

ANNA STÓJ

METODY WYKRYWANIA ZAFALSZOWAŃ WIN

Streszczenie

W pracy przedstawiono rodzaje zafałszowań win, takie jak: nieprawidłowa deklaracja odmiany winogron, regionu pochodzenia, winobrania, dodatek wody, cukru, glicerolu i barwienie win. Do wykrywania zafałszowań win stosuje się spektrometrię masową, jądrowy rezonans magnetyczny, atomową spektrometrię emisyjną, chromatografię gazową, chromatografię cieczową i elektroniczny nos. Analiza zafałszowań win jest narzędziem do wyeliminowania nieuczciwych producentów i utrzymania zaufania konsumentów na konkurencyjnym rynku UE.

Słowa kluczowe: zafałszowanie, wino, GC-MS, LC-MS, NMR, ICP-MS, ET

Wprowadzenie

Kontrola jakości wina jest tradycyjnie silnie związana z próbą oceny jego autentyczności [2, 22, 29]. Wino jest złożoną mieszaniną kilkuset składników występujących w różnych stężeniach. Głównymi składnikami są: woda, etanol, glicerol, cukry, kwasy organiczne, estry, aldehydy i jony nieorganiczne. Zawartość tych związków zależy m.in. od czynników, takich jak: odmiana, klimat, gleba, stopień dojrzałości winogron, sposób winifikacji [11, 13, 25, 30]. Zafałszowania win mogą polegać na: nieprawdziwej deklaracji odmiany winogron, regionu pochodzenia i winobrania, dodatku wody, cukru, glicerolu, barwieniu win [1, 6, 22, 27].

Do metod analitycznych służących do wykrywania zafałszowań win zalicza się: spektrometrię masową, jądrowy rezonans magnetyczny, atomową spektrometrię emisyjną, chromatografię gazową, chromatografię cieczową i elektroniczny nos [1, 23, 17]. Metody te są często łączone, aby uzyskać jak najwięcej informacji o winie [1, 2]. Wyniki uzyskane za pomocą tych metod podlegają statystycznej interpretacji w celu określenia zróżnicowania oraz sformułowania wniosków. Oprócz wielowymiarowej analizy wariancji i regresji stosuje się techniki rozpoznawania wzorców: metodę naj-

mniejszych kwadratów, czynnikową analizę dyskryminacyjną, badanie zmiennych kanonicznych, hierarchiczną analizę skupień oraz sztuczne sieci neuronowe [2, 18, 25, 29].

Badania autentyczności win prowadzone są w krajach z tradycjami winiarskimi. Badania win produkowanych w Polsce w ostatnich latach dotyczą głównie zawartości polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej [13, 28]. Ponadto oznaczono zawartość składników lotnych w winach z polskich winogron i porównano je z zawartościami w winach hiszpańskich, portugalskich i francuskich [28].

Celem pracy było omówienie rodzajów zafałszowań win oraz metod ich wykrywania.

Nieprawidłowa deklaracja odmiany winogron, regionu pochodzenia i roku zbioru (winobrania)

Jednym z najbardziej istotnych problemów analitycznych w zakresie autentyczności win jest kontrola pochodzenia geograficznego. Jest to ważny problem w kontekście globalizacji rynku wina. Aby usprawnić kontrolę autentyczności win, w 2002 r. zainicjowano projekt „Stworzenie banku danych parametrów analitycznych win pochodzących z krajów trzecich”, sponsorowany przez Komisję Europejską. Wina pochodziły od nowych członków UE (Republika Czeska, Węgry i Rumunia) oraz z krajów zamorskich (południowa Afryka i Australia). Przeprowadzono kompleksowe badania 1600 win, wyprodukowanych z trzech lat zbioru winogron. W winach oznaczono 63 parametry: stosunki izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i $^2\text{H}/^1\text{H}$ w etanolu, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ w wodzie, makroelementy, pierwiastki śladowe i pierwiastki ziem rzadkich, składniki lotne i klasyczne parametry: ekstrakt, kwasowość ogólną, związki mineralne w postaci popiołu, aminy biogeniczne. Stwierdzono, że w każdym kraju ważnym źródłem zmienności danych z trzech lat zbioru były różnice między autentycznymi winami (wyprodukowanymi na małą skalę) i tymi samymi znajdującymi się w sprzedaży (wyprodukowanymi na dużą skalę). Największą zmienność zaobserwowano w autentycznych winach, co mogło być związane z małą skalą produkcji, wpływającą na wiele parametrów w tych winach [22, 24].

