ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ GC-IRMS / SIRA СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ В ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ

А.Ю. Колеснов, д.т.н., **С.Р. Цимбалаев**, к.т.н.,
Российский университет дружбы народов, Москва
irms@biolab.ru

УДК 543.51; ВАК 02.00.02

Е.П. Шольц-Куликов, д.т.н., **В.Н. Геок**, к.т.н.,
Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь
sholz-kulikov@mail.ru

Представлены* результаты разработки и прикладного применения хромато-масс-спектрометрического метода исследования отношений стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ (GC-IRMS/SIRA) в летучих органических соединениях на примере этанола винодельческой продукции. Традиционный метод EA-IRMS/SIRA масс-спектрометрии отношений стабильных изотопов углерода включает стадию дистилляции для выделения и очистки этанола с его последующим окислительно-восстановительным преобразованием в элементном анализаторе. Разработанный метод GC-IRMS/SIRA обладает рядом преимуществ, к которым относятся в первую очередь высокие селективность, скорость и достоверность определения. Апробацию проводили на ряде винодельческих продуктов, в том числе красных и белых винах, вино-материалах, коньячных спиртах, коньяках и др. В исследованных образцах значения показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ этанола виноградного происхождения находятся в интервале от $-28,15$ до $-25,67\text{‰}$ (вина/виноматериалы) и от $-27,83$ до $-24,48\text{‰}$ (коньячные дистилляты/спирты/коньяки).

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня масс-спектрометрическое исследование отношений стабильных изотопов легких элементов (IRMS/SIRA) широко используется в прикладных целях для изучения винограда и готовой винодельческой продукции, в том числе вин, коньяков и др. Работа в этом направлении началась в 70-х годах с появлением современных масс-спектрометров, основанных на разработках А.Демпстера, К.Бейнбриджа и А.Нира. Практическим аспектам применения масс-спектрометрии IRMS/SIRA изотопов углерода и кислорода при исследовании винограда и продуктов его переработки, в особенности природы этанола и других компонентов, посвящен ряд отечественных и зарубежных публикаций [1–8]. На страницах журнала "Аналитика" в 2016 году опубликована статья, в которой представлен масс-спектрометрический метод исследования

отношений стабильных изотопов кислорода $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ во внутриклеточной воде винограда и водной фракции сусел и вин [6] (метод EQ-IRMS/SIRA). Отмечено влияние на изотопный состав компонентов винограда и винодельческой продукции как внешних природных (например, агроклиматические условия выращивания винограда), так и техногенных факторов, определяемых технологиями изготовления. При исследовании изотопного состава продуктов виноделия особое внимание необходимо уделять способам и оборудованию, которые используются на отдельных технологических этапах производства. Применительно к различным группам однородной продукции они подробно рассматриваются на страницах трудов ведущих ученых в сфере виноградарства и виноделия [9–11].

В масс-спектрометрии отношений стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ в этаноле винодельческой продукции широко используется традиционный подход, который основан на окислительно-восстановительном преобразовании спирта в элементарные газы после его предварительного выделе-

* Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН "5-100".

ния из исходного алкогольсодержащего продукта путем дистилляции (метод EA-IRMS/SIRA). Для выделения и очистки этанола необходимы: специальное дистилляционное оборудование; элементный анализатор, оснащенный одним комбинированным или двумя раздельными реакторами для проведения окислительно-восстановительного преобразования (сжигания органической пробы); сплит-система (изотопный интерфейс) для управления потоками газа-носителя (гелия), калиброванного рабочего газа и элементарных газов, образовавшихся при сжигании спирта; IRMS/SIRA масс-спектрометр для измерения отношений изотопов; компьютерная рабочая станция с программным обеспечением для регистрации и расчета результатов измерений (например, показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$). Подробное описание оборудования и методические требования для исследования отношений изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в компонентах винограда и винодельческой продукции по методу EA-IRMS/SIRA представлены в работах [2, 4]. Должное применение метода EA-IRMS/SIRA с учетом всех обязательных требований обеспечивает получение достоверных результатов с допустимой погрешностью.

Вместе с тем метод EA-IRMS/SIRA обладает рядом недостатков:

- селективное и, соответственно, достоверное определение отношений изотопов углерода в этаноле связано с обязательным этапом подготовки пробы к исследованию, для отгонки спирта требуется специальное дистилляционное оборудование* [2, 12];
- большие затраты времени для выделения этанола отгонкой, связанные с выполнением требований по выходу и чистоте спирта согласно методу OIV-MA-AS312-06 Международной межправительственной организации по виноградарству и виноделию OIV. Для сохранения изотопного состава выход этанола из исходного продукта должен составлять не менее 96%, а чистота спирта – не менее 95 об.% [12];
- необходимость точного расчета количества анализа для допустимой нагрузки реакторов, исходя из содержания углерода в подготовленной пробе – выделенном и очищенном этаноле;
- из-за высокой летучести этанола пробы следует вводить в жидком виде. Для приемлемой сходимости результатов нужен автоподатчик жидких образцов и/или микрошприцы малых и сверхмалых объемов (например, 0,5–5,0 мкл)** для ручного ввода.

* Традиционные лабораторные установки, используемые для определения крепости винодельческой продукции не пригодны для применения в методе EA-IRMS/SIRA.

** Из-за высокой летучести чистого этанола не допускается использовать традиционные капсулы для твердых проб для ввода в реактор элементного анализатора чистых спиртов и спиртовых дистиллятов.

Перечисленные недостатки метода EA-IRMS/SIRA увеличивают общую длительность исследования, что может негативно отразиться на производительности и точностных характеристиках определения. Хромато-масс-спектрометрический метод GC-IRMS/SIRA, в основе которого также заложен принцип окислительно-восстановительного преобразования органической пробы, представляет собой следующий этап в развитии инструментария для исследования состава изотопов углерода в этаноле и других летучих соединениях винодельческой продукции. Основные условия анализа отношений стабильных изотопов углерода в методе GC-IRMS/SIRA, а также примеры его практического применения представлены ниже.

ОБРАЗЦЫ ВИНОДЕЛЬЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Практическую апробацию метода проводили на образцах винодельческой продукции и коммерческих спиртах, описания которых представлены в табл.1. Среди исследованных – уникальные коньяки: "Македонский", изготовленный из коньячных спиртов 30-