

УДК 663.253.2/4.004.12

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ВИНОГРАДНЫХ ВИН

*Жиликова Т.А., Аристова Н.И., Панова Э.П., Лутков И.П., Сластия Е.А., Беляев В.И.*

Проблема качества и безопасности винодельческой продукции включает разработку, как соответствующих нормативов, так и методов контроля. Внедрение систем качества на винодельческом производстве на основе стандартов ISO серии 9000 "Управление качеством продукции", руководством ИСО/МЭК требует современных подходов к контролю качества и безопасности.

Начальным этапом сертификации алкогольной продукции является ее идентификация, базирующаяся на органолептических и инструментальных методах анализа (Табл. 1) [1].

Таблица 1.

Сравнительная характеристика методов идентификации

Группа методов	Преимущества	Недостатки
Органолептические	Простота	Субъективизм оценки
	Доступность	Отсутствие сопоставимых результатов
	Быстрота	Описательный характер
Инструментальные	Объективность	Материальные и временные затраты
	Повторяемость	
	Сопоставимость и проверяемость	Необходимость квалифицированного персонала и испытательной базы
	Выражение результатов в общепринятых единицах измерений	

Основными направлениями исследований в оценке качества и выявления фальсифицированных виноградных вин являются уточнение и дополнение системы физико-химических показателей, применяемой для идентификации, усовершенствование и разработка новых методов анализа этих показателей, удешевление стоимости анализа за счет его быстроты и автоматизации при сохранении требуемой высокой точности.

Указанные выше тенденции, с одной стороны, находят свое выражение в создании специализированных лабораторий, оснащенных оборудованием, созданным на основе современных достижений физической и химической науки: хромато-масс-спектрометрами, газовыми и жидкостными хроматографами, спектрофотометрами ИК, УФ и видимого диапазонов, ЯМР и гамма-спектрометрами, атомно-абсорбционными спектрофотометрами, приборами капельного электрофореза и флуориметрами. Это оборудование позволяет определять за короткий промежуток времени одновременно несколько десятков показателей или же проводить очень тонкий анализ, недоступный другим методам (например, определение подсахаривания вин с помощью ЯМР). При этом высокая стоимость оборудования окупается большим количеством образцов и определяемых показателей, а также ценностью полученных результатов.

С другой стороны, ведется разработка методов анализа с использованием ферментных наборов и биологических сенсоров [2, 3] как более быстрых, дешевых, эффективных и доступных для производства по сравнению со спектрофотометрическими и хроматографическими методами.

Обе стороны современного направления развития методов анализа нашли отражение в последней редакции "Сборника международных методов анализа и оценки вин и сусел", изданном Международной организацией винограда и вина (МОВВ) в 1990 году и переведенном на русский язык в 1993 г. [4]. В сборнике приводится около 50-ти методик анализа, широко внедренных в европейскую практику идентификации вин за период, прошедший после предыдущего издания. Это энзиматические (ферментные) методы, высокоэффективная газожидкостная хроматография, атомно-абсорбционная спектрофотометрия. Они составляют соответственно 8, 18 и 22% от общего количества методик. С учетом спектроскопии ЯМР инструментальные методы составляют половину методик, используемых для идентификации и контроля качества вин.

Отделом химии и биохимии вина в рамках выполнения темплана НИР института и в ходе деятельности испытательного центра по контролю качества пищевой продукции "Магарач", аккредитованного в системе УкрСЕПРО, начиная с 1993 года, ведутся работы по разработке инструментальных методов идентификации вин и сусел с использованием современного приборного парка и методологии комплексного подхода к исследованию состава вин. При этом около 40% анализов по идентификации выполнялось инструментальными методами – на ионном и ВЭЖХ-хроматографах, атомно-абсорбционном спектрофотометре, гамма-спектрометре, спектрофотометре УФ-Вид-диапазона, что соответствует европейскому уровню.

Результатом работы стала разработка следующих инструментальных методов анализа: метод определения оптических характеристик вин, атомно-абсорбционный метод определения тяжелых металлов и основных катионов (меди, цинка, железа, кадмия, свинца, калия, натрия, кальция и магния); гамма-спектрометрический метод определения удельной активности радионуклидов искусственного и естественного происхождения (цезия-137, калия-40, радия-226, тория-232); метод определения массовых концентраций органических кислот (молочной, янтарной, яблочной, винной, лимонной) с помощью жидкостной ионной хроматографии; метод определения содержания лимонной кислоты и

мальвидиндигликозида с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и тонкослойной хроматографии: отдельные химические методы определения массовых концентраций молочной, яблочной, лимонной кислот и глицерина с предварительной обработкой образца на ионообменной колонке и последующей фотоколориметрической регистрацией.

