzie od aglikonów. Przyłączone cząsteczki monosacharydów są zdolne do tworzenia licznych wiązań wodorowych, a to prowadzi w konsekwencji do lepszego uwodnienia i zwiększonej rozpuszczalności w porównaniu z wyjściowym aglikonem. Jak wykazali Shimizu i in. [17] na przykładzie galaktozydów mirecetyny, dołączenie kolejnych jednostek piranozowych (do czterech) powoduje zwiększenie rozpuszczalności ponad 1000 razy. Glikozydy są trwałe w środowisku obojętnym, ale w środowisku kwaśnym wiązanie glikozydowe łatwo ulega hydrolizie. Dlatego część aglikonów jest uwalniana podczas fermentacji alkoholowej, a wytwarzany etanol ułatwia ich rozpuszczanie. Flawan-3-ole mogą występować w winie również w postaci estrów z kwasem galusowym.

Aktywność antyoksydacyjna flawonoidów jest uzależniona od ich struktury oraz od potencjału redoks powstających rodników [18–23]. Podsumowując wnioski zawarte w cytowanej literaturze Makris i in. [24] stwierdzili, że największy wpływ na aktywność antyoksydacyjną flawonoidów mają trzy następujące czynniki strukturalne: (a) obecność struktury katecholu (3',4'-dihydroksy) w pierścieniu B; (b) wiązanie podwójne w pozycji 2,3 w zestawieniu z grupą karbonylową w pozycji 4, powodujące delokalizację ładunku ujemnego w pierścieniach A i C; (c) dodatkowa obecność grup OH w pozycjach 3 i 5. Obecność grup metoksylowych powoduje niekorzystne efekty steryczne i zwiększa hydrofobowość cząsteczki. Według wcześniejszej opinii Amicia i in. [25], opartej na badaniu 29 flawonoidów należących do różnych grup, obecność wiązania podwójnego C2-C3 nie jest konieczna do osiągnięcia wysokiej aktywności antyoksydacyjnej. Omawiany model wyjaśnia, dlaczego flawonole (np. kwercetyna) są skuteczniejszymi antyoksydantami niż flawan-3-ole (np. katechyna).

Badania kwantowo-mechaniczne nad gęstością elektronową oraz geometrią cząsteczek flawonoidów prowadzili van Acker i in. [26]. Podstawy molekularne mechanizmu działania antyoksydantów o charakterze fenoli omówili Leopoldini i in. w artykule przeglądowym [27].

Flawonoidy wykazują również zdolności do tworzenia kompleksów chelatowych z jonami metali, np. z Fe^{2+} oraz z Cu^{2+} [28, 29]. Z cytowanej literatury wynika, że do flawonoidów najsilniej kompleksujących jony Fe^{2+} należą te, które zawierają układ 6,7-dihydroksy (w pierścieniu A), podczas gdy układ 5-hydroksy-4-keto jest pod tym względem mniej aktywny. Zgodnie z zaobserwowaną regułą kwercetyna i rutyna, występujące w winach, tworzą chelaty o średniej trwałości. Należy podkreślić, że chelatowanie żelaza(II) może zapobiegać powstawaniu rodników hydroksylowych w wyniku ich udziału w reakcji Fentona.

2. RESWERATROL

Wśród antyoksydantów zawartych w winie za najbardziej aktywny uważany jest resweratrol (3,5,4'-trihydroksystilben), polifenol należący do grupy stilbenów. Substancja ta występuje w kilkudziesięciu roślinach, w tym również jadalnych. Najbardziej obfitym jej źródłem jest rdest japoński (łac. *Polygonum cuspidatum*) rosnący głównie na Dalekim Wschodzie, lecz rozprzestrzeniający się w ostatnich latach również w Europie jako uporczywy chwast. W świecie roślin resweratrol spełnia rolę substancji obronnej (fitoaleksyna), która wytwarzana jest po uszkodzeniu tkanki, a zwłaszcza po ataku patogennych grzybów, np. szarej pleśni. Przeciwdziała on również skutkom innych czynników stresowych, jak nadmiar promieniowania UV. W medycynie Dalekiego Wschodu resweratrol był stosowany od dawna jako substancja przeciwgrzybicza (fungicyd).

