

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕТОДА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВИН

© 2024 г. Я. Э. Сергеева¹, В. М. Пожидаев^{1,*}, Д. Ю. Федосов¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: pojidaev2006@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.04.2024 г.

После доработки 01.04.2024 г.

Принята к публикации 24.04.2024 г.

Химический состав вина зависит от нескольких факторов, определяющих идентичность вина, включая сорт винограда, географическое происхождение, биофизическую среду виноградника, условия сбора урожая и технологии виноделия. Аналитические методы для сортовой идентификации вин основаны главным образом на определении состава и содержания летучих и фенольных соединений с использованием различных хроматографических методов, требующих высококвалифицированного персонала, сложных и дорогих аналитических инструментов. В последнее время первостепенное значение приобрели следующие аспекты анализа вин: быстрота, удобство для пользователя и экономичность. Одним из таких методов является трехмерная флуоресцентная спектроскопия – быстрый, неинвазивный, чувствительный и доступный метод. Полный ландшафт флуоресценции включает в себя информацию о нескольких флуорофорах в составе вина и может рассматриваться как характерный “отпечаток пальца”, который позволит идентифицировать его сортовую принадлежность. Представлены результаты исследования применения трехмерной флуоресцентной спектроскопии для идентификации вин в зависимости от сорта винограда.

DOI: 10.56304/S1992722324601757

ВВЕДЕНИЕ

Состав вина зависит от нескольких факторов, определяющих идентичность вина, включая сорт винограда, географическое происхождение, биофизическую среду виноградника, условия сбора урожая и технологии виноделия [1].

Аналитические методы для сортовой идентификации вин основаны главным образом на определении состава и содержания летучих и фенольных соединений с использованием различных хроматографических методов, которые требуют высококвалифицированного персонала, сложных и дорогих аналитических инструментов [2–5].

Классические методы, в частности газовая хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография, постоянно совершенствуются [6]. Однако в последнее время первостепенное значение приобрели такие аспекты анализа вин, как быстрота, удобство для пользователя и экономичность [7]. Одним из возможных решений в этом направлении могут быть спектроскопические методы (спектроскопия ближнего и среднего ИК-диапазона, УФ-спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и флуо-

ресцентная спектроскопия), характеризующиеся простотой подготовки образцов и высокой скоростью анализа [8].

Одним из аналитических методов с высоким потенциалом для сортовой идентификации вин является трехмерная флуоресцентная спектроскопия – быстрый, неинвазивный, чувствительный и доступный метод, включающий в себя последовательное получение спектров возбуждения и/или излучения на нескольких длинах волн. Преимущество данного метода в том то, что вся информация может быть получена путем одновременного изменения длин волн возбуждения и излучения. Полный ландшафт флуоресценции можно представить в виде матрицы, состоящей из графиков зависимости возбуждения от длин волн излучения. Эта матрица называется матрицей возбуждения–излучения (ЕЕМ) [9].

ЕЕМ состоит из сигналов, полученных от флуорофоров (флуоресцентных молекул), присутствующих в вине, различающихся по интенсивности в зависимости от типа и концентрации. Из-за широкого спектра флуоресцентных соединений, присутствующих в вине, специфическая

ЕЕМ представляет собой перекрывающийся сигнал индивидуального вклада флуорофоров.

Основными флуорофорами в составе вина являются фенольные кислоты, стильбены, антоцианы, флавоноиды и дубильные вещества.

Фенольные соединения представляют собой основную группу веществ, влияющих на органолептические характеристики (цвет, вкус, терпкость и мягкость) и качество вина. Кроме того, данные соединения важны для сохранности пищевых продуктов благодаря их антиоксидантному и бактерицидному действиям [10]. Фенольный состав вина зависит, во-первых, от содержания фенолов в исходном сырье — винограде, на что влияют сорт, год урожая, климатические условия во время созревания и тип почвы, а во-вторых, от методов, применяемых в процессе виноделия, и условий выдерживания/старения [11].