Region pochodzenia geograficznego win można ustalić na podstawie pomiaru stosunku izotopów węgla i wodoru w etanolu oraz tlenu w wodzie. W procesie wzrostu i dojrzewania, na winogrona oddziałuje wiele czynników regionalnych, klimatycznych, środowiskowych i antropogenicznych, które wpływają na skład izotopowy obecnych w nich pierwiastków [22, 24, 32]. Bardzo dokładnym wskaźnikiem składu izotopowego danego pierwiastka jest stosunek izotopowy, określający ilość atomów jednego izotopu do drugiego w danej substancji. Skład izotopów węgla w etanolu oraz tlenu w wodzie można określić za pomocą spektrometrii masowej stosunków izotopowych (IRMS). Pomiary stosunków izotopów stabilnych wykonuje się w próbkach gazowych. Wyniki podawane jako delta ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$), określają odchylenie stosunku izotopów w próbce od

standardów. Natomiast skład izotopów wodoru (D/H) w etanolu można oznaczyć za pomocą jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [20, 33]. Badania wykazały, że zarówno autentyczne, jak i komercyjne wina z Południowej Afryki miały istotnie wyższe stosunki izotopów wodoru w etanolu oraz tlenu w wodzie od win pochodzących z krajów europejskich, natomiast rozróżnienie win czeskich i węgierskich na podstawie (D/H) etanolu i $\delta^{18}\text{O}$ wody nie jest jednoznaczne [22, 24]. Na podstawie stosunków izotopów tlenu w wodzie win pochodzących ze stanów: Waszyngton, Oregon i Kalifornia, ze zbioru w 2002 r. stworzono model regresji, który wprowadzono do systemu informacji geograficznej (GIS). Model GIS jest pierwszym tego rodzaju, który pozwala jednoznacznie przewidzieć $\delta^{18}\text{O}$ wody w winie, zależnie od regionu i roku zbioru winogron [32].

Zafalszowania win polegające na nieprawdziwej deklaracji odmiany winogron, regionu pochodzenia i roku zbioru można ocenić poprzez analizę widma NMR metabolitów za pomocą technik statystycznych, umożliwiających klasyfikację win (PCA, PLS-DA). Pomimo stosunkowo niskiej czułości w porównaniu z innymi technikami, NMR ma wiele zalet: jest techniką niedestrukcyjną, przygotowanie próbek jest proste i zajmuje mało czasu, zbieranie danych jest szybkie, za pomocą NMR można wykryć i kompleksowo scharakteryzować wiele składników organicznych, w złożonej mieszaninie jaką jest wino [1, 25, 26, 30]. Warunki środowiska w winnicy wpływają na metabolity winogron i win. Dzięki spektroskopii ^1H NMR wyszukano różnice w metabolitach w pulpie, skórkach, pestkach i winach z trzech różnych regionów Korei Południowej. Winogrona rosnące w regionach z dużą ekspozycją na słońce i małą ilością opadów wykazały wyższe zawartości cukrów, proliny, Na, Ca i jednocześnie niższe zawartości kwasu jabłkowego, kwasu cytrynowego, treoniny, alaniny i trygoneliny w porównaniu z rosnącymi w regionach ze stosunkowo małą ekspozycją na słońce i z dużymi opadami. Wpływ warunków środowiska zaobserwowano również w winach. Wina pochodzące z najbardziej nasłonecznionego regionu Yeongcheon zawierały więcej kwasu mlekowego, proliny, glicerolu oraz mniej 2,3-butanodiolu, kwasu jabłkowego, winowego, cytrynowego i bursztynowego w porównaniu z winami pochodzącymi z regionu Chochiwon o największej ilości opadów [26]. Spektroskopia ^1H NMR była używana do wyszukania różnic w metabolitach win produkowanych z różnych odmian winogron i w różnych regionach. Uzyskano znaczne różnice między winogronami Campbell Early, Cabernet Sauvignon i Shiraz. Metabolitami, które wykorzystano do rozróżnienia win były: 2,3-butanodiol, kwas mlekowy, kwas octowy, prolina, kwas bursztynowy, kwas jabłkowy, glicerol, kwas winowy, glukoza i związki polifenolowe. Zawartość proliny w kalifornijskich winach Cabernet Sauvignon była wyższa niż w australijskich i francuskich, australijskim Shiraz i koreańskim Campbell Early [25]. Ponadto stwierdzono, że za pomocą techniki NMR można rozróżnić wina włoskie produkowane z tej samej odmiany winogron, ale w różnych regionach Włoch i w różnych latach. Dzięki ^1H NMR i ^{13}C NMR zidentyfikowano kilka ważnych składników win Aglianico pochodzących z regionu Ba-