Resweratrol rozpuszcza się dobrze w etanolu, DMSO i innych rozpuszczalnikach organicznych, natomiast wykazuje słabą rozpuszczalność w wodzie. W wodnych roztworach zawierających 10% etanolu jego rozpuszczalność wynosi 40 mg/l ($1,8 \cdot 10^{-4}$ M) w temperaturze 20°C [30]. Resweratrol tworzy dwa izomery geometryczne: *cis* i *trans* (Rys. 2), które różnią się właściwościami chemicznymi i fizykochemicznymi. Trela i Waterhouse [31] zarejestrowali widma absorpcyjne etanolowych roztworów obydwu izomerów w zakresie UV i wyznaczyli molowe współczynniki absorpcji jako $\epsilon_{\text{max}} = 1,26 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ przy $\lambda = 288 \text{ nm}$ oraz $\epsilon_{\text{max}} = 3,0 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ przy $\lambda = 308 \text{ nm}$, odpowiednio dla *cis*- i *trans*-resweratrolu. Widma absorpcyjne obydwu izomerów, zarówno w postaci aglikonów jak i glikozydów, w mieszanym rozpuszczalniku woda-acetonitryl-metanol (90:5:5 v/v) badali Goldberg i in. [32].

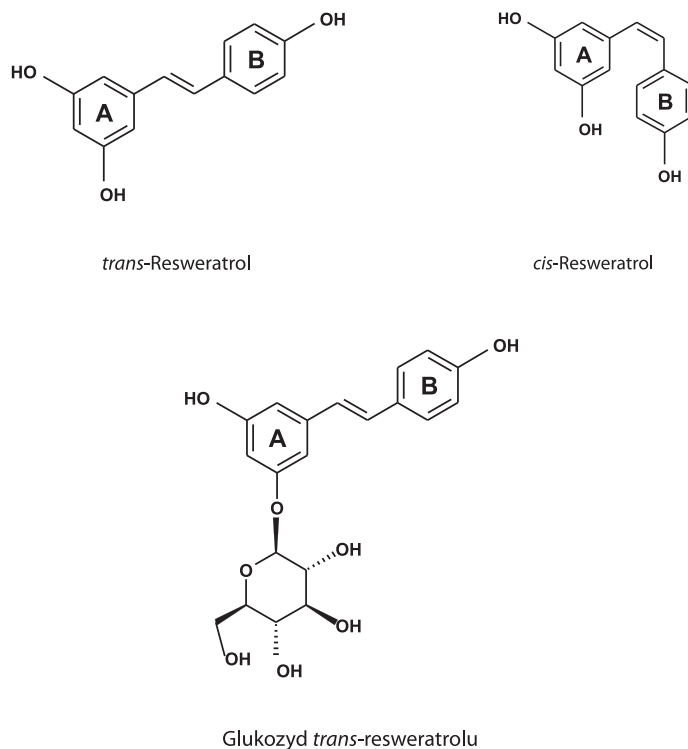
W materiale roślinnym mamy zwykle do czynienia z mieszaniną obu izomerów, jednak ze znaczną przewagą formy *trans*. Przejawia on większą aktywność biologiczną od izomeru *cis* i dlatego stanowi przedmiot zainteresowania chemików. Teoretyczne obliczenia gęstości elektronowej *trans*-resweratrolu przeprowadzili Cao i in.

[33]. Autorzy stwierdzili, że największą reaktywność powinna przejawiać grupa OH w pozycji 4' w pierścieniu B, a mniejszą grupy hydroksylowe w pozycji *meta* w pierścieniu A. Caruso i in. [34] przedstawili strukturę molekularną *trans*-resweratrolu na podstawie wyników badań krystalograficznych i obliczeń teoretycznych metodą *ab initio*. Autorzy wykazali, że obydwa pierścienie szkieletu stilbenowego znajdują się prawie w tej samej płaszczyźnie. Struktura ta została potwierdzona przez Billesa i in. [35] na podstawie zarejestrowanych widm absorpcyjnych w podczerwieni oraz widm ramanowskich. Przewidywaniem właściwości spektralnych resweratrolu na podstawie obliczeń kwantowych zajmowali się Del Nero i de Melo [36]. Według Deaka i Falka [37] *trans*-resweratrol przejawia w roztworze wodnym słabe właściwości kwasowe, charakterystyczne dla fenoli, i wykazuje trzy skoki na krzywej miareczkowania mocną zasadą. Na podstawie ich położenia autorzy wyznaczyli stałą dysocjacji kwasowej jako $pK_{a1} = 9,3$, $pK_{a2} = 10,0$ oraz $pK_{a3} = 10,6$. Największą stałą dysocjacji autorzy przypisali dysocjacji protonu z grupy OH w pozycji 4' w pierścieniu B, co jest zgodne z przewidywaniami teoretycznymi. Nieco inne wartości stałych ($pK_{a1} = 8,8$, $pK_{a2} = 9,8$ oraz $pK_{a3} = 11,4$) zostały podane przez López-Nikolása i in. [38], którzy oparli się na analizie widm absorpcyjnych w zakresie UV-VIS oraz widm fluorescencyjnych.