Полифенолы делятся на два семейства: флавоноидные и нефлавоноидные соединения. Наиболее важными нефлавоноидами, содержащимися в вине, являются фенольные кислоты (производные бензойной или коричной кислоты) и соединения, подобные стильбену. Фенольные кислоты представлены в основном катаровой, кутаровой и фертаровой кислотами, которые обычно встречаются в виде сложных эфиров. Гидроксикоричные эфиры являются одной из самых распространенных групп фенольных соединений, содержащихся в винограде [12]. Стильбеноподобные соединения включают в себя ресвератрол, его глюкозид питеид, астрингин и виниферины. Среди флавоноидов важны три подгруппы: флавонолы, флаван-3-олы и антоцианы. Флавонолы содержатся в кожце винограда в виде гликозидов мирцетина, кверцетина, кемпферола, изорамнетина, сирцитина и ларицитрина. Флаван-3-олы (мономерные катехины и полимерные проантоцианидины) представляют собой еще одно большое семейство полифенольных соединений, состоящее в основном из катехина, эпикатехина, галлокатехина, эпигаллокатехина и соответствующих им полимеров, содержащихся в кожце и косточках винограда [13].

Анализ литературных данных показал, что в последнее время при исследовании вин широко используется флуоресцентная спектрометрия, например для количественного определения полифенолов в красном вине [14], изменения содержания антоциановых пигментов в процессе выдержки вина [15], при мониторинге потемнения игристых вин [16], для определения географического происхождения [17] и производителей вин [18, 19].

При сортовой идентификации вин исследования были сосредоточены главным образом на сортах красных вин [20]. Для дифференциации красных вин полученные результаты подвергали многомерному анализу, включая анализ основ-

ных компонентов, анализ независимых компонентов, параллельный факторный анализ, факторный дискриминантный анализ и частичный дискриминантный анализ наименьших квадратов [21]. В случае белых вин для создания простой и эффективной модели идентификации сортов Шардоне, Совиньон Блан и Торронтес использовали алгоритм последовательной проекции с последующим линейным дискриминантным анализом [22].

Таким образом, трехмерная флуоресцентная спектроскопия является одним из аналитических методов с высоким потенциалом для сортовой идентификации вин; типы и количество флуоресцентных молекул варьируются в зависимости от сорта и зрелости винограда; обработка и выдержка вина также влияют на состав данных соединений. Полный ландшафт флуоресценции включает в себя информацию о нескольких флуорофорах в его составе и может рассматриваться как характерный “отпечаток пальца”, который позволит идентифицировать сортовую принадлежность вина.

Цель исследования — оценка возможностей идентификации вин в зависимости от сорта винограда с применением флуоресцентной спектроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. В данной работе проанализировали по шесть образцов коммерчески доступных белых (Ркацители, Алиготе) и красных вин (Саперави, Мерло). Описание вин приведено в табл. 1.

После вскрытия бутылок образцы исследуемых вин отбирали в стеклянные флаконы объемом 4 мл с тефлоновыми крышками и хранили в холодильнике при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Непосредственно перед анализом аликвоты анализируемых образцов центрифугировали (4000 об./мин, 15 мин).

Измерения флуоресценции. Измерения проводили на многофункциональном устройстве для считывания микропланшетов Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX с ксеноновой лампой (программное обеспечение Thermo Scientific™ SkanIt™). Образцы вина объемом 200 мкл помещали в лунки микропланшета (Thermo Scientific™ Nunc™ F96 MicroWell™ Black Polystyrene Plate (Thermo Scientific 237108)) и регистрировали спектры при температуре $25.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ в трех повторях. Щели монохроматоров возбуждения и эмиссии были установлены на 5 нм. Скорость сбора данных — 500 нм/мин. Диапазон длин волн возбуждения (λ_{ex}) и испускания (λ_{em}) составлял 250–500 и 275–600 нм соответственно с шагом длины волны 5 нм. Поверхности регистрировались как множественные эмиссионные спектры. Общее время сканирования одного образца составляло ~30 мин.