silicata i Campania na południu Włoch. Charakterystyka NMR win polegała tylko na kilku dobrze wyodrębnionych składnikach chemicznych, takich jak: kwas bursztynowy, 2,3-butanodiol, prolina, w przypadku których sygnał NMR był łatwy do zidentyfikowania [30]. Wykonano również widma ^1H NMR ekstraktów polifenoli z 67 win z głównych regionów winiarskich w Grecji. Ekstrakty przygotowano przy użyciu żywicy adsorpcyjnej XAD-4. Polifenole tworzyły metaboliczny fingerprint winogron i w konsekwencji win, który pozwolił na odróżnienie win z różnych winnic tej samej strefy produkcyjnej i z różnych zbiorów [1].

Gleba, na której uprawia się winorośl, wpływa na zawartość pierwiastków w winie, dlatego innym cennym narzędziem do oceny pochodzenia geograficznego win jest wieloelementowa analiza pierwiastków, za pomocą spektrometrii masowej z indukcyjnie wzbudzoną plazmą (ICP-MS) [4, 9, 10, 22]. Tą metodą przeprowadzono wieloelementową analizę 112 hiszpańskich i angielskich win, pochodzących z różnych regionów. Stwierdzono, że najlepszym sposobem ciągłej nebulizacji próby była wstrzykowa analiza przepływowa (FIA). Jednoznacznie zidentyfikowano region pochodzenia win hiszpańskich oraz rozróżniono białe wina hiszpańskie i angielskie [4]. Podjęto również próbę rozróżnienia 127 białych win niemieckich pochodzących z czterech bardzo blisko położonych regionów: Baden, Rheingau, Rheinhessen i Pfalz, mających certyfikat pochodzenia. Oznaczono stężenie 13 pierwiastków: Li, B, Mg, Ca, V, Mn, Co, Fe, Zn, Rb, Sr, Cs i Pb w winach rozcieńczonych 1:20. Jako standardu wewnętrznego używano In. Dane zinterpretowano za pomocą dwóch technik rozpoznawania wzorców (QDA, drzewa klasyfikacyjne). Pierwsza technika pozwoliła na rozróżnienie regionów z dokładnością 83 %, przy czym użyto tylko 8 pierwiastków: Li, B, Mg, Fe, Zn, Sr, Cs i Pb, a możliwość przewidywania pochodzenia nowych próbek wynosiła 76 %. Dokładność drugiej techniki wynosiła 84 %, a klasyfikacji win dokonywano tylko na podstawie czterech pierwiastków: Li (bardzo mała zawartość w próbkach z Baden), Zn (anormalnie mała zawartość w próbkach z Rheingau), Mg i Sr (pierwiastki ważne do rozróżnienia próbek z Rheinhessen i Pfalz). Możliwość identyfikacji nieznanymi winami za pomocą tej techniki wynosiła 74 %. W związku ze zbyt małą dokładnością przewidywania pochodzenia próbek stwierdzono, że żadna z tych technik nie jest wystarczająca do kontroli nieprawidłowego znakowania win [9]. Natomiast inne badania zawartości pierwiastków wykazały, że można uzyskać 100 % klasyfikację win. Oznaczono 40 pierwiastków w winach z trzech ważnych regionów południowej Afryki: Stellenbosch, Robertson i Swartland, z czego 20 pierwiastków: Li, B, Mg, Al, Si, Cl, Sc, Mn, Ni, Ga, Se, Rb, Sr, Nb, Cs, Ba, La, W, Tl i U wykazywało różne zawartości w winach z tych regionów. W celu klasyfikacji win zastosowano analizę dyskryminacyjną par, która wcześniej nie była używana do oceny pochodzenia win. Klasyfikację przeprowadzono w trzech krokach, w każdym kroku sprawdzano czy wino pochodzi z danego regionu czy nie. Kombinacja pierwiastków charakteryzująca wina z poszczególnych