Trans-resweratrol ujawnia w roztworach dużą wrażliwość na promieniowanie nadfioletowe przekształcając się w izomer *cis*. Trela i Waterhouse [31] wykazali, że izomer *trans* jest trwały bez dostępu światła w roztworach o pH 1–7. Przy pH 1 zachodzi samorzutne przekształcanie izomeru *cis* w *trans*, który jest bardziej stabilny pod względem sterycznym. Szybkość przemiany formy *cis* w *trans* w metanolu zbadali Bernard i in. [39] używając promieniowania o długości fali 350 nm. Postęp reakcji był monitorowany niezależnie za pomocą trzech metod doświadczalnych: spektrofotometrii absorpcyjnej UV, ^1H NMR i HPLC. Autorzy wykazali, że przemiana jest I rzędu ze stałą szybkości $k_1 = 7,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ i czasem połowicznej przemiany $t_{1/2} = (14,7 \pm 0,7) \text{ min}$. Dosyć zaskakujący jest fakt, że zarówno aglikon, jak i glikozyd *trans*-resweratrolu w stanie stałym (krystalicznym) nie ulegają izomeryzacji nawet przy długotrwałym naświetlaniu promieniami UV [40].

W owocach winorośli (winogronach) resweratrol występuje głównie w postaci glikozydów, zwanych piceidami (Rys. 2). Zwiększa to ich rozpuszczalność w wodzie, podobnie jak jest w przypadku flawonoidów. Romero-Pérez i in. [41] oznaczyli zawartość *cis*- i *trans*-resweratrolu oraz odpowiadających im glikozydów w sokach z 36 odmian winogron pochodzących z Hiszpanii. Okazało się, że w tym środowisku resweratrol tworzy głównie glikozydy. W sokach z czerwonych winogron przeciętna zawartość izomeru *trans* w postaci glikozydu wynosiła 14,8 μM , a izomeru *cis* w tejże postaci 3,46 μM . Przeciętne stężenie odpowiednich aglikonów oznaczono jako 2,2 i 0,26 μM . Stężenie obydwu izomerów resweratrolu w postaci glikozydów było znacznie mniejsze w sokach z białych winogron i wynosiło odpowiednio 0,79 i 1,14 μM . Skrajnie małe było stężenie aglikonu *trans*-resweratrolu (średnio 0,05 mg/l, czyli 0,22 μM), natomiast nigdy nie stwierdzono obecności izomeru *cis* w tej postaci. Autorzy zbadali wcześniej zawartość izomerów resweratrolu oraz ich glikozydów

w różnych gatunkach czerwonych win hiszpańskich [42]. Średnia wartość ogólnego stężenia resweratrolu wyniosła w nich 5,65 mg/l (24,8 μ M). Podobnie jak w soku winogronowym stwierdzono przewagę zawartości izomeru *trans* nad *cis*, zarówno w postaci aglikonów (stosunek jak 4,43:1), jak i glikozydów (stosunek jak 2,43:1). Ten sam zespół [43] oznaczył też izomery resweratrolu w białych i różowych winach hiszpańskich. Całkowita zawartość resweratrolu wynosiła w białych winach średnio 0,48 mg/l (2,10 μ M). Stosunek stężeń izomeru *trans* do *cis* był w przypadku aglikonów jak 2,41:1, a w przypadku glikozydów 1,33:1. W porównaniu z sokiem winogronowym większa jest w winach względna zawartość aglikonów, które powstały w wyniku hydrolizy odpowiednich glikozydów w trakcie fermentacji alkoholowej. Resweratrol może również tworzyć oligomery, a przede wszystkim dimery.



