

Vinanalyse med NMR-spektroskopi og kemometri

***In vino veritas:* Kan sandhederne afdækkes ad spektroskopisk / kemometrisk vej?**

Af Flemming H. Larsen og Søren B. Engelsen, Kvalitet & Teknologi, Institut for Fødevarevidenskab, Levnedsmiddelcentret (LMC), KVL

Bordvin består hovedsageligt af vand, ethanol, organiske syrer, kulhydrater samt en række aromastoffer, polyphenoler, og farvestoffer. I de seneste år har interessen for vinens sammensætning været stigende, da både forbrugere og indkøbere ønsker en større sikkerhed for vinens kvalitet og ægthed.

Især æble- og mælkesyre er væsentlige for vinens surhed. Derfor benytter en stor del af vinproducenterne en malolaktisk fermentering til at styre forholdet mellem disse syrer og dermed vinens smag. Fermenteringen køres normalt helt til ende, så al æblesyre omdannes til mælkesyre. Ønsker man både æble- og mælkesyre i sin vin, blandes der to vine, hvoraf den ene er malolaktisk fermenteret. Vinens farve bestemmes i høj grad af anthocyaninindholdet (aromatiske polyphenoler). Et kemisk fingeraftryk af de enkelte vine bør derfor som minimum inkludere alle disse ikke-flygtige bestanddele.

NMR og kemometri til vinanalyse

Kvalitet & Teknologi-gruppen på Landbohøjskolen har for nylig, støttet af Mejeribrugets Forskningsfond og Forskningsrådene, foretaget en strategisk satsning på introduktion og brug af NMR-spektroskopi inden for kvalitetskontrol, levnedsmiddelforskning og levnedsmiddelforskeruddannelsen i Danmark. Projektets primære formål er at forbedre forståelsen for og udnytte de unikke muligheder, moderne NMR-spektroskopi i kombination med kemometri giver inden for kvantitativ analyse af komplekse fysisk-kemiske systemer, der typisk forekommer i levnedsmidler.

^1H NMR-spektroskopi er en oplagt metode til vinanalyse, da både aromatiske forbindelser, kulhydrater og syrer med stor præcision kan detekteres og kvantificeres. Imidlertid bliver ^1H NMR-spektre af selv relativt simple enkeltfase fødevarer ofte så komplekse, at der med fordel kan anvendes mønstergenkendelsesmetoder som kemometri. Dermed kan vinene klassificeres, og enkelte komponenter kan kalibreres ift. målinger bestemt ved andre analytiske metoder. Kombinationen er tidligere benyttet til analyse af øl [1,2], bordvin [3] samt juice [4]. Klassisk univariat NMR-analyse er desuden udført på portvin [5]. Som et kuriosum kan det nævnes, at indholdet af eddikesyre i uåbnede vinflasker med ældre kostbare vine kan bestemmes med ikke-destruktiv »wide bore«-NMR-spektroskopi [6].

I dag anvendes NMR allerede til autenticitetsbestemmelse af vine via den isotopbaserede SNIF-NMR-metode [7], hvor deuterium (^2H)/hydrogen (^1H)-forholdet benyttes til at give et isotopisk fingeraftryk af vinens ethanol. Dette indhold er først og fremmest afhængig af ethanolens oprindelse, druetype og geografisk oprindelse, så det er en meget robust metode. Der opnås dog ikke information omkring indholdet af andre komponenter i vinen.

Komponenter i vin

I et indledende studium er 20 vine analyseret: 10 røde, 8 hvide

og 2 rosé. Alle vine er tilsat 10% (volumen-%) D_2O med kemisk skift referencen TSP- d_4 (5.8 mM), og eksperimenterne er udført ved 298 K.