regionów była inna dla każdego regionu. Funkcje dyskryminacyjne uwzględniały następujące pierwiastkach: Al, Mn, Rb, Ba i W dla regionu Stellenbosch, Se, Rb, Cs i Tl dla regionu Robertson oraz Al, Mn, Rb, Sr, Ba i Tl dla regionu Swartland [10].

Pochodzenie geograficzne win wpływa na profile składników lotnych. Aromat wina tworzy ponad 1000 składników zaliczanych do różnych grup chemicznych: kwasy, alkohole, aldehydy, estry, eter, węglowodory, ketony, laktony, składniki azotowe, siarkowe, terpeny. Składniki lotne można oznaczyć za pomocą chromatografii gazowej/spektrometrii masowej (GC-MS). Poziomy stężenie składników lotnych są różne, wahają się od kilku mg/l do kilku ng/l, dlatego przed analizą próbki poddaje się ekstrakcji/zagęszczaniu za pomocą technik fazy nadpowierzchniowej: odpędzania i wyłapywania (P&T) oraz mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) [3, 7, 15, 19]. Pierwszą technikę stosowano do analizy związków lotnych w białych winach (Airen, Chardonnay, Cigüente, Gewustraminer, Macabeo, Malvasia, Montúa, Pardina, Riesling, Viognieri Viura) i czerwonych winach (Cencibel, Garnacha, Graciano, Mencía, Merlot, Syrah, Tempranillo) pochodzących z 7 różnych regionów Hiszpanii. Większość win białych i czerwonych pogrupowano na podstawie ich pochodzenia. Przykładowo białe wina z regionu Castilla la Mancha zawierały więcej octanu izoamylu (zapach bananów), 1-propanolu i 1-butanolu (zapach gorzki), a białe wina z regionu Badajoz – izowalerianu etylu [3]. Natomiast drugą technikę ekstrakcji wykorzystano do charakterystyki zapachu czerwonego wina Mencía z oznaczeniem pochodzenia "Valdeorras DO". To wino zawiera znaczne stężenia wyższych alkoholi (96,4 % oznaczonych substancji lotnych). Estry i octany etylu dostarczają takich nut zapachowych, jak: bananowa, truskawkowa, zielonego jabłka, ananasa i gruszki, wyższe alkohole – nuty roślinne, a β -jonony – przyjemnego zapachu fiołkowego, charakterystycznego dla tego wina [19]. Techniki SPME użyto także do rozróżnienia 46 win czerwonych, różowych i mieszanych z regionu La Rioja w Hiszpanii. Wina zostały sklasyfikowane za pomocą wieloczynnikowych metod statystycznych. Dobre rezultaty osiągnięto dzięki analizie głównych składowych, hierarchicznej analizie skupień i liniowej analizie dyskryminacyjnej. Zmiennymi najbardziej dyskryminującymi były: octan 3-metylo-butylu, oktanian etylu, bursztynian dietylu, kwas heksanowy, 2-fenyloetanol i kwas dekanowy. Możliwość rozpoznawania i przewidywania wynosiła 100 % [7]. Ponadto technikę SPME wykorzystano do oceny zawartości składników lotnych w 4 innych winach hiszpańskich: Rueda, Ribeiro, Penedes i Condado de Huelva. Składniki zidentyfikowano za pomocą GC-MS, a ich zawartość oznaczono za pomocą GC-FID (detektor płomieniowo-jonizacyjny). Wino Rueda zawierało największe stężenia octanu etylu, octanu izoamylu, octanu heksylu i octanu 2-fenyloetylu. Natomiast heksanianu etylu, dekanianu etylu było więcej w winach Rueda, Ribeiro i Condado de Huelva. Dzięki analizie głównych składowych, liniowej analizie dyskryminacyjnej i sieciom neuronowym udało się rozróżnić te wina [15].