Rysunek 2. Wzory strukturalne diastereoizomerów resweratrolu (aglikonów) oraz glikozydu *trans*-resweratrolu

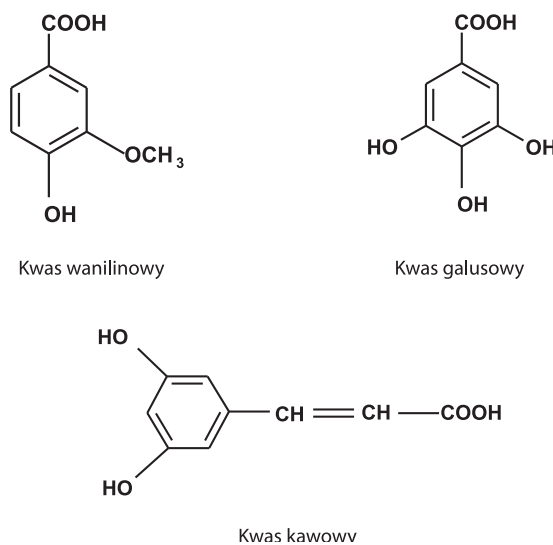
Figure 2. Molecular structures of resveratrol diastereoisomers (aglycones) and *trans*-resveratrol-glucoside

Jedną z najlepiej opisanych właściwości fizjologicznych resweratrolu jest kardioprotekcja. Resweratrol wykazuje działanie ochronne śródbłonka wyściełającego tętnice od wewnątrz. Jest to związane z hamowaniem utleniania lipoprotein, zwłaszcza frakcji LDL cholesterolu oraz apolipoproteiny A1 (ApoA1), która jest główną proteiną frakcji HDL. Tym samym obecność resweratrolu wpływa na wzrost stężenia frakcji HDL cholesterolu w tkankach [44, 45].

Resweratrol hamuje agregację trombocytów (płytek krwi) przez co skutecznie zapobiega powstawaniu skrzepów w naczyniach wieńcowych i zmniejszeniu światła naczyń [46]. Wykazano również, że poza działaniem ochronnym przed chorobami układu sercowo-naczyniowego resweratrol przejawia działanie przeciwzapalne oraz hamuje inicjację i rozwój nowotworów [47, 48]. Mechanizmy biochemiczne oddziaływania resweratrolu na organizm ludzki zostały szczegółowo omówione w artykule Pervaiza [49].

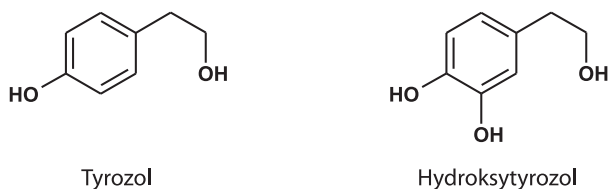
3. INNE SUBSTANCJE BIOAKTYWNE

Do naturalnych antyoksydantów zawartych w różnych składnikach żywności, w tym również w winie, należą kwasy fenolowe. Związkom tym, mimo ich skutecznego działania antyoksydacyjnego, poświęcono w literaturze znacznie mniej uwagi niż flawonoidom. Można je podzielić zasadniczo na dwie grupy, z których jedna pochodzi od kwasu benzoowego, a druga od kwasu cynamonowego. Z substancji należących do pierwszej grupy znajdują się w winach kwasy: galusowy (3,4,5-trihydroksybenzoowy) i wanilinowy (4-hydroksy-3-metoksybenzoowy). Do grupy drugiej należą kwasy: ferulowy (4-hydroksy-5-metoksycynamonowy), kawowy (3,4-dihydroksycynamonowy) i *p*-kumarynowy (4-hydroksycynamonowy), również obecne w winach. Dla przykładu przedstawiono na Rysunku 3 wzory strukturalne kilku z omawianych związków. Zależność aktywności antyoksydacyjnej kwasów fenolowych od ich struktury badali Rice-Evans i in. [19] oraz Natella i in. [50]. Stałe dysocjacji kwasowej tych związków w środowisku wodnym wyznaczyli Beltrán i in. [51]. Z uwagi na strukturę fenolową lub polifenolową ich oddziaływanie z wolnymi rodnikami jest podobne jak w przypadku flawonoidów oraz resweratrolu.



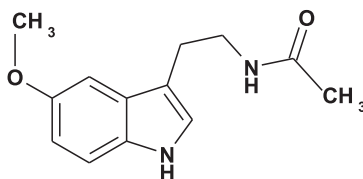
Rysunek 3. Wzory strukturalne wybranych kwasów fenolowych
Figure 3. Molecular structures of some selected phenolic acids

Znanymi substancjami występującymi w winie, a wykazującymi silne działanie antyoksydacyjne, antybiotyczne i przeciwzapalne, są tyrozol (4-(2-hydroksyetylo)fenol) i hydroksytyrozol (4-(2-hydroksyetylo)-1,2-benzenodiol) (Rys. 4). Głównym źródłem tych związków w żywności jest olej z oliwek [52]. Hydroksytyrozol może tam być obecny również w postaci estru z kwasem eleonowym, zwanego oleuropeiną. Hydroksytyrozol jest efektywnym zmiataczem RFT, przerywającym łańcuch peroksydacji lipidów. Fernández-Mar i in. [53] podkreślają, że hydroksytyrozol może również pośrednio wpływać na zwiększenie aktywności układu immunologicznego. Dudley i in. [54] wyrazili pogląd, że gatunki białego wina zawierające duże ilości tyrozolu i hydroksytyrozolu mogą wykazywać tak znaczne działanie kardio-protektywne, jak wino czerwone.