Et spektrum af en hvidvin er vist øverst på figur 1. De tre mest intense resonanser stammer fra vand (H_2O) samt CH_2 - og CH_3 -grupperne i ethanol. Forskellige protoner har kemisk skift i forskellige regioner af NMR-spektret, og ud over ethanol og vand er nogle af disse nemme at identificere, hvilket bl.a. ses af forstørrelsen af udvalgte regioner i figur 1. F.eks. har methylgruppen fra mælkesyre et kemisk skift omkring 1.39 ppm, og anomerprotonen fra α -glucose har et kemisk skift på ca. 5.22 ppm. Andre nemt identificerbare resonanser er ethanal, ravsyre (butandisyre), β -glucose og gallussyre (3,4,5-trihydroxybenzoesyre).

Set fra et sundhedsmæssigt synspunkt er indholdet af f.eks. resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben) af stor interesse. Det er

VI spærrer på vinanalyse

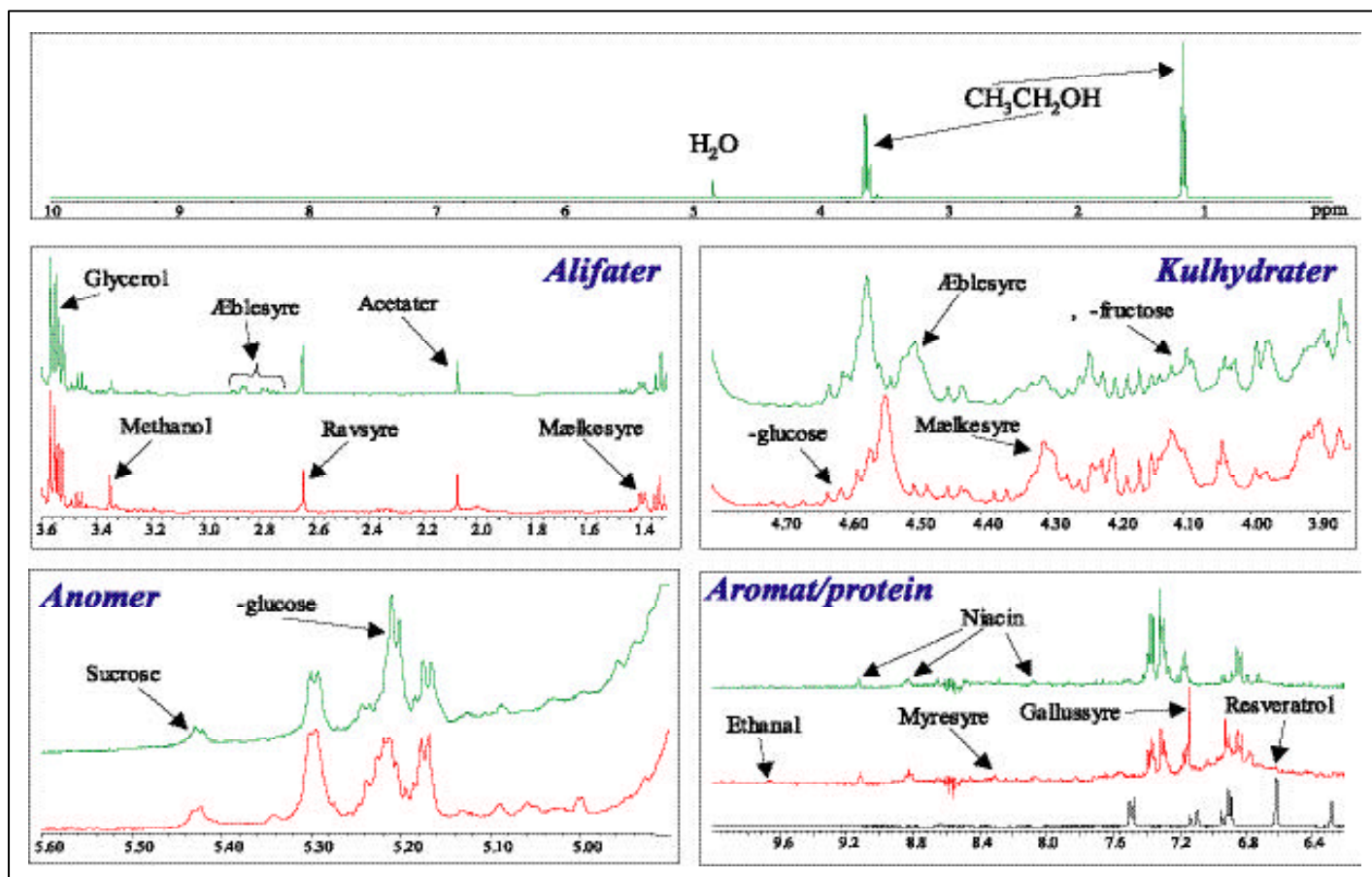
Højopløselig NMR-analyse
- op til 1.000 kr.