Również skład związków fenolowych w winie zależy od regionu pochodzenia, odmiany winogron, czynników środowiskowych, agrotechnicznych, stopnia dojrzałości, procesu winifikacji i wieku wina [14, 16, 21]. Profile związków fenolowych w winogronach i winach hiszpańskich Tempranillo wykonano przy użyciu wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Do detekcji pochodnych kwasu benzoowego i cynamonowego, antocyjanów, flawonoli i stilbenów, wykazujących charakterystyczną absorbancję w zakresie UV-VIS zastosowano detektor diodowy (UV-VIS-DAD), a do detekcji flawon-3-oli, mających właściwości fluorescencyjne – detektor fluorescencyjny. Ta zoptymizowana metoda może być wykorzystana do kontroli jakości win [14]. Do analizy polifenoli w różnych typach win sycylijskich Marsala użyto metody HPLC-DAD. Oprócz związków fenolowych, oznaczono także cukry i metale ciężkie. Następnie dokonano statystycznej klasyfikacji danych za pomocą kanonicznej analizy dyskryminacyjnej (CDA). Stwierdzono, że Fine Ambra Secco, Superiore Ambra Secco, Vergine, Fine Oro Dolce i Superiore Riserva Marsala mogą być poprawnie sklasyfikowane na podstawie składu polifenoli, cukrów i metali ciężkich. Ponadto jeden z modeli statystycznych wykazał, że zmiennymi z najwyższą siłą dyskryminacyjną były: tyrozol, kwas kawowy, procyjanidyna B₁, katechina, kwercetyna, kaempferol, laktoza, ramnoza, cynk, miedź i ołów [16]. Porównano także możliwości oceny wieku wina metodą HPLC-DAD i metodą elektronicznego nosa (ET). Elektroniczny nos jest definiowany jako przyrząd analityczny złożony z chemicznych sensorów selektywnych w stosunku do określonych składników i narzędzia do obróbki danych. W metodzie ET używa się prostych przyrządów, przygotowanie próby jest minimalne, metoda jest tania i szybka. Wina Madeira, tak jak inne wina z kontrolowanym pochodzeniem, są przedmiotem zafałszowań i odtwarzania. Podobnie, jak inne wina wzmocnione, mają bardzo długi „czas życia”, wysoką jakość i cenę wzrastającą wraz z ich wiekiem. Dlatego poszukuje się szybkich metod oceny wieku win Madeira. Przebadano białe (Bual, Malvasia i Vardelho) i czerwone (Tinta Negra Mole) wina Madeira mające 3, 6, 10 i 17 lat. Za pomocą HPLC-DAD oznaczono 24 składniki: polifenole, kwasy organiczne i furany. ET składał się z 26 chemicznych potencjometrycznych sensorów. W młodych winach oznaczono wyższe stężenia kwasu sinapowego i kawowego, a w winach dojrzałych – wyższe stężenia kwasu octowego, protokatechowego i wanilinowego, wanieliny i trans-resweratrolu. Wina 3-letnie zawierały więcej kwasu galusowego i elagowego, wina 6-letnie – więcej kwasu jabłkowego, szczawowego, cytrynowego, p-kumarowego i epigallokatechiny. Między winami 10- i 17-letnimi występowały różnice pod względem zawartości kwasu mrówkowego i aldehydu syringowego. Obróbka statystyczna wyników za pomocą ANOVA wykazała, że metodą HPLC-DAD można oszacować odmianę winogron i wiek wina, a metodą ET – wiek wina, przy czym dokładniejszą metodą oceny wieku wina był ET [21].

Dodatek wody, cukru, glicerolu, barwienie win

Szaptalizację (dodatek cukru) stosuje się w celu zwiększenia zawartości alkoholu, co jest niezbędne dla stabilności i smakowitości win. Przepisy europejskie zezwalają na dodatek cukru tylko w niektórych strefach [6]. W trakcie fermentacji wina około 92 % cząsteczek cukru ulega fermentacji alkoholowej, w wyniku której powstaje etanol, a pozostałe 8 % – glicerolo-pirogronowej, w wyniku której powstaje glicerol. Glicerol może wspierać doznania smakowe i łagodność wina, często jest wskaźnikiem wysokiej jakości win. Ponadto wpływa na zawartość ekstraktu bezcukrowego, który jest podstawą klasyfikacji jakościowej win w wielu krajach Europy. Glicerol jest dodawany do win w celu zamaskowania ich niskiej jakości [6, 31].