Таблица 1. Описание исследованных вин

Шифр	Наименование вина, год урожая	Производитель
321	Ркацители, белое сухое, 2019	ООО “Инкерманский Завод Марочных вин”, изготовитель ООО “Качинский”
322	Ркацители, белое сухое, 2020	
323	Ркацители, белое сухое, 2021	
324	Алиготе Крымское, белое сухое, 2019	ООО “Инкерманский Завод Марочных вин”, Крым
325	Алиготе Крымское, белое сухое, 2020	
326	Алиготе Крымское, белое сухое, 2021	
327	Саперави, красное сухое, 2019	ООО “Инкерманский Завод Марочных вин”, изготовитель ООО “Качинский”
328	Саперави, красное сухое, 2020	
329	Саперави, красное сухое, 2021	
330	Мерло Качинское, красное сухое, 2019	ООО “Инкерманский Завод Марочных вин”, Крым
331	Мерло Качинское, красное сухое, 2020	
332	Мерло Качинское, красное сухое, 2021	

Для каждого образца спектры объединяли в одну матрицу, в результате чего были получены как 3D-поверхности, так и контурные карты в программе Origin (OriginLab, США), версия 9.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены типичные поверхности каждого из исследованных вин различных сортов винограда. Поверхности флуоресценции

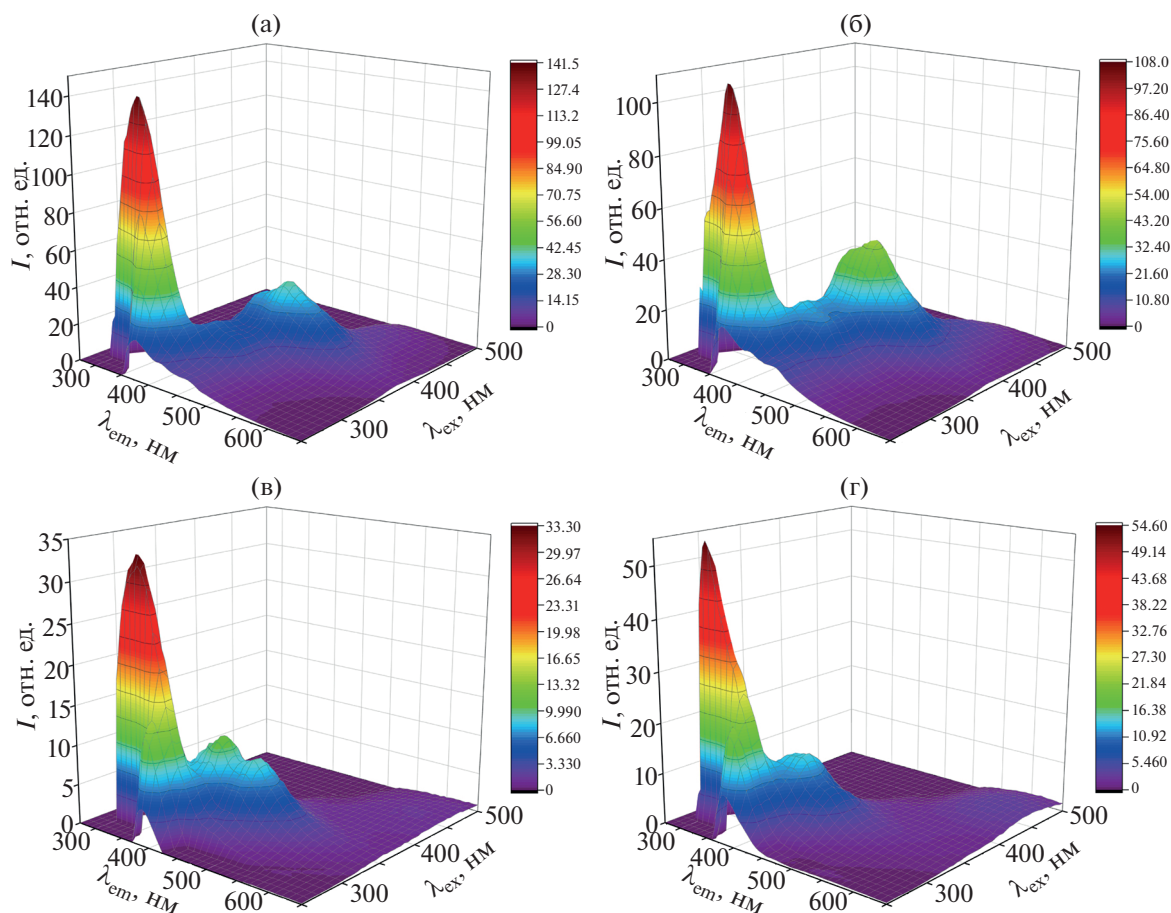


Рис. 1. 3D-поверхности исследуемых вин: белые – Ркацители (а), Алиготе (б); красные – Саперави (в), Мерло (г).

