

SNIF- NMR 技术在葡萄酒质量评价中的应用

蒋 露^{1,2}, 薛 洁¹, 王异静¹, 林 奇², 杜丽娟¹

(1. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100027; 2. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘 要: 综述了点特异性天然同位素分馏核磁共振技术(SNIF- NMR)的原理、发展历程以及在葡萄酒质量评价中的应用。结合本实验室的初步研究成果, 提出 SNIF- NMR 技术是评价葡萄酒质量的重要技术手段。

关键词: 葡萄酒; 点特异性天然同位素分馏核磁共振技术; SNIF- NMR; 质量评价

中图分类号: TS262.6; TS261.4; TS261.7 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2008)07- 0060- 03

Application of SNIF- NMR Technique (Site- specific Natural Isotope Fractionation- Nuclear Magnetic Resonance) in Grape Wine Quality Evaluation

JIANG Lu^{1,2}, XUE Jie¹, WANG Yi-jing¹, LIN Qi² and DU Li-juan¹

(1. China Food Fermentation Industry Research Institute, Beijing 100027; 2. Food Science & Technology Faculty of Yun'nan Agricultural University, Kunming, Yun'nan 650201, China)

Abstract: The operation mechanism and development process of SNIF-NMR were summarized in this paper. Besides, its application in grape wine quality evaluation was introduced. Based on the research in our lab, it was put forward that SNIF-NMR was an important technical measure to evaluate grape wine quality.

Key words: grape wine; site-specific natural isotope fractionation-nuclear magnetic resonance; SNIF-NMR; quality evaluation

2008 年 1 月 1 日起, 我国将正式实施新的葡萄酒标准, 新标准将有关“年份、产区酒”的规定作为强制性标准写进了法规, 但对于年份酒、原产地酒的鉴别, 目前国内仍无有效的检测方法, 那么, 葡萄酒质量监督部门如何去实施有效监管, 消费者又如何去证实产品标注内容的真实性, 都是当前葡萄酒研究部门要解决的问题。

点特异性天然同位素分馏核磁共振技术(SNIF- NMR)是一种国际通用的葡萄酒分析方法, 该技术通过分析葡萄酒乙醇分子中甲基和次甲基位点 D/H 含量的差异, 从而鉴别葡萄酒酿造过程中是否人为进行了加糖、调酒度等不允许的操作。SNIF- NMR 技术已被法国和欧洲许多国家应用于葡萄酒的搀杂检测中, 但我国在此方面还未开展工作, 因此将 SNIF- NMR 技术应用于葡萄酒的研究是我国葡萄酒发展的趋势, 它对实现葡萄酒行业的有效监管、促进葡萄酒生产和市场向规范化发展具有重要意义。

1 SNIF- NMR 技术的原理

在人工、天然和生物合成过程中, 产物分子会具有特殊的同位素比例, 即所谓的“同位素签字”。在生命科学领域, 研究的重要同位素有: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 、 $^2\text{H}/^1\text{H}$ 、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 和 $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, 这些稳定同位素的比例受土壤、空气、

水、纬度、气候、温度、湿度、降雨等因素的影响。另外, 植物在光合作用过程中, 因其新陈代谢的差异, 也会影响物种的同位素签字, 因此, 可以用同位素比值来示踪产品的原产地和鉴别具有相同化学成分而来源不同的物质^[1]。

葡萄酒中的同位素以 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 、 $^2\text{H}/^1\text{H}$ 为主, 在葡萄汁发酵前添加外源糖或利用来源于不同产区的原料进行发酵, 都会影响发酵后酒精和水分子中氘的分布, 氘同位素会在以下 4 个位置重新分布^[1]: 甲基位($\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$)、次甲基(CH_3CHDOH)、羟基位($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$)和水分子(HOD), 这种分布特点被称为点特异性同位素分布。

氘同位素的分布与植株吸收的水分和果园地理气候位置以及植物生物化学过程有着密切联系, 因此, 不同产区葡萄其糖分子中含有不同的点特异性氘含量, 在其被发酵之后, 葡萄酒中乙醇分子的点特异性氘含量相应发生变化。据研究报道, 乙醇分子中甲基位的氘含量在很大程度上取决于发酵糖的地理和生物起源, 而次甲基位氘含量更多地取决于发酵水分子氘的含量^[2]。因此, 通过检测葡萄酒乙醇分子中甲基位和次甲基位点氘含量的变化, 就可以鉴别出葡萄酒在发酵前是否外加糖以及不同产区葡萄酒间的差异。