Rysunek 4. Struktury cząsteczkowe tyrozolu i hydroksytyrozolu
Figure 4. Molecular structures of tyrosol and hydroksytyrozol

Kolejnym bioaktywnym związkiem chemicznym, którego obecność została niedawno odkryta w winie, jest melatonina [55]. Jest to znany hormon (wzór strukturalny na Rysunku 5) wytwarzany przez szyszynkę, która stanowi część centralnego systemu nerwowego. Hormon ten odgrywa ważną rolę w regulacji zegara biologicznego i normowaniu okresów snu i czuwania. W medycynie stosowana jest jako środek ułatwiający zasypianie. W przeciwieństwie do środków uspokajających, uśmierzających lub nasennych melatonina nie wywołuje uzależnienia i nie powoduje skutków ubocznych. Dzięki obecności melatoniny wino może działać jako lekki środek uspokajający i ułatwiający zasypianie.



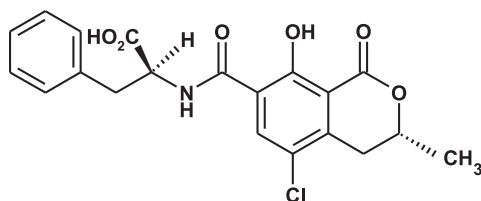
Melatonina

Rysunek 5. Wzór strukturalny melatoniny
Figure 5. Molecular structure of melatonin

Do substancji biologicznie aktywnych zawartych w winie trzeba zaliczyć również jego podstawowy składnik – alkohol etylowy, który użyty w dużej dawce jest środkiem odurzającym. Ponadto powszechnie wiadomo, że przewlekłe używanie

etanolu, zwłaszcza w dużych ilościach, może być bardzo niebezpieczne, prowadząc do uszkodzenia wątroby, trzustki, nerek i mózgu [56]. Nie powinno to przesłaniać faktu, że alkohol etylowy spożywany w umiarkowanych ilościach, chociażby właśnie w postaci wina lub piwa, ma również korzystne działanie zdrowotne. Z danych zebranych przez Klatskyego i Udaltsovą [57, 58] wynika, że alkohol zmniejsza zagrożenie chorobą niedokrwinną serca, gdyż poprawia metabolizm lipidów (obniża stężenie frakcji LDL, zwanego potocznie złym cholesterolem, w osoczu krwi). W konsekwencji ogranicza to odkładanie się złogów cholesterolu, czyli blaszek miażdżycowych w tętnicach. Według cytowanych autorów alkohol działa również przeciwwązkowo przez zakłócenie złożonego cyklu reakcji biochemicznych warunkujących agregację płytek krwi. Umiarkowane spożycie alkoholu może też obniżyć ryzyko choroby naczyń wieńcowych w sposób pośredni – przez zmniejszenie zagrożenia cukrzycą typu II. Należy podkreślić, że picie dużych ilości alkoholu nie zabezpiecza przed chorobami krążenia w stopniu większym niż picie umiarkowane. Częste spożywanie dużych jego ilości może mieć zgubne skutki wywołując choroby niezwiązane z układem krążenia, o czym wspominaliśmy wcześniej. Sprawdza się tutaj znana reguła Paracelsusa: „Tylko dawka odróżnia truciznę od lekarstwa”.