Zafalszowania win polegające na rozcieńczeniu wodą, dosłodzeniu czy dodatku glicerolu można wykryć za pomocą metod izotopowych. Dodatek wody ocenia się poprzez pomiar stosunków izotopów $^2\text{H}/^1\text{H}$ i $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ w wodzie, a dodatek cukru i glicerolu poprzez pomiar stosunku izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w cukrze, etanolu i glicerolu za pomocą metod GC-IRMS [8, 12, 31, 33]. Komisja Europejska powołała projekt Bevabs w Join Research Center we Włoszech. Celem tego projektu jest gromadzenie informacji w postaci banku danych o winach produkowanych na terenie Europy. Dane są dostarczane przez sieć laboratoriów z krajów Unii Europejskiej. W ramach projektu poddano analizie 2 wina dostarczone przez jeden z krajów UE, który miał podejrzenia odnośnie autentyczności tych win deklarowanych jako pochodzące z innego kraju UE. Wina te nie miały wskazanego roku produkcji, więc parametry izotopowe ($\delta^{13}\text{C}$ etanolu i $\delta^{18}\text{O}$ wody) porównano z wartościami z trzech ostatnich zbiorów, dla zadeklarowanego kraju pochodzenia. Pojedyncza interpretacja $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{18}\text{O}$ wykazała, że analizowane parametry wątpliwych próbek mieściły się w zakresie banku danych. Jednak kombinacja wartości obydwu stosunków izotopów wskazała nieprawidłową deklarację. Wysokie wartości $\delta^{13}\text{C}$ zaobserwowane w wątpliwych winach wyjaśniono jako dodatek cukru otrzymanego z roślin należących do szlaku metabolicznego C_4 (np. cukru z trzciny cukrowej), stosowanego w celu zwiększenia zawartości alkoholu, co jest zabronione w winach z deklaracją kraju pochodzenia, a niskie wartości $\delta^{18}\text{O}$ były wskaźnikiem rozcieńczania win. W przypadku tych 2 win zafalszowanie miało na celu zwiększenie objętości poprzez dodatek wody i zwiększenie zawartości alkoholu poprzez dodatek cukru [8]. Analizy stosunków izotopów węgla w glicerolu pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a także w glicerolu syntetycznym wykazały istotne różnice między $\delta^{13}\text{C}$ glicerolu pochodzenia roślinnego i $\delta^{13}\text{C}$ glicerolu pochodzenia zwierzęcego. Ponadto w winach niemieckich wartości $\delta^{13}\text{C}$ glicerolu były niższe w porównaniu z $\delta^{13}\text{C}$ etanolu i cukru. Jednak na tej podstawie nie można wykryć dodatku glicerolu do win [12]. Natomiast prawdopodobnie będzie to możliwe dzięki wyrafinowanej metodzie, poprzez pomiar $\delta^{13}\text{C}$ pojedynczych atomów węgla, otrzymanych na drodze chemiczno-enzymatycznej hydrolizy wiązań w cząsteczce glicerolu. Biorąc pod uwagę znaczne różnice między ogólną wartością $\delta^{13}\text{C}$ a wartością $\delta^{13}\text{C}$ w położeniu 1 oraz mię-

dzy $\delta^{13}\text{C}$ w położeniu 1 i $\delta^{13}\text{C}$ w położeniu 2 być może uda się wykryć dodatek syntetycznego glicerolu do win. Konieczne są dalsze badania w tym kierunku [31].

Ostatnio opracowano nowatorską metodę oznaczenia stosunku izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ za pomocą chromatografii cieczowej/spektrometrii masowej stosunków izotopowych (LC-IRMS). W 35 winach hiszpańskich oznaczono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ za pomocą dwóch metod: GC-IRMS i LC-IRMS. Zoptymalizowano kilka parametrów wpływających na oddzielenie glicerolu i etanolu od wina w metodzie GC-IRMS. Wykazano bardzo mocną korelację ($r = 0,99$) między $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w glicerolu i etanolu otrzymanymi za pomocą dwu metod. Nowo opracowana metoda LC-IRMS jest pierwszą metodą izotopową, która pozwala na bezpośrednie oznaczenie $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dwóch składników podczas jednej analizy, w próbce ciekłej bez konieczności izolacji etanolu i glicerolu, eliminującą trudności techniczne związane ze złożonym przygotowaniem próby. Próba jest rozcieńczana, filtrowana i wstrzykiwana [6].