Vi tilbyder NMR-analyse af vin til at bestemme indholdet af forskellige komponenter i vinen. Dette kan være nyttigt til kvalitetskontrol og til at identificere vinen.

For yderligere information:
Kontakt os på telefon 1800 10000 eller på vores hjemmeside www.gea.dk.

GEA

GEA Analytical Systems
1800 10000
www.gea.dk



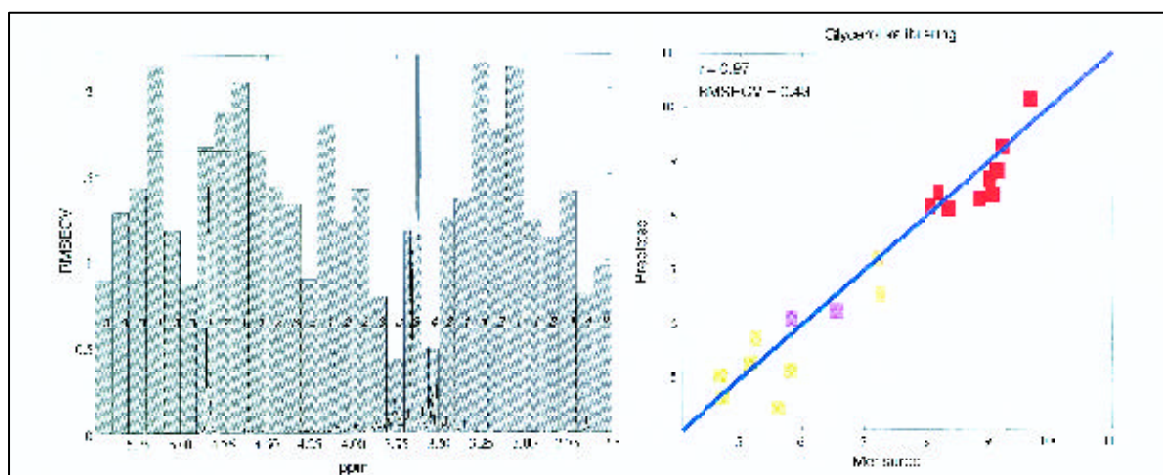
Figur 1. Vandundertrykte ^1H NMR-spektre af hvidvin (grøn) og rødvin (rød). I aromat/protein-regionen er der desuden et spektrum af *trans*-resveratrol (sort).

rapporteret, at denne type stilben nedsætter risikoen for kredsløbssygdomme. Det er også en mulig forklaring på det *franske paradoks* – en vinkomponent, der er ansvarlig for en lav hyppighed af hjerte/kar-sygdomme blandt franskmænd, der spiser en relativt høj fedtholdig kost [8].

Indholdet af resveratrol er højest i rødvin, men det findes også i hvidvin og rosé. Resveratrol optræder i både *cis*- og *trans*-form, og i vin findes også den afledte piceid (5,4'-dihydroxystilbene-3-O- β -D-glucopyranosid), der forekommer i både *cis*- og *trans*-form [9]. Sædvanligvis er koncentrationen af *trans*-resveratrol dog højest.