В результате использования этих методов появилась реальная возможность создания и систематического пополнения базы данных по целому спектру показателей вин Украины, что существенно облегчает решение задачи контроля показателей безопасности и качества вин.

Задачей данной работы является представление инструментальных и химических методов анализа виноградных вин, разработанных и применяемых в НИВиВ "Магарач" для контроля качества, безопасности и идентификации винопродукции.

#### **Контроль показателей безопасности винодельческой продукции**

Под понятием "безопасность пищевых продуктов" понимается отсутствие канцерогенного, токсического и мутагенного действия продуктов питания при употреблении их в пищу (МБТ 5061-89). Безопасность пищевых продуктов гарантируется установлением определенных уровней содержания в них загрязнителей химической и биологической природы.

В готовой винодельческой продукции установлены и соответствующими документами регламентируются предельно-допустимые уровни содержания токсичных элементов – свинца, кадмия, мышьяка, ртути, железа, меди, цинка, консервирующих веществ – сорбиновой кислоты или сорбата натрия, свободной и общей сернистой кислоты, а также радионуклидов.

В НИВиВ "Магарач" контроль содержания тяжелых металлов в вине осуществляется методом атомно-абсорбционной спектроскопии, согласно рекомендациям МОВВ. За период с 1999 г. по настоящее время в испытательном центре по контролю качества пищевой продукции "Магарач", аккредитованном в системе сертификации УкрСЕПРО на техническую компетентность, на содержание тяжелых металлов выполнено свыше 1000 анализов. Измерения выполнены на спектрофотометре типа С115-М1 с пламенным атомизатором.

Результаты определения содержания меди, железа и цинка в винах и виноматериалах представлены в табл. 2.

Результаты контроля свидетельствуют о том, что вина и виноматериалы Южного Берега Крыма и Севастопольской зоны по содержанию токсичных элементов можно отнести к экологически чистым продуктам.

#### **Определение содержания щелочных и щелочноземельных металлов**

Кроме тяжелых металлов, в винах присутствуют катионы щелочных и щелочноземельных металлов, определяющих их органолептические характеристики - полноту и гармонию вкуса, а также кристаллическую стабильность.

**Таблица 2.**

**Содержание тяжелых металлов в винах и виноматериалах**

Наименование образца		Элемент	Массовая концентрация, мг/дм <sup>3</sup>
Виноматериалы	Мадера Альминская	Медь	1,5
		Цинк	1,3
		Железо	8,5
	Столовое красное	Железо	5,9
		Цинк	0,6
	Ркацителли	Железо	5,0
Цинк		0,6	
Вина	Херес столовый	Медь	2,2
		Железо	10,0
	Каберне	Железо	6,1
	Портвейн белый	Железо	7,4

Определение массовой концентрации катионов калия, натрия, кальция и магния также проводится на атомно-абсорбционном спектрофотометре С115-М1 с пламенным атомизатором. Калий и натрий измеряются в режиме эмиссии, магний и кальций – в режиме абсорбции излучения. При определении кальция в качестве спектрального буфера используется хлористый стронций (Табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание вышеуказанных катионов металлов не превышает установленных норм. Разработанная методика (РД 00334830.009-98) аттестована в НИВиВ "Магарач" и внесена в реестр Госстандарта Украины.

**Таблица 3.**

**Содержание катионов металлов в сухих виноматериалах урожая 2002 г**

Виноматериал	Массовая концентрация, мг/дм <sup>3</sup>				
	калия	натрия	магния	кальция	сумма
Алиготе	535	20	85	112	752
Ркацителли	625	32	84	112	853
Рислинг рейнский	540	18	68	67	693
Каберне Совиньон	815	29	111	72	1027

**Контроль активности радионуклидов**

Контроль в винопродукции ведется в ИЦ «Магарач» методом гамма-спектрометрии. В 1993-1996 г.г. было проведено исследование содержания естественных (калий-40, радий-226, торий-232) и искусственных (цезий-134, цезий-137) радионуклидов в почве.