Wina mogą być barwione przez dodatek ekstraktów owoców bogatych w antocyjany, np. ekstraktu z bzu czarnego. Ten rodzaj zafałszowania można stwierdzić na podstawie analizy antocyjanów metodą HPLC. W winach portugalskich z winogron Roriz zidentyfikowano takie antocyjany, jak: delfinidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-glukozyd, petunidyno-3-glukozyd, peonidyno-3-glukozyd, a w ekstrakcie z bzu czarnego - cyjanidyno-3-sambubiozydo-5-glukozyd oraz koeluujące antocyjany: cyjanidyno-3-glukozyd i cyjanidyno-3-sambubiozyd. Obecność cyjanidyno-3-sambubiozydo-5-glukozydu, charakterystycznego dla bzu czarnego, na chromatogramie wina świadczyła o barwieniu win. Mimo, że gradient eluentów stosowany do rozdziału antocyjanów win nie rozdzielił cyjanidyno-3-glukozydu i cyjanidyno-3-sambubiozydu w ekstrakcie z bzu czarnego, to te antocyjany były wykorzystane do wykrywania barwienia win. Niewielki pik cyjanidyno-3-glukozydu w winie znacznie się powiększył po dodaniu ekstraktu z bzu czarnego zawierającego koeluujące antocyjany [5].

Podsumowanie

Wina, szczególnie wina markowe, z uwagi na znaczącą wartość ekonomiczną są narażone na fałszowanie. Do wykrywania zafałszowań win stosuje się wiele metod instrumentalnych. Wyniki uzyskane za pomocą tych metod poddawane są analizie statystycznej, w celu stworzenia wzorców klasyfikacyjnych. Ocena autentyczności win polega często na analizie wielu parametrów, co zwiększa szanse prawidłowej oceny wina.

Literatura

- [1] Anastasiadi M., Zira A., Magiatis P., Haroutounian S. A., Skaltsounis A.L., Mikros E.: ^1H NMR-based metabonomics for the classification of Greek wines according to variety, region, and vintage. Comparison with HPLC data. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 11067-11074.

- [2] Arvanitoyanins I.S., Katsota M.N., Psarra E.P., Soufleros E.H., Kallithraka S.: Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 321-326.
- [3] Aznar M., Arroyo T.: Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1165**, 151-157.
- [4] Baxter M. J., Crews H. M., Dennis M. J., Goodall I., Anderson D.: The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chem.*, 1997, **3 (60)**, 443-450.
- [5] Bridle P., Garcia-Viguera C.: A simple technique for the detection of red wine adulteration with elderberry pigments. *Food Chem.*, 1996, **2 (55)**, 11-113.
- [6] Cabanero A. I., Recio J. L., Ruperez M.: Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 722-728.
- [7] Cabredo-Pinillos S., Cedron-Fernandez T., Saenz-Barrio C.: Differentiation of claret, rose, red and blend wines based on the content of volatile compounds by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, **6 (22)**, 1317-1323.
- [8] Calderone G., Guillou C.: Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. *Food Chem.*, 2008, **106**, 1399-1405.
- [9] Castineira Gomez M. M., Feldmann I., Jakubowski N., Andersson J. T.: Classification of German white wines with certified brand of origin by multielement quantitation and pattern recognition techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 2962-2974.
- [10] Coetzee P.P., Steffens F.E., Eiselen R.J., Augustyn O.P., Balcaen L., Vanhaecke F.: Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 5060-5066.
- [11] Czech A., Malik M., Pitucha I., Woźnica A.: Porównanie zawartości związków bioaktywnych w winach czerwonych pochodzących z różnych krajów europejskich. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **4 (65)**, 142-148.
- [12] Fronza G., Fuganti C., Grasselli P.: Determination of the ¹³C content of glycerol samples of different origin. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 477-480.
- [13] Gawlik M.B., Nowak Ł., Baran M.: Analiza właściwości win produkcji polskiej. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008, **1(51)**, 15-20.
- [14] Gómez-Alonso S., García-Romero E., Hermosín-Gutiérrez I.: HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J. Food Comp. Anal.* 2007, **20**, 618-626.
- [15] Jurado J.M., Ballesteros O., Alcazar A., Pablos F., Martin M.J., Vilchez J.L., Navalon A.: Differentiation of certified brands of origins of Spanish white wines by HS-SPME-GC and chemometrics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **3 (390)**, 961-970.
- [16] La Torre G.L., La Pera L., Rando R., Lo Turco V., Di Bella G., Saitta M., Dugo G.: Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. *Food Chem.*, 2008, **110**, 729-734.
- [17] Monsandl A.: Progress in the authenticity assessment of wines and spirits. *Analisis Magazine*, 1997, **3 (25)**, 31-38.
- [18] Mermelstein N. H.: Analyzing wine. *Food Technol.*, 2010, **1**, 62-66.
- [19] Noguero-Pato R., González-Barreiro C., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J.: Quantitative determination and characterization of the main odorants of Mencía monovarietal red wines. *Food Chem.*, 2009, **117**, 473-484.