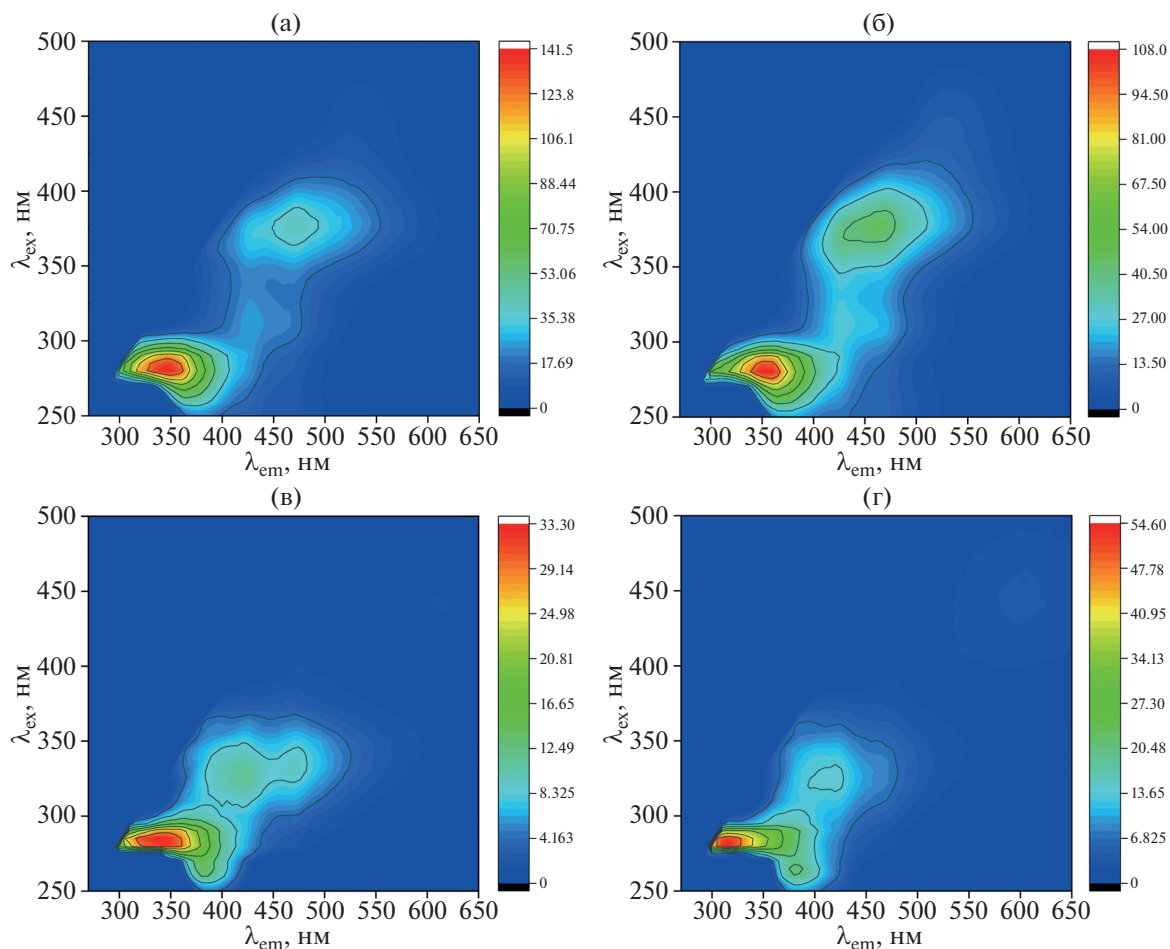


Рис. 2. Контурные карты исследуемых вин: белые — Ркацители (а), Алиготе (б); красные — Саперави (в), Мерло (г).

ЕЕМ исследуемых образцов обеспечивают общий профиль интенсивности в диапазоне сканируемых длин волн возбуждения и испускания, который можно использовать в качестве спектрального отпечатка каждого вина.

Отметим, что флуорофоры разных сортов вин вызывают сложную картину возбуждения—испускания и каждый из исследованных сортов имеет свою уникальную форму поверхности (характеризуется специфическим профилем), что в свою очередь позволяет выявить характеристические максимумы и провести дифференциацию в отношении сорта винограда.