структурных элементах виноградного растения и в винах Крыма [5]. Измерения проводились с помощью гамма-спектрометра на базе многоканального анализатора импульсов типа АМА-03Ф-4 и сцинтилляционного детектора БДЭГ-20Р1. Удельная активность (УА) радионуклидов определялась методом "окон" с помощью программного обеспечения АК1. Результаты измерения УА радионуклидов в почвах виноградников (данные по 20-ти образцам), и диапазоны изменения УА радионуклидов в лозе, листьях, структурных элементах ягоды и в вине представлены в табл. 4.

**Таблица 4.**

**Средняя удельная активность радионуклидов**

Радио-нуклид	Почва Бк/кг	Лоза. Бк/кг	Листья. Бк/кг	Выжимка. Бк/кг	Гребни. Бк/кг	Семена. Бк/кг	Сок. Бк/дм <sup>3</sup>	Вино. Бк/ дм <sup>3</sup>
<sup>40</sup> K	477±140	48-56	98-105	240-1000	340-800	100-400	61-600	14-26
<sup>226</sup> Ra	31±9	15-19	15-18	16-40	40-47	10-30	4-5	0,1- 0,8
<sup>232</sup> Th	42±12	9-15	4-11	4-25	15-39	4-30	2-8	0,1-0,9
<sup>137</sup> Cs	20±6	-	-	2-9	5-14	1-18	1-2	0-0,09

Полученные значения удельной активности радионуклидов в почве и вине, представленные в таблицах, согласуются с данными немецких ученых 1991 года, свидетельствуя об одинаковой степени влияния аварии в Чернобыле на виноградники Крыма и Германии.

С радиоэкологической точки зрения, зафиксированные нами величины удельной активности и цезия-137 в почве, винограде и винах Крыма значительно ниже существующих допустимых уровней.

**Определение основных органических кислот вина**

С принятием законов по стандартизации и сертификации, адаптированных к европейским нормам и директивам, сделан важный шаг на пути сближения национальной системы стандартизации с европейской и международной. Сертификат качества становится фирменной визиткой для участия в международной торговле. Если страны признают результаты испытаний согласно двухсторонним договорам, то отпадает необходимость повторного тестирования продукции, проверяются только отсутствующие показатели, и на основе этого выдается национальный сертификат.

Для квалифицированного заполнения сертификата и бюллетеня анализа необходимо апробировать методы ЕЭС по Постановлению ЕЭС № 2676/90, в том числе и метод определения массовой концентрации лимонной кислоты.

Арбитражный метод основан на выделении лимонной кислоты с помощью анионообменной смолы путем фракционного элюирования, и далее – щадящем окислении ее в ацетон и отделении последнего дистилляцией. Ацетон в дистилляте

определяли иодометрически: отгоняемый вместе с ацетоном уксусный альдегид предварительно окисляли до уксусной кислоты.

В свете решения задач по гармонизации национальной системы стандартизации, сертификации и ее адаптации к международным стандартам испытательным центром (ИЦ) "Магарач" проведена апробация арбитражного метода МОВВ определения лимонной кислоты в образцах винопродукции, в ходе которой были усовершенствованы следующие приемы: подготовки колонки, подбора марки ионообменной смолы, перевода анионообменной смолы в ацетатную форму, стандартных добавок лимонной кислоты к исследуемому образцу. Показано, что вместо импортной ионообменной смолы ДАУЭКС возможно использование отечественного аналога смолы.

Таким образом, результаты апробации метода МОВВ определения массовой концентрации лимонной кислоты ИЦ "Магарач" с учетом усовершенствованных приемов и дополнений позволяют повысить контроль качества выпускаемой продукции в соответствии с международными требованиями на пути сближения национальной системы стандартизации и сертификации с международной.

Нами также разработан модифицированный фотоколориметрический метод определения лимонной кислоты в сусле и вине с предварительным выделением суммы кислот на ионообменной смоле и последующим колориметрированием [6]. Оптимальные условия проведения этого метода анализа устанавливали, исходя из выбора ионообменной смолы, элюента, оптимальной скорости элюирования, длины волны, расстояния между рабочими гранями кюветы и времени образования стабильного аддукта. В его основу положена фотометрическая реакция лимонной кислоты с диазотированной сульфаниловой кислотой в присутствии сильного окислителя – тетраацетата свинца, вследствие которой образуется аддукт желтого цвета. Для выделения лимонной кислоты из объекта исследования и ее определения в элюате в качестве ионообменника использовали сильноосновной анионит. В качестве элюента использовали сульфат натрия. Относительная погрешность предлагаемого метода определения лимонной кислоты в сусле и вине составила 0,66-2,3%. На основании проведенных исследований разработана Методика выполнения измерений (МВИ) массовой концентрации лимонной кислоты в сусле и вине фотоколориметрическим методом, который является достаточно точным и не требует дорогостоящего налаженного оборудования.