I figur 1 ses spektre af en rødvin samt *trans*-resveratrol. Hovedparten af resonanserne fra *trans*-resveratrol ligger i samme område som en række relativt intense phenolforbindelser, men netop resonansen ved 6.61 ppm fra de to protoner i benzenringen med to hydroxylgrupper, der er den mest in-

terfereret. I figur 1 ses spektre af en rødvin samt *trans*-resveratrol. Hovedparten af resonanserne fra *trans*-resveratrol ligger i samme område som en række relativt intense phenolforbindelser, men netop resonansen ved 6.61 ppm fra de to protoner i benzenringen med to hydroxylgrupper, der er den mest in-

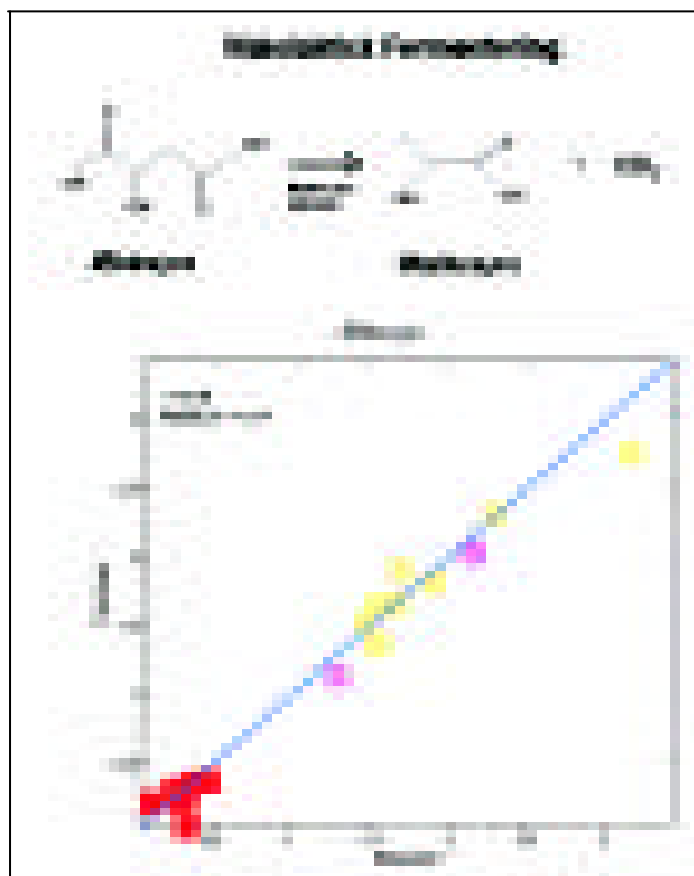


Figur 2. RMSECV-plot af iPLS-beregningerne. Søjlerne markerer de udvalgte intervaller, og tallet i søjlen angiver antallet af komponenter. Til højre ses resultatet af PLS på den optimale region (3.69-3.80 ppm). Firkanterne markerer hvidvin (gul), rødvin (rød) og rosé (lyserød).

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

Ny GC-MS?
- Så er det også os!

Thermo
FISHER SCIENTIFIC CORPORATION
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød



tense i *trans*-resveratrol-spektret, ligger i en isoleret region af spektret, hvor den kan identificeres. Potentielt kan resonansen også stamme fra anthocyaninerne, hvor en ringproton har kemisk skift i området 6.65-6.67 ppm [10], men så burde der også være en resonans i området 8.96-9.05 ppm, og det er der ikke.

Indhold af alkoholer og syrer

Da integralet af resonanstoppene i spektret er proportionalt

Figur 3. PLS af hhv. æblesyre og mælkesyre. Firkanterne markerer hvidvin (gul), rødvin (rød) og rosé (lyserød).