收稿日期: 2008- 03- 05

作者简介: 蒋露(1984-), 硕士研究生。

SNIF- NMR 技术可以检测出乙醇分子特定位置上氘的相对浓度, 见图 1。

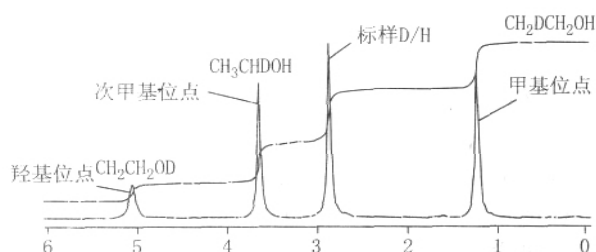


图 1 葡萄酒乙醇分子 ^2H -NMR 分析图谱

图 1 中不同峰代表乙醇分子中不同位点 D/H 的比值, 由于乙醇分子羟基和水分子羟基在核磁共振检测中易发生重叠, 且含量很小, 通常可以忽略不计^[1]。分析时添加一个已知 D/H 含量的内标物质, 从而计算出葡萄酒乙醇分子各位点的 D/H 含量^[3]。

2 SNIF- NMR 技术的发展过程

1980 年, 法国学者 Gerard J. martin 创建了 SNIF- NMR 技术并申请专利保护^[3], 该技术的首次应用即用于葡萄酒外加糖的分析中。1981 年 SNIF- NMR 技术被法国政府采用^[4], 1990 年被国际葡萄与葡萄酒组织 (O.I.V) 作为一种国际通用的葡萄酒分析方法, 欧共体 (EC) 在 1990 年第 2676 号法规中也介绍了该方法的优点, 他们还决定为欧洲葡萄酒产区建立一个有良好参考价值的数据库来辅助和促进该方法的推广普及。1996 年, 点特异性天然同位素蒸馏核磁共振技术 (SNIF- NMR) 被分析化学官方组织 (AOAC) 作为检测果汁中是否添加甜菜糖的官方方法^[5]。

在欧洲, SNIF- NMR 技术已被应用不同成分的分析中, 但应用最广泛的还是食品领域, 通过该技术可鉴别掺假产品、检测发酵食品中外源糖的来源等。目前, 除葡萄酒以外, SNIF- NMR 技术也用于其他食品分析中: 如含酒精饮料、水果汁、调味品和植物油等^[6]。

3 SNIF- NMR 技术在葡萄酒中的应用现状

3.1 SNIF- NMR 在葡萄酒发酵前外加糖检测中的应用现状

根据光合作途径的不同, 植物被分成了 C_3 和 C_4 两大类, 大多数植物, 包括葡萄、甜菜、橘子等都属于 C_3 植物, 它们固定大气中的 CO_2 通过 1, 5- 二磷酸核酮糖的羧基连接两分子的磷酸核酮糖, 该过程伴随着很强的同位素作用^[4]。另外一类就是所说的 C_4 植物, 包括甘蔗和玉米, 通过固定磷酸烯醇式丙酮酸的羧基, 生成草酸, 在这个过程中, 几乎没有同位素变化。葡萄酒生产中添加的外源糖不仅有来自不同光合途径的甘蔗糖, 也有和葡萄同一类型的甜菜糖, 这种不同植物来源的糖可导致发酵乙醇中不同位点的 ^2H 含量发生不同的变化^[7], 因

此, 利用核磁共振技术分析乙醇分子中不同位点的 ^2H 含量, 可鉴别葡萄酒发酵前是否添加了外源糖 (如甜菜糖、甘蔗糖、玉米糖等)^[7]。

自 SNIF- NMR 作为鉴别果酒、果汁发酵前外加糖的有效方法相继被 EC、O.I.V、AOAC 几个官方组织收录以后, 世界各地对其应用的报道屡见不鲜。1998 年, 欧洲学者 Gilles G. Martin 等利用 SNIF- NMR 对果酒、果汁中是否添加甜菜糖进行了检测^[7]。2001 年, 澳大利亚学者 Markus Herderich 等利用 SNIF- NMR 技术对红葡萄酒发酵前是否添加了甘蔗糖、甜菜糖进行了检测, 得出添加甘蔗糖的葡萄酒乙醇甲基位的 ^2H 含量会升高, 而添加甜菜糖的葡萄酒乙醇甲基位的 ^2H 含量会降低。2002 年, 斯洛文尼亚学者 Iztok Joze Kosir 等对其国内 2 个产区葡萄酒加入甜菜糖和甘蔗糖的葡萄酒进行研究, 得到了与 Markus Herderich 等相同的结论^[8]。SNIF- NMR 技术在世界葡萄酒行业中起着非常重要的作用, 而且已经成为鉴别葡萄酒发酵前外加糖的国际通用方法。