Для ускорения процесса получения информации о составе органических кислот нами разработана методика определения в сусле и вине одновременно пяти органических кислот: молочной, янтарной, яблочной, винной и лимонной.

Измерения могут выполняться как с использованием ионной хроматографии, так и с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии [7]. В первом случае используется ионный хроматограф типа "Цвет 3006" и хроматографическая колонка "Элсиан-1". Процесс пробоподготовки сводится к дегазации образца и разбавлению его дистиллированной водой. Расчет массовых концентраций проводится методом абсолютной калибровки с использованием стандартных растворов определяемых кислот

(Рис.1). Методика прошла метрологическую аттестацию в ИВиВ "Магарач" (РД00334830.029-2002).

Более быстрое определение массовой концентрации лимонной кислоты проводится методом ВЭЖХ на высокоэффективном жидкостном хроматографе "Миллихром-4". Этот метод также метрологически аттестован (РД 00334830.31-2002) [8].

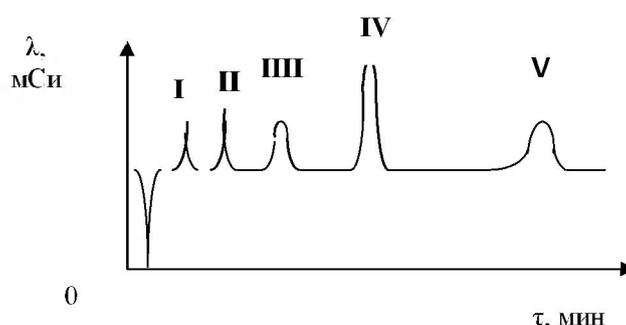


Рис.1. Хроматограмма смеси стандартных растворов органических кислот вина: 0 – отрицательный пик дистиллированной воды элюента; пики: I – молочной кислоты; II – янтарной кислоты; III – яблочной кислоты; IV – лимонной кислоты+системный пик; V – винной кислоты.

#### **Определение массовой концентрации глицерина**

Определение массовой концентрации глицерина является важным элементом в контроле качества вин различных типов. Для этой цели применяют ряд методов химического анализа, газовой и жидкостной хроматографии. Метод газовой хроматографии отличается быстротой и отсутствием пробоподготовки образца, но он неприменим для высокосахаристых сред, таких как сусло на ранних стадиях ферментации. Предпочтительным в этом случае является колориметрический метод, основанный на окислении глицерина в формальдегид.

Недостатком метода является увеличение времени анализа за счет удлинения процедуры пробоподготовки образца.

Для определения массовой концентрации глицерина в ИЦ "Магарач" апробирован, модифицирован и применяется колориметрический метод МОВВ, подробно изложенный в работе [9]. Метод основан на окислении глицерина йодной кислотой в формальдегид после пропускания предварительно разбавленного образца вина через анионообменную смолу для фиксации сахаров, маннита и сорбита. Формальдегид взаимодействует с флороглюцином с образованием окрашенного соединения с максимумом поглощения при длине волны 480 нм. Оптическая плотность образца измеряется на фотоэлектроколориметре.

Так как глицерин накапливается в ходе ферментации виноградного сусла в количестве до 6-12 г/дм<sup>3</sup> и выше, его уровень позволяет судить о качестве вина. Очень низкое содержание глицерина в готовой винопродукции может свидетельствовать о ее фальсификации.

**Обнаружение в вине продуктов переработки гибридных сортов винограда**

Директивами Европейского Союза (ЕС № 1493/1999, Статья 19 и ЕС № 883/2001, Статья 21) введено ограничение на импорт в страны ЕС красных виноградных вин, произведенных из винограда, полученного межвидовым скрещиванием. Специфическим маркером межвидовых гибридов является пигмент темно-окрашенного винограда – мальвидин-3,5-дигликозид (МДГ).

Для обнаружения МДГ в красных и розовых винах нами применен метод ВЭЖХ на хроматографе «Милихром-4» с колонкой Nucleosil C18 размером 100,0 x 2,0 мм. Детектирование ведется на длине волны 520 нм. Содержание мальвидин-3,5-дигликозида в образце определяется по площади его пика. Для градуировки использовали растворы МДГ, выделенного нами из кожицы *Vitis cinerea* и очищенного с использованием препаративной жидкостной хроматографии.