The fourth Knud Lind Larsen Symposium 2006 Organic Chemistry at the Interface to Biology

Copenhagen, 27 - 28 January 2006

AKADEMIET FOR DE
TEKNISKE
VIDENSKABER

How can we use organic chemistry to solve problems in biology?

Organic chemistry has classically been defined as the science investigating the synthesis, structure and reactions of carbon-containing compounds. Chemists have succeeded in de-novo synthesis of extraordinarily complex biologically active natural products, whole proteins and very long DNA fragments, as well as studying their conformations and dynamics and interactions with other molecules. The increasing sophistication of synthetic methodology and analytical tools, coupled with the unbridled imagination of organic chemists, have led us to the point where we can use "tailor-made" molecules to manipulate, perturb, and thereby understand complex biological systems. I.e. it is now possible to design probes targeting specific molecular recognition processes in enzyme reactions or receptor-ligand binding. The study and understanding of complex biological systems at the molecular level will be the central theme of this symposium.

Plenary Lecturers:

Prof. Stan van Boeckel, N.V. Organon, The Netherlands
Prof. Mikael Bols, University of Aarhus, Denmark
Prof. Klaus Müller, F. Hoffmann-la Roche Ltd., Switzerland
Prof. Thomas Carell, Ludwig-Maximilians University, Germany
Prof. Peter Dervan, California Institute of Technology, USA
Anthony Wood, Executive Director, Pfizer Ltd., United Kingdom
Assoc. Prof. Poul Nissen, University of Aarhus, Denmark
Jesper Lau, Director, Novo Nordisk A/S, Denmark
Prof. Tom W. Muir, The Rockefeller University, USA
Prof. Matthew D. Shair, Harvard University, USA
Ole Thastrup, Head of Biosector,
Carlsberg Research Center, Denmark
Prof. Seiji Shinkai, Kyushu University, Japan
Prof. Eric T. Kool, Stanford University, USA

ATV

Lundtoftevej 266,
2800 Kgs. Lyngby

Tlf. 45 88 13 11

lv@atv.dk

Further information: www.atv.dk/a/KLL.html.

med indholdet af den specifikke komponent, kan vinene analyseres både kvantitativt og kvalitativt med NMR-spektroskopi. Hermed kan en vin karakteriseres ud fra det relative indhold af specifikke aromatiske forbindelser, kulhydrater, alkoholer og mindre organiske syrer.

NMR-metoden kan anvendes både undervejs i behandlingen af druerne og under lagringen på fade. Som et eksempel har vi analyseret vinene for deres indhold af glycerol, æble- og mælkesyre, da disse to syrer som tidligere nævnt indgår i den malolaktiske fermentering. Inden NMR-undersøgelserne var alle vinene analyseret vha. IR-spektroskopi (WineScan, FOSS Analytical A/S), så bl.a. indholdet af de to nævnte syrer er kendt. Vinenes pH-værdi var også bestemt med et pH-gennemsnit på 3,51 for rødvinene og 3,22 for hvidvinene. Dette skyldes formentlig, at rødvinene har været udsat for malolaktisk gæring.

Ved at bruge resultaterne fra IR-spektroskopi sammen med de NMR-spektroskopiske data, kan data analyseres kemometrisk - »unsupervised« med Principal Component Analysis (PCA) og »supervised« med Principal Least Squares (PLS) ved at holde de modellerede data op mod de tidligere målte. Det kemiske skift for flere af de udvalgte komponenter – især syrerne – afhænger kraftigt af pH-værdien. For de undersøgte vine varierede pH mellem 2.8 og 3.7, hvorfor det var nødvendigt at forbehandle NMR-spektrene med Warping [11] inden den videre kemometriske databehandling. Princippet i Warping er, at det kemiske skift for samme komponent gøres sammenfaldende i alle prøverne ved at flytte minimalt på resonanserne for de pH-afhængige komponenter.