3.2 SNIF- NMR 在葡萄酒原产地鉴定中的应用现状

研究表明, 葡萄酒乙醇分子中甲基位 (D/H) 含量在很大程度上取决于发酵糖的氘含量, 它代表着合成乙醇的糖的植物来源^[10], 另一方面, 次甲基位 (D/H) 含量更多地取决于发酵基质的氘含量, 受葡萄生产地的气候情况 (如降雨量、光照强度等) 和原葡萄汁的糖浓度影响^[11]。因此, SNIF- NMR 不仅能检测出掺入的外源糖的类型, 并且, 在某些情况下, 关于葡萄原料的地理起源即原产地也可以被检测出^[11]。

1986 年, Gerard J. Martin 利用 SNIF- NMR 技术结合因式判别分析处理, 得出 (D/H) 与葡萄酒的发酵水有关, 其反映着葡萄酒的原产地来源信息, 提出 SNIF- NMR 方法是可以判断葡萄酒原产地来源的新方法^[11]。随后, 出现了验证此方法的大量研究报道, 但有些报道只利用 ^2H - SNIF- NMR 就可以区分不同产区来源的葡萄, 而有的研究还需要其他同位素参数的参与。如 1991 年意大利学者 Ambrogio Monetti 等利用 SNIF- NMR 研究意大利不同地区、不同年份的葡萄酒^[9], 发现部分地区的数值出现重叠, 单一使用该方法无法有效鉴别意大利的葡萄酒原产地, 需要其他同位素参数的参与; 2001 年西班牙学者 Josep E. 等利用 ^2H - SNIF- NMR 和 ^{13}C - IRMS 对巴伦西亚地区红葡萄酒原产地进行了鉴别^[12], 其分离度较明显; 2002 年, 斯洛文尼亚学者 Iztok Joze Kosir 等利用 SNIF- NMR 对其国内 3 个环境差异明显地区的葡萄酒进行了研究^[8], 发现这 3 个地区的葡萄酒氘同位素存在显著差异, 因此认为 SNIF- NMR 技术可作为原产地葡萄酒的鉴定手段。SNIF- NMR 技术在我国原产地葡萄酒鉴别方面的应用还需要进一步探讨。

4 SNIF- NMR 技术在我国的研究应用现状

虽然 SNIF- NMR 技术已作为 O.I.V 的一种官方分析方法,但在我国葡萄酒的质量评价中的应用仍未见报道。中国食品发酵工业研究院从 2007 年起开始研究 SNIF- NMR 技术在我国葡萄酒质量评价中的应用,目前已经取得了初步成果。

实验按照葡萄酒酿造工艺,生产出全汁干白、干红葡萄酒和添加不同比例蔗糖和甜菜糖的葡萄酒样品,并收集我国不同产区的葡萄酒样品进行核磁共振检测,部分研究结果见图 2、图 3。