Предварительный отбор образцов для ВЭЖХ-анализа осуществляется с помощью разработанного нами простого и быстрого полуквантитативного метода определения состава пигментов с использованием тонкослойной хроматографии на силикагеле (пластины Silufol UV256 или Sorbfil). Подобранный хроматографическая система позволяет эффективно разделять основные группы антоциановых пигментов: дигликозиды ( $R_f=0.25\pm 0.05$ ); моногликозиды ( $R_f=0.45\pm 0.05$ ) и 6'-ацелированные моногликозиды ( $R_f=0.60\pm 0.05$ ). На рис. 2 и 3 представлены ТСХ и ВЭЖХ хроматограммы образцов, принадлежащим к различным ботаническим видам (Каберне – Совиньон (*Vitis Vinifera*); Виллар Нуар (*Vitis Labrusca*) и межвидовым гибридам (Молдова (*Vitis Vinifera X Vitis Labrusca*)).

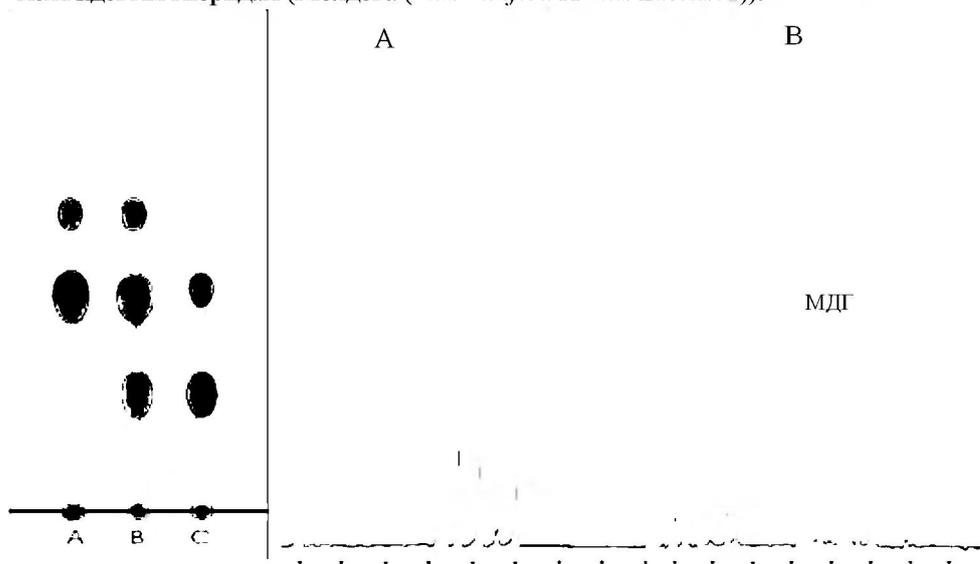


Рис. 2. Результат ТСХ анализа экстрактов свежей кожицы винограда: А – Каберне Совиньон; В – Молдова; С – Виллар Нуар.

Рис. 3. ВЭЖХ хроматограммы экстрактов свежей кожицы винограда: А – Каберне Совиньон; В – Молдова.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что разработанные методы позволяют не только установить присутствие специфического маркера – мальвидиндигликозида, но и определить его количественное содержание, что актуально для производителей вин, экспортируемых в страны ЕС.

#### **Контроль разбавления вина водой**

Быстро оценить количество добавленной воды в вине можно путем измерения его комплексной диэлектрической проницаемости на сверхвысоких частотах, так как ориентационная поляризация образца в этом диапазоне электромагнитных волн обусловлена только молекулами свободной, не связанной с растворенными веществами, воды. Метод детектирует добавку в вино уже 1% воды, не требует предварительной пробоподготовки, объем анализируемой пробы не превышает 0,5 см<sup>3</sup>, а сам процесс измерения занимает несколько секунд и результат легко выводится на компьютер [10].

Диэлектрические параметры виноградных вин могут быть использованы для идентификации образцов, полученных разбавлением водой либо брожением виноградной выжимки.