Obok omówionych substancji korzystnych dla zdrowia wina mogą zawierać również takie, które są niepożądane, a nawet wręcz szkodliwe. W pierwszym rzędzie należy zaliczyć do nich mykotoksyny wytwarzane przez niektóre gatunki pleśni z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* namnażających się na powierzchni skórki winogron [59]. Do najczęściej występujących w winie należy ochratoksyna A (OTA), której struktura jest przedstawiona na Rysunku 6. Substancja ta, wytwarzana przez głównie przez pleśń *Aspergillus carbonarius*, zakłóca działanie układu odpornościowego, jest potencjalnie rakotwórcza dla ludzi i prawdopodobnie wywiera słabe działanie mutagenne. Jej obecność w winie jest uwarunkowana przez czynniki klimatyczne i kulturę uprawy winorośli. OTA jest wytwarzana przede wszystkim w warunkach dużej wilgotności i małego nasłonecznienia. Interesujące są wyniki badań porównawczych, które przeprowadzili Brera i in. [60] nad zawartością OTA w 267 gatunkach win, głównie czerwonych i białych, pochodzących z Węgier i z Włoch. Okazało się, że żadne z win węgierskich nie było zanieczyszczone tą toksyną, co zapewne wynika z uprawy winorośli suchym klimacie, który nie sprzyja rozwojowi pleśni. W przeciwieństwie do tego w większości win włoskich stwierdzono obecność OTA w stężeniu zawartym w przedziale od 0,01 do 4,00 µg/l, przy czym najbardziej skażone były wina z południowych regionów. Wina czerwone zawierały znacznie większe ilości toksyny niż wina białe. Przyczyna tych różnic tkwi w technologii produkcji.



Ochratoksyna A

Rysunek 6. Wzór strukturalny ochratoksyny A

Figure 6. Molecular structure of ochratoxin A

Do substancji szkodliwych dla zdrowia zalicza się też siarczany(IV). Jak wykazaliśmy we wstępie, są one celowo wprowadzane do wina. Dopuszczalna ich ilość w przeliczeniu na SO_2 wynosi 160 mg/l w czerwonym wytrawnym winie i 210 mg/l w białym. Wina słodkie mogą zawierać je w znacznie większym stężeniu. Należy wspomnieć, że pewna ilość siarczanów(IV) powstaje też w sposób naturalny w czasie fermentacji przez przemiany aminokwasów zawierających siarkę, a zawartych w winogronach.

UWAGI KOŃCOWE

Z powyższego przeglądu wynika, że wina zawierają nawet do kilkudziesięciu substancji w niewielkich stężeniach, które jednak mogą wywierać istotny wpływ na zdrowie człowieka. Identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie tych substancji stało się możliwe dzięki ogromnemu postępowi w rozwoju technik analitycznych, zwłaszcza chromatograficznych, który obserwujemy w ostatnich latach. Należy również wskazać na znaczenie metod elektroanalitycznych przy ocenie właściwości antyoksydacyjnych wina i jego składników [61–64].

Podczas przechowywania wina bardzo istotne jest zachowanie odpowiedniego poziomu kwasowości. W większości win wartość pH zawarta jest w granicach od 2,8 do 3,8, przy czym bogatsze w kwasy są owoce winorośli uprawianych w bardziej północnych regionach. Zbyt kwaśne wina nie nadają się do picia. Z drugiej strony, przy wyższych wartościach pH wino staje się nietrwałe, gdyż zawarte w nim antyoksydanty (w tym również barwniki antocyjaninowe) łatwiej ulegają utlenieniu tlenem powietrza. Stąd też w celu zwiększenia trwałości win wprowadza się do nich dodatki kwasu winowego lub cytrynowego. Podczas dojrzewania wina zachodzą również reakcje estryfikacji, nie tylko z udziałem etanolu, lecz także substancji fenolowych. Z kolei długotrwałe przechowywanie wina przy bardzo nawet ograniczonym dostępie powietrza, np. w korkowanych butelkach, prowadzi do powolnego brunatnienia, które jest szczególnie dobrze widoczne w przypadku win białych. Przyczyną jest utlenianie związków fenolowych do chinonów [65].