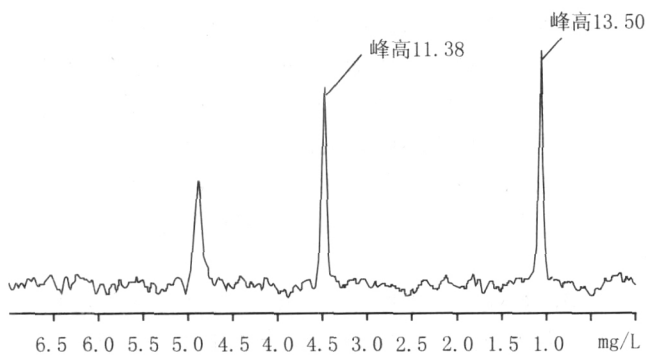


图 2 对照全汁干白葡萄酒 NMR 谱图

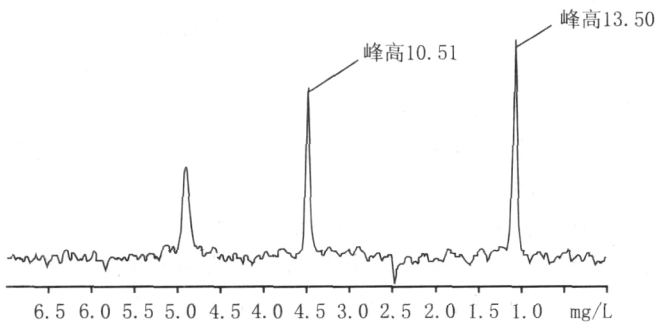


图 3 加入甘蔗糖白葡萄酒 NMR 谱图

分析结果表明,添加甘蔗糖的葡萄酒与对照葡萄酒乙醇中(D/H) / (D/H) 不同,加入蔗糖,其比值明显减少,该研究结果与以前相关报道基本一致。有关原产地葡萄酒的鉴别技术,也已经取得初步的成果,因此 SNIF- NMR 技术必将成为评价我国葡萄酒质量的重要手段。

5 展望

我国加入世界贸易组织已经多年,各方面的标准将逐渐与国际接轨,点特异性天然同位素分馏核磁共振技术作为国际通用的葡萄酒分析方法,在我国葡萄酒标准体系中仍为空白,为了使我国葡萄酒市场健康发展,缩短与世界葡萄酒发达国家的差距,开展葡萄酒年份酒、产地酒的鉴别研究具有非常广阔的应用前景。

利用 SNIF- NMR 技术对葡萄酒中外源糖的加入和原产地的鉴别进行分析,有可能为我国年份酒、产地酒

的鉴别提供一定的技术支持,充分吸收国际上相关的鉴别检验技术成果,首先在几个典型产区进行研究,通过不同学术科技人员协力攻关,必将在该领域里取得突破性进展。

参考文献:

- [1] Jeffrey L.Cross, Thomas N.Gallagher, James J. Leary. The Application of Site-specific natural isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance(SNIF-NMR) to the analysis of alcoholic beverages[J].The Chemical Educator 1998, (5): .
- [2] EC Regulation.Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium (SNIF-NMR) off Eur[J].Comm., 1990,272(33) : 63- 73.
- [3] Carsten fauhl, Reiner wittkowski. Oenological influences on the D/H ratios of wine ethanol[J].the Journal of Agricultural and Food Chemistry,2000, (48): 3979- 3984.
- [4] 牛生洋.葡萄酒及葡萄产品的同位素分析[J].中外葡萄与葡萄酒, 2004, (4) : 52- 53.
- [5] AOAC Official Method. Beet sugar in fruit juices. site-Specific Natural Isotopic Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) method.In: Cuniff P, Ed. AOAC official methods of analysis[J].AOAC International, Gaithersburg, MD, 1996.
- [6] Eric Jamin, Karine Wietzerbin.Multielement, multicomponent, and multisite isotopic profiling for food and beverage authentication[J].Application Note, 2003, (1) : 24- 25.
- [7] Gilles G.Martin, Norbert Nautet.Application of 2H-SNIF-NMR and 13C SIRA-MS analyses to maple syrup: detection of added sugars[J].the Journal of Agricultural and Food Chemistry,1998, (44): 3206- 3213.
- [8] Iztok Jože Košir a, Mitja Kocjan č i b, Nives Ogrinc c, Jurkica Kidri č a;Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines) [J].Analytica Chimica Acta 2002, (429): 195- 206.
- [9] Ambrogio Monetti, Fabiano Reniero, Giuseppe Versini. Inter-regional and interannual variability of ethanol site-specific deuterium content in Italian wines[J].Lebensm Unters Forsch, 1991, (199): 311- 316.
- [10] G.J.Martin, M.L.Martin, F.Mabon, M.J.Michon.A new method for the identification of the Origin of Ethanol in grain and fruit spirits: high-field quantitative deuterium nuclear magnetic resonance at the natural abundance level[J].Agric.Food Chem., 1981, (31): 311- 315.
- [11] Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep Y, Aerny, J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines[J].Agric Food Chem, 1986, (36) : 316- 322.
- [12] Josep E.Gimenez-Miralles. Regional origin assignment of red wines from valencia(Spain) by NMR and 13C IRMS stable isotope analysis of fermentative ethanol[J].Agricultural and Food Chemistry, 2001, (47): 2645- 2652.