Согласно спектрам, представленным на рис. 1, между исследованными сортами вин существуют различия в количестве пиков/плеч. Так, белые сорта вин характеризуются четырьмя максимумами и одним плечом, тогда как красные — тремя и одним плечом. Отметим, что помимо дифференциации по количеству пиков и общей форме спектров, которая существует среди исследованных сортов, был отмечен специфический отпечаток каждого сорта по индивидуальной интенсив-

ности характеристических сигналов и их соотношению в зависимости от года сбора урожая.

На рис. 2 поверхности ЕЕМ образцов вина представлены в виде контурных карт.

Известно, что 3D-спектры флуоресценции стандартных фенольных соединений обладают характерными спектральными областями с максимумами λ_{ex} в диапазоне 260–360 нм. В [11] были обобщены данные о флуоресцентных свойствах ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) флуорофоров, присутствующих в составе вина. Например, для фенольных кислот и альдегидов в области 260–320/320–440 нм, флавонолов — 260–270/370–420 нм, мономерных и полимерных флаван-3-олов — 280–290/310–360 нм.

Сравнение образцов белых вин Ркацители и Алиготе выявило, с одной стороны, некоторое сходство общих форм — наличие максимумов I–III (табл. 2), с другой стороны, наличие сдвигов основных пиков максимумов, что обусловлено существующими естественными различиями с точки зрения их общего состава.

Таблица 2. Характеристические максимумы

Шифр образца	Максимумы ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)			Интенсивность, усл. ед.		
	I	II	III	I	II	III
Белые вина						
321	280/345	305/425	375/470	100	18.31	29.39
322	280/350	315/430	375/465	100	16.57	23.19
323	280/350	320/425	375/465	100	13.96	12.69
324	280/350	310/430	380/470	100	22.90	40.84
325	280/350	310/430	380/465	100	24.77	42.40
326	280/350	320/425	375/470	100	17.83	21.03
Красные вина						
327	285/335	325/430	330/470	100	34.56	28.31
328	285/345	325/430		100	34.39	
329	280/355	325/425		100	24.28	
330	265/380	280/315	325/420	40.30	100	26.47
331	265/390	280/315	320/395	28.52	100	18.83
332	265/380	280/315	320/420	37.23	100	21.39

При рассмотрении красных вин сортов Саперави и Мерло было выявлено четкое различие, а именно, наличие пика при 265/380–390 нм для Мерло, который отсутствовал при анализе всех прочих сортов вин. При этом максимальная интенсивность пика в случае Саперави была при $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 280–285/335–355, а в случае Мерло – 280/315.

Более детально [23] в области 260–315/315–345 нм были идентифицированы метилсирингат, катехин, а также галловая, протокатеховая, сиреневая, ванилиновая и гомогентизиновая кислоты. При 300–360/380–450 нм наблюдали присутствие кемпферола, а также гидроксикоричных кислот: кофейной, кафтаровой, хлорогеновой, *п*-кумаровой, феруловой, синапиновой. Некоторые фенольные соединения, такие как эллаговая и гентизиновая кислоты, флуоресцируют в более широкой области спектра – 280–380/400–480 нм.

Вариации, проявляющиеся в конкретных парах $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, могут способствовать сортовой идентификации вин: вариации флуорофоров в вине определяют различия в молекулярных “отпечатках пальцев”, что позволит использовать эти химические маркеры (без обязательной идентификации индивидуальных флуорофоров) для верификации вина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аналитические методы для сортовой идентификации вин основаны главным образом на определении состава и содержания летучих и фенольных соединений с использованием различных хроматографических методов, требующих

высококвалифицированного персонала, сложных и дорогих аналитических инструментов. В последнее время первостепенное значение приобрели такие аспекты анализа вин, как быстрота, удобство для пользователя и экономичность.

Анализ литературных данных показал, что спектроскопические методы анализа ввиду их простоты, высокой скорости и точности активно используются при определении подлинности вин и их географического происхождения. Одним из таких методов является трехмерная флуоресцентная спектроскопия – быстрый, неинвазивный, чувствительный и доступный метод.