#### **ВЫВОДЫ**

В результате проведенных научных исследований в ИЦ "Магарач" разработаны и аттестованы МУ МВИ массовой концентрации яблочной кислоты в сусле и винах (РД 0033480011), массовой концентрации молочной кислоты в сусле и винах (РД 00334830.013), МВИ массовой концентрации лимонной кислоты в сусле, винах, безалкогольных напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (РД 00334830.031), массовой концентрации органических кислот (винной, яблочной, молочной, янтарной, лимонной) в сусле, виноматериалах и винах методом жидкостной ионной хроматографии (РД 00334830.029). Также апробированы современные методы контроля качества вин, определяемые постановлением ЕЭС № 2676/ 90 и изложенные в сборнике [4], методики выявления фальсификации вин. Разработанные и аттестованные МВИ применяются при проведении испытаний в аккредитованном в системе сертификации УКРСЕПРО испытательном центре по контролю качества пищевой продукции "Магарач", часть из них внесены в Реестр Госстандарта Украины (Доповнення № 1 до Переліку атестованих методік вимірювати вмісту забруднювачів та інших речовин хімічного, біологічного чи іншого походження в харчових продуктах та продовольчій сировині"), включены в новый сборник "Методов технохімічного контролю в виноделії" под ред. д.т.н., проф. В.Г.Гержиковой, а также в проект инструкции по технохімічному контролю технологічних процесів виробництва виноградних вин, шампанських (игристых) и коньячных виноматериалов, разработанный в ИВиВ

«Магарач». Испытательный центр по контролю качества пищевой продукции "Магарач" соответствует ДСТУ № 3412 и аккредитован НААУ на техническую компетентность в системе сертификации УкрСЕПРО. Это позволяет проводить анализ показателей качества и безопасности вин и сусел на высоком методическом и техническом уровне, совершенствовать существующую систему контроля качества выпускаемой продукции, что является особенно актуальным в связи с разработкой и внедрением на предприятиях Системы управления качеством, отвечающей требованиям международных стандартов серии ISO 9000.

#### Список литературы

1. Гержикова В.Г., Аникина Н.С., Жилиякова Т.А. и др. Разработка современных инструментальных методов идентификации виноградных вин // Вестник «Крымское качество». Научно-технический сборник. – 2005. – №1 (4). – С. 95-103.
2. Pavlishko N.M., Ryabinina O.V., Zhilyakova T.A., Sakarov I.Yu., Gerzhikova V.G., Gonchar M.V. Oxidase-Peroxidase Method of Ethanol Assay in Fermented Musts and Wine Products // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2005. – № 6 (41). – P. 604-609.
3. Шкотова Л.В., Сластья Е.А., Жилиякова Т.А., Солдаткин О.П., Шуманн В., Дзядевич С. Амперометричний біосенсор для аналізу етанолу у вині та у виноградному суслі під час його ферментації // Укр.біохім.журн.- 2005. – № 1 (77). – С. 96-103.
4. Сборник международных методов анализа и оценки вин и сусел. Под ред. Н.А. Мехузла. М. – «Пищевая промышленность», 1993. – 320 с.
5. Макаров А.С., Колосовский Ж.А., Жилиякова Т.А., Щербак С.А., Антипов В.П. Содержание естественных и искусственных радионуклидов в почве, винограде и вине Крыма // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2000. – № 2. – С. 26-28.
6. Аристова Н.П., Жилиякова Т.А., Беляев В.П. Модифицированный метод определения лимонной кислоты в суслах и винах // Труды научного центра виноградарства и виноделия. ИВиВ «Магарач». – 2001. – Т. 3. – С. 85-87.
7. Аристова Н.П., Лутков И.П., Жилиякова Т.А. Определение органических кислот в сусле и вине // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1999. – №9. – С. 65-67.
8. Аристова Н.П., Сластья Е.А., Жилиякова Т.А., Панова Э.П., Кацева Г.Н. Контроль содержания лимонной кислоты в суслах, винах и безалкогольных напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Биология, химия. – 2002. – Т.15(54), № 1. – С. 115-117.
9. Жилиякова Т.А., Гержикова В.Г., Семенчук А.В., Черноусова И.П. Исследование динамики накопления глицерина в ходе брожения виноградного сусла // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2003. – № 3. – С. 18-21.
10. Жилиякова Т.А., Ткачев И.Ф., Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В. Диэлектрические характеристики белых столовых и крепких вин по данным СВЧ-диэлектromетрии // Виноделие и виноградарство. – 2005. – №1. – С. 30-32.

*Поступила в редакцию 01.03.2006 г.*