- [20] Ogrinc N., Košir I.J., Spangenberg J.E., Kidrič J.: The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 424-430.
- [21] Rudnitskaya A., Rocha S.M., Legin A., Pereira V., Marques J.C.: Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine. *Anal. Chim. Acta*, 2010, **662**, 82-89.
- [22] Schlesier K., Faulh-Hassek C., Forina M., Cotea V., Kocsi E., Schoula R., van Jaarsveld F., Witkowski R.: Characterisation and determination of the geographical origin of wines. Part I: overview. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **230**, 1-13.
- [23] Simpkins W., Harrison M.: The state of the art in authenticity testing. *Trends Food Sci. Technol.*, 1995, **6**, 321-328.
- [24] Smeyers-Verbeke J., Jäger H., Lanteri S., Brereton P., Jamin E., Faulh-Hassek C., Forina M., Römisch U.: Characterisation and determination of the geographical origin of wines. Part II: descriptive and inductive univariate statistics. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **230**, 15-19.
- [25] Son H.- S., Kim K.- M., van der Berg F., Hwang G.- S., Park W.- M., Lee C.- H., Hong Y.- S.: ¹H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 8007-8016.
- [26] Son H.- S., Hwang G.- S., Kim K.- M., Ahn H.- J., Park W.- M., van der Berg F., Hong Y.- S., Lee C.- H.: Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using ¹H NMR analysis coupled with multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 1481-1490.
- [27] Targoński Z., Stój A.: Zafalszowania żywności i metody ich wykrywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **4 (45)**, 30-40.
- [28] Tarko T., Duda-Chodak A., Sroka P., Satora P., Jurasz E.: Physicochemical and antioxidant properties of selected polish grape and fruit wines. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2008, **7 (3)**, 35-34.
- [29] Tuszyński T., Czernicka M.: Zafalszowania żywności i napojów oraz metody ich wykrywania. *Laboratorium 2008*, **7-8**, 38-43.
- [30] Viggiani L., Castiglione Morelli M.A.: Characterization of wines by nuclear magnetic resonance: a work study on wines from the Basilicata region in Italy. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 8273-8279.
- [31] Weber D., Kexel H., Schmidt H. L.: ¹³C-pattern of natural glycerol: origin and practical importance. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 2042-2046.
- [32] West J.B., Ehleringer J.R., Cerling T.E.: Geography and vintage predicted by a novel GIS model of wine $\delta^{18}\text{O}$. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 7075-7083.
- [33] Wierzchnicki R.: Autentyczność win. Kontrola autentyczności win metodami Spektrometrii Masowej Izotopów Stabilnych (IRMS). *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2004, **4**, 28-29.

METHODS OF DETECTING ADULTERATION OF WINES

S u m m a r y

In the paper, some types of wine adulteration were presented, such as: misdeclaration as regards grape variety, region of origin, or vintage; adding water, sugar, glycerol, and colouring wine. To detect the adulteration of wines, the following techniques were applied: mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, atomic emission spectrometry, gas chromatography, liquid chromatography, and electronic tongue. The analysis of wine adulteration is a tool to eliminate unfair manufacturers and to maintain the consumer confidence in the competitive EU market.

Key words: adulteration, wine, GC-MS, LC-MS, NMR, ICP-MS, ET 