W poprzednich rozdziałach tego przeglądu wskazaliśmy na to, że liczne fenole i polifenole pełniące funkcję antyoksydantów, które są obecne w winie, zwłaszcza czerwonym, wpływają korzystnie na stan zdrowia. Obserwacje epidemiologiczne i kliniczne badania eksperymentalne dowiodły, że regularne i długoterminowe spożywanie umiarkowanych ilości czerwonego wina zapobiega ischemii (niedokrwieniu) i niewydolności serca [66]. Dominuje pogląd, że działanie kardioprotekcyjne wywiera zarówno etanol, jak i fenole zawarte w winie, lecz każdy z tych składników na inny sposób [67]. Na synergetyczne działanie tych składników wskazuje fakt, że ani systematyczne picie umiarkowanych ilości napojów alkoholowych pozbawionych antyoksydantów, ani znacznych ilości samego soku winogronowego nie przynosi tak znacznych skutków zdrowotnych jak spożywanie czerwonego wina [68, 69]. Warto przypomnieć na podstawie informacji zawartych w poprzednich rozdziałach, że antyoksydanty znajdujące się w winie mogą zapobiegać również innym chorobom degeneracyjnym. W ostatnich latach zwrócono też uwagę na antyseptyczne właściwości wina, które były przecież wykorzystywane w starożytnej i średniowiecznej medycynie [30, 70].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Czikiw, J. Łąptiew, *Rośliny lecznicze i bogate w witaminy*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1987, ss. 361–365.
- [2] T. Tarko, A. Duda-Chodak, P. Sroka, P. Satora, E. Jurasz, *J. Food Comp. Anal.*, 2010, **23**, 463.
- [3] E. Łosińska, *Rzeczpospolita*, Nr 262 z 10.11.2011, s. A10.
- [4] *Lecznicze właściwości roślin uprawnych*, praca zbiorowa, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1991, ss. 218–220.
- [5] *Pismo Święte Starego i Nowego Testamentu*, Wydawnictwo Pallotinum, Poznań 1996, s. 1350.
- [6] L.B. Church, *J. Chem. Educ.*, 1972, **49**, 174.
- [7] Z.P. Zagórski, *Czy wiesz co jesz. Przewodnik po dodatkach do żywności*, Wiedza i Życie, Warszawa 1995, ss. 64–65.
- [8] M. Law, N. Wald, *Brit. Med. J.*, 1999, **318**, 1471.
- [9] D.M. Goldberg, *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 14.
- [10] A. Howard, M. Chopra, D.I. Thurnham, J.J. Strain, B. Fuhrman, M. Aviram, *Med. Hypoth.*, 2002, **59**, 101.
- [11] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [12] *Przeciwutleniacze w żywności*, praca zbiorowa pod red. W. Grajka, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007, rozdz. 10.
- [13] J. Małyżko, M. Karbarz, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 17.
- [14] B. Dimitrios, *Trends Food Sci. Technol.*, 2006, **17**, 505.
- [15] B. Sun, I. Spranger, J. Yang, C. Leandro, L. Guo, S. Canáriot, Y. Zhao, Ch. Wu, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 8623.
- [16] I.B. Jaganath, A. Crozier, [w:] *Plant Phenolics and Human Health. Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, red. C.G. Fraga, John Wiley, Hoboken 2010, s. 1.
- [17] R. Shimizu, H. Shimabayashi, M. Moriwaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, **70**, 940.

- [18] N. Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bolwell, C. Rice-Evans, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **322**, 339.
- [19] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, **20**, 933.
- [20] C. Rice-Evans, *Curr. Med. Chem.* 2001, **8**, 797.
- [21] A.S. Pannala, T.S. Chan, P.J. O'Brien, C.A. Rice-Evans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **282**, 1161.
- [22] S. Burda, W. Oleszek, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 2774.
- [23] K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.*, 2002, **13**, 572.
- [24] D.P. Makris, S. Kallithraka, P. Kefalas, *J. Food Comp. Anal.*, 2006, **19**, 396.
- [25] D. Amić, D. Davidović-Amić, D. Bešlo, N. Trinajstić, *Croat. Chem. Acta*, 2003, **76**, 55.
- [26] S.A.B.E. van Acker, M.J. de Groot, D.-J. van den Berg, M.N.J.L. Tromp, G. Donné-Op den Kelder, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, *Chem. Res. Toxicol.*, 1996, **9**, 1305.
- [27] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Food Chem.*, 2011, **125**, 288.
- [28] M.T. Fernandez, M.L. Mira, M.H. Florêncio, K.R. Jennings, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 105.
- [29] P. Mladěnka, K. Macáková, T. Filipický, L. Zatloukalová, L. Jahodář, P. Bovicelli, I.P. Silvestri, R. Hrdina, L. Saso, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 693.
- [30] V. Filip, M. Plocková, J. Šmidrkal, Z. Špičková, K. Melzoch, Š. Schmidt, *Food Chem.*, 2003, **83**, 585.
- [31] B.C. Trela, A.L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1253.
- [32] D.M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas, *J. Chromatogr. A*, 1995, **708**, 89.
- [33] H. Cao, X. Pan, C. Li, Ch. Zhou, F. Deng, T. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1869.
- [34] F. Caruso, J. Tanski, A. Villegas-Estrada, M. Rossi, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 7279.
- [35] F. Billes, I. Mohamed-Ziegler, H. Mikosch, E. Tyihák, *Spectrochim. Acta A*, 2007, **68**, 669.
- [36] J. Del Nero, C.P. de Melo, *Opt. Mater.*, 2002, **21**, 455.
- [37] M. Deak, H. Falk, *Monatsh. Chem.*, 2003, **134**, 883.
- [38] J.M. López-Nicolás, F. García-Carmona, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 7600.
- [39] E. Bernard, P. Britz-McKibbin, N. Gernigon, *J. Chem. Educ.*, 2007, **84**, 1159.
- [40] J.S. Jensen, Ch.F. Wertz, V.A. O'Neill, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 1685.
- [41] A.I. Romero-Pérez, M. Ibern-Gómez, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. de la Torre, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1533.
- [42] R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Romero-Pérez, A.I. Waterhouse, M.C. de la Torre-Boronat, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 281.
- [43] A.I. Romero-Pérez, R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Waterhouse, M.C. de la Torre-Boronat, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2124.
- [44] B. Olas, *Kosmos*, 2006, **55**, 277.
- [45] P. Gresele, Ch. Cerletti, G. Gugliemini, P. Pignaletti, G. de Gaetano, F. Violi, *J. Nutr. Biochem.*, 2011, **22**, 201.
- [46] B. Olas, B. Wachowicz, *Thromb. Res.*, 2002, **106**, 143.
- [47] L. Frémont, *Life Sci.*, 2000, **66**, 663.
- [48] P. Signorelli, R. Ghidoni, *J. Nutr. Biochem.*, 2005, **16**, 449.
- [49] S. Pervaiz, *FASEB J.*, 2003, **17**, 1975.
- [50] F. Natella, M. Nardini, M. Di Felice, C. Scaccini, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1453.
- [51] J.L. Beltrán, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **484**, 253.
- [52] J. Małyszko, S. Michałkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2010, **64**, 467.
- [53] M.I. Fernández-Mar, R. Mateos, M.C. García-Parilla, B. Puertas, E. Cantos-Villar, *Food Chem.*, 2012, **130**, 797.