Для оценки возможности классификации вин в зависимости от сорта винограда было проведено исследование четырех сортов вин (Ркацители, Алиготе, Саперави, Мерло) с применением спектроскопии возбуждения – эмиссионной флуоресцентной матрицы.

Простая визуальная характеристика типичной поверхности ЕЕМ выявила специфические профили, характерные для каждого сорта. ЕЕМ уникальны для каждого отдельного вина и отражают его молекулярный “отпечаток”, а особенности данных ЕЕМ могут применяться при идентификации вин по сортам винограда.

Авторы выражают благодарность генеральному директору ООО “Инкерманский завод марочных вин” (г. Севастополь) Ларисе Петровне Шимчук за предоставленные для исследования верифицированные сортовые образцы вин.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Médina B., Salagoity M.H., Guyon F. et al.* New Analytical Approaches for Verifying the Origin of Food. Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2013. P. 149.
2. *Cozzolino D., Smyth H.E., Cynkar W. et al.* // *Talanta*. 2005. V. 68. P. 382.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.057>
3. *Heras-Roger J., Díaz-Romero C., Darias-Martín J.* // *Food Chem.* 2016. V. 196. P. 1224.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.085>
4. *Ziółkowska A., Wąsowicz E., Jeleń H.J.* // *Food Chem.* 2016. V. 213. P. 714.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.120>
5. *Pozhidaev V.M., Ismagulov A.M., Sergeeva Ya.E. et al.* // *Nanobiotechnology Reports*. 2022. V. 17. P. 932.
<https://doi.org/10.1134/s263516762206009x>
6. *Popîrdă A., Luchian C.E., Cotea V.V. et al.* // *Agriculture*. 2021. V. 11. P. 225.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11030225>
7. *Arslan M., Tahir H.E., Zareef M. et al.* // *Trends Food Sci. Technol.* 2021. V. 107. P. 80.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.021>
8. *Chapman J., Gangadoo S., Truong V.K., Cozzolino D.* // *Curr. Opin. Food Sci.* 2019. V. 28. P. 67.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.09.001>
9. *Suciu R.C., Zarbo L., Guyon F.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. 18250.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54697-8>
10. *Singleton V.L., Esau P.* Phenolic Substance in Grapes and Wine and Their Significance. New York: Academic Press, 1969.
11. *Vinas P., Lopez-Erroz C., Marin-Hernandez J.J., Hernandez-Cordoba M.* // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 871. P. 85.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01087-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01087-0)
12. *Rodriguez R.C., Aguilar M.P., Gomez A.* // *J. Sep. Sci.* 2006. V. 29. P. 2772.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200600206>
13. *Kennedy J.A., Saucier C., Glories Y.* // *Am. J. Enol. Viticult.* 2006. V. 57. P. 239.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.3.239>
14. *Cabrera-Bañegil M., Hurtado-Sánchez M.C., Galeano-Díaz T., Durán-Merás I.* // *Food Chem.* 2017. V. 220. P. 168.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.152>
15. *Agati G., Matteini P., Oliveira J. et al.* // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 10156.
<https://doi.org/10.1021/jf402398a>
16. *Elcoroaristizabal S., Callejón R.M., Amigo J.M. et al.* // *Food Chem.* 2016. V. 206. P. 284.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.037>
17. *Dufour E., Letort A., Laguet A. et al.* // *Anal. Chim. Acta*. 2006. V. 563. P. 292.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.005>
18. *Mutavdžić M., Mutavdžić D., Radotić K.* // *Acta Agric. Serb.* 2013. V. 36. P. 169.
19. *Wan Y., Pan F., Shen M.* // *Spectrochim. Acta A*. 2012. V. 96. P. 605.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.07.030>
20. *Sádecká J., Jakubíková M.* // *J. Food Sci. Technol.* 2020. V. 57. P. 2545.
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04291-y>
21. *Azcarate S.M., de Araújo G.A., Alcaraz M.R. et al.* // *Food Chem.* 2015. V. 184. P. 214.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.081>
22. *Airado-Rodríguez D., Durán-Merás I., Galeano-Díaz T., Wold J.P.* // *J. Food Compos. Anal.* 2011. V. 24. P. 257.
<https://doi.org/10.1021/jf8033623>
23. *Ríos-Reina R., Camiña J.M., Callejón R.M., Azcarate S.M.* // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2021. V. 134. 116121.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116121>