I det følgende anvendes den konventionelle PLS-metode, hvor NMR-spektret analyseres som en helhed uanset store dynamiske forskelle og interval-PLS (iPLS)-metoden, hvor spektret opdeles i ækvivalente regioner. Sidstnævnte metode er brugt til at analysere vinenes glycerolindhold (figur 2). To regioner er særligt følsomme: 3.48-3.59 ppm (region A) og 3.69-3.80 ppm (region B), i overensstemmelse med forventede ke-

miske skift på ca. 3.56 og 3.76 ppm. På figuren er der angivet et vist antal principalkomponenter for hvert interval. Det bemærkes, at RMSECV for region B med kun 3 principalkomponenter er bedre end for region A med 4 principalkomponenter. Til højre på figur 2 ses det overbevisende PLS-plot for region B med en korrelation på 0.97. På plottet er det tydeligt, at glycerolindholdet i rødvinene er markant højere end i hvid- og rosévine.

Som nævnt er den malolaktiske fermentering meget central i forbindelse med styring af æble- og mælkesyreindholdet i vinene og dermed styringen af vinen mod en mildere og mere kompleks smag, men også mod en mindre frisk og frugtagtig aroma. På figur 3 ses resultatet af PLS (prædikeret mod målt) for hhv. æblesyre og mælkesyre. I begge tilfælde opnås en god korrelation, og det ses, at indholdet af æblesyre i rødvinene er ca. ¼ af det i hvid- og rosévine. Det bemærkes, at vinen med højest æblesyre-indhold er en Muscadet sur lie fra Nantes-regionen i det vestlige Loire (Frankrig), hvilket forklarer, hvorfor netop denne tørre og syrerige vin er en perfekt ledsager til skaldyr – specielt østers og muslinger.

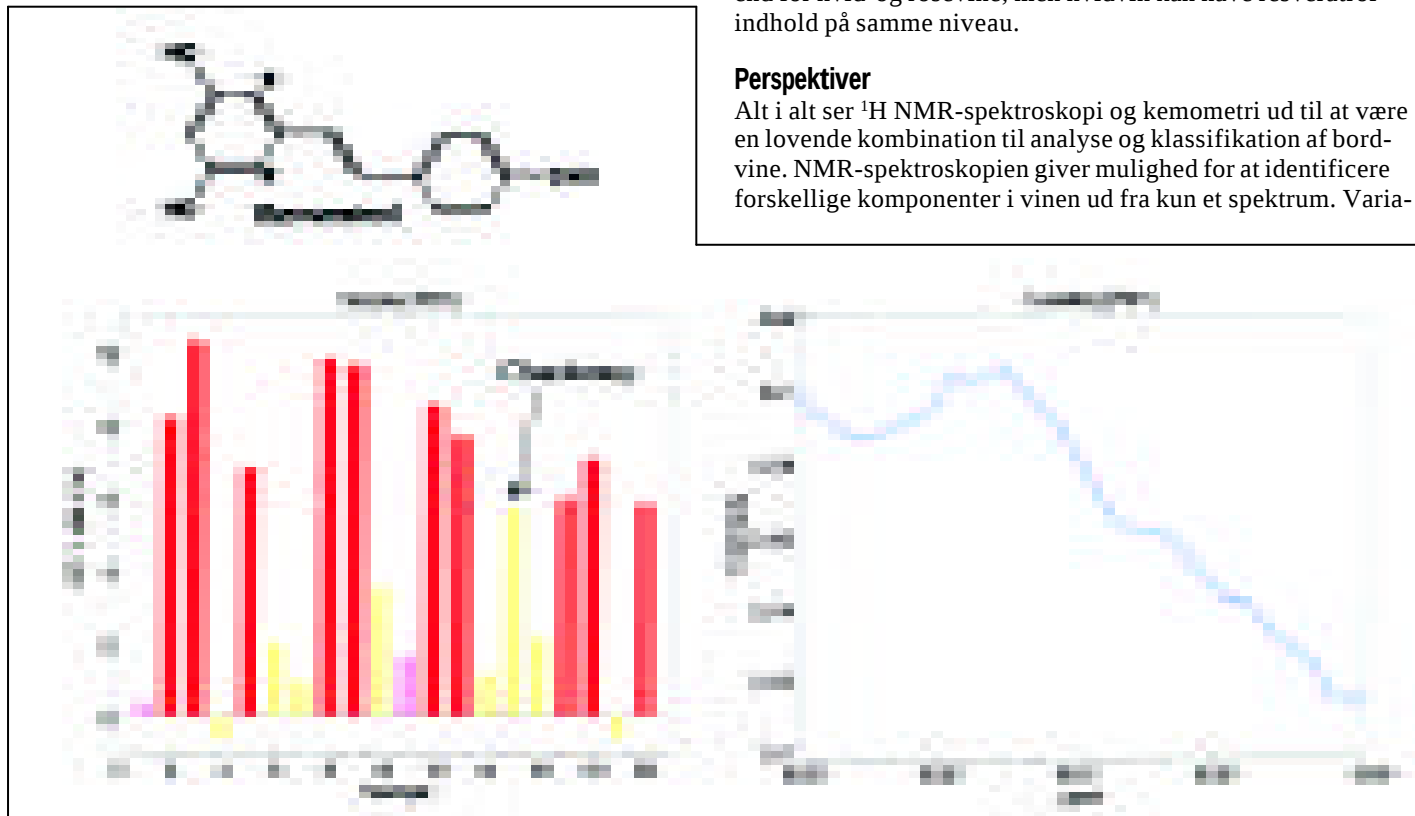
Omvendt forholder det sig for mælkesyre, hvor indholdet i hvid- og rosévine er ca. 1/3 af indholdet i rødvinene. Dog er der i dette tilfælde to hvidvine, der skiller sig ud med et mælkesyreindhold på samme niveau som rødvinene. Disse to vine er hhv. en Liebfraumilch fra Tyskland og en Chardonnay fra Sydafrika. Netop for sidstnævnte vintype er malolaktisk gæring ved at vinde større indpas.

Resveratrol i vin

Trans-resveratrol er også undersøgt vha. PCA ud fra resonansen fra de to protoner markeret med stjerne i figur 4. Vinene kan ved denne PCA adskilles i type (rød samt hvid/rosé), da rødvinene generelt har en signifikant højere score på PC1 end hvid- og rosévinene. En hvidvin (vin 15 – en Chardonnay fra Sydafrika) har dog næsten samme score som rødvinene. Det tyder på, at resveratrol-indholdet generelt er højere for rødvinene end for hvid- og rosévine, men hvidvin kan have resveratrol-indhold på samme niveau.

Perspektiver

Alt i alt ser ^1H NMR-spektroskopi og kemometri ud til at være en lovende kombination til analyse og klassifikation af bordvine. NMR-spektroskopien giver mulighed for at identificere forskellige komponenter i vinen ud fra kun et spektrum. Varia-



Figur 4. PCA af resveratrol i vinene. Søjlerne farve indikerer hvidvin (gul), rødvin (rød) og rosé (lyserød).

tionen af disse komponenter kan undersøges kemometrisk, ligesom enkelte vine kan karakteriseres meget præcist, f.eks. med et højt indhold af α -glucose frem for et højt indhold af fructose/glucose.

En mere omfattende undersøgelse med flere vine, druetyper og processeringsmetoder er dog påkrævet for at opnå en sikker bestemmelse af, hvilke komponenter, der er særligt væsentlige i forbindelse med vinens autenticitet. På dette område er SNIF-NMR endnu den mest effektive metode, men i forbindelse med produktionsstyring og løbende kvalitetskontrol kan kombinationen af ^1H NMR-spektroskopi og kemometri allerede på nuværende stadium bidrage med omfattende specifik information om vinen på ethvert tidspunkt før tapning på flaske. Mens SNIF-NMR kræver locking på ^{19}F og ca. 2 timers analysetid på NMR-spektrometeret, tager det kun få minutter at optage et langt mere detaljeret og høj-S/N proton NMR-spektrum.

E-mail-adresser

Flemming H. Larsen: fhl@kvl.dk

Søren B. Engelsen: se@kvl.dk

Referencer

1. Nord, L. I., Vaag, P., Duus, J. Ø (2004): Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by ^1H NMR Spectroscopy, *Anal. Chem.*, 76:4790-4798.
2. Duarte, I., Barros, A., Belton, P. S., Righelato, R., Spraul, M., Humpfer, E., Gil, A. M. (2002): High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer, *J. Agric. Food Chem.*, 50:2475-2481.
3. Bescia, M. A., Košir, I. J., Caldarola, V., Kidric, J., Sacco, A. (2003): Chemometric Classification of Apulian and Slovenian Wines Using ^1H NMR and ICP-OES Together with HPICE Data, *J. Agric. Food Chem.*, 51:21-26.
4. Belton, P. S., Colquhoun, I. J., Kemsley, E. K., Delgadillo, I., Roma, P., Dennis, M. J., Sharman, M., Holmes, E., Nicholson, J. K., Spraul, M. (1998): Application of chemometrics to the ^1H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties, *Food Chemistry*, 61:207-213.
5. Nilsson, M., Duarte, I. F., Almeida, C., Delgadillo, I., Goodfellow, B. J., Gil, A. M., Morris, G. A. (2004): High-Resolution NMR and Diffusion-Ordered Spectroscopy of Port Wine, *J. Agric. Food Chem.*, 52:3736-3743.
6. Weekley, A. J., Bruins, P., Sisto, M., Augustine, M. P. (2003): Using NMR to study full intact wine bottles, *J. Magn. Reson.*, 161: 91-98.
7. Martin, G. J., Martin, M. L., Mabon, F., Michon, M. J. (1982): Identification of the Origin of Natural Alcohols by Natural Abundance Hydrogen-2 Nuclear Magnetic Resonance, *Anal. Chem.*, 54: 2380-2382.
8. Kopp, P. (1998): Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the »French paradox«, *Eur. J. Endocrinol.*, 138: 619-620.
9. Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer, S. (1995): Isolation, Characterization, and Evolution in Red Wine Vinification of Resveratrol Monomers, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1820-1823.
10. Košir, I. J., Kidric, J. (2002): Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds, *Anal. Chim. Acta*, 458: 77-84.
11. Tomasi, G., van den Berg, F., Andersson, C. (2004): Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data, *J. Chemometrics*, 18: 231-241.

Bringing Pharma Tech
 Standardized, validated, and optimized for pharmaceutical industry

Services & Products:

- **Pharmaceutical Quality Control (PQC)**
- **Pharmaceutical Quality Assurance (PQA)**
- **Pharmaceutical Quality Management (PQM)**
- **Pharmaceutical Quality Improvement (PQI)**
- **Pharmaceutical Quality System (PQS)**
- **Pharmaceutical Quality Training (PQT)**
- **Pharmaceutical Quality Consulting (PQC)**
- **Pharmaceutical Quality Auditing (PQA)**
- **Pharmaceutical Quality Investigation (PQI)**
- **Pharmaceutical Quality Control (PQC)**
- **Pharmaceutical Quality Assurance (PQA)**
- **Pharmaceutical Quality Management (PQM)**
- **Pharmaceutical Quality Improvement (PQI)**
- **Pharmaceutical Quality System (PQS)**
- **Pharmaceutical Quality Training (PQT)**
- **Pharmaceutical Quality Consulting (PQC)**
- **Pharmaceutical Quality Auditing (PQA)**
- **Pharmaceutical Quality Investigation (PQI)**