- [54] J.I. Dudley, I. Lekli, S. Mukherjee, M. Das, A.A.A. Bertelli, D.K. Das, J. Agric. Food Chem., 2008, **56**, 9362.
- [55] M.I. Rodriguez-Naranjo, A. Gil-Izquierdo, A.M. Troncoso, E. Cantos, M.C. Garcia-Parrilla, J. Food Comp. Anal., 2011, **24**, 603.
- [56] J. Timbrell, *Paradoks trucizn. Substancje chemiczne przyjazne i wrogie*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2008, ss. 201–215.
- [57] A.L. Klatsky, Świat Nauki, **2003**(4), 73.
- [58] A.L. Klatsky, N. Udaltsova, Ann. Epidemiol., 2007, **17**, S63.
- [59] N. Delage, A. d'Harlingue, B. Colonna Ceccaldi, G. Bompreix, Food Control, 2003, **14**, 225.
- [60] C. Brera, J.M. Soriano, F. Debegnach, M. Miraglia, Microchem. J., 2005, **79**, 109.
- [61] M. Šeruga, I. Novak, L. Jakobek, Food Chem., 2011, **124**, 1208.
- [62] D. Zhang, L. Chut, Y. Liu, A. Wang, B. Ji, W. Wu, F. Zhou, Y. Wie, Q. Cheng, S. Cai, L. Xie, G. Jia, J. Agric. Food Chem., 2011, **59**, 10277.
- [63] S. Mu, J. Phys Chem. C, 2012, **116**, 3065.
- [64] A.S. Arribas, M. Martínez-Fernández, M. Chicharro, Trends Anal. Chem., 2012, **34**, 78.
- [65] N. Sioumis, S. Kallithraka, E. Tsoutsouras, D.P. Makris, P. Kefalas, Eur. Food Res. Technol., 2005, **220**, 326.
- [66] B. Buemann, J. Dyeberg, A. Astrup, Nutr. Res. Rev., 2002, **15**, 91.
- [67] S. Das, D.D. Santani, N.S. Dhalla, Exp. Clin. Cardiol., 2007, **12**, 5.
- [68] D.M. Goldberg, V. Garovic-Kocic, E.P. Diamandis, C.R. Pace-Asciak, Clin. Chim. Acta, 1996, **246**, 183.
- [69] R. Estruch, E. Sacanella, F. Mota, G. Chiva-Blanch, E. Artúnez, E. Casals, R. Deulofeu, D. Rotilio, C. Andres-Lacueva, R.M. Lamuela-Raventos, G. de Gaetano, A. Urbano-Marquez, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 2011, **21**, 46.
- [70] M.J. Rodríguez Vaquero, M.R. Alberto, M.C Manca de Nadra, Food Control, 2007, **18**, 93.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 marca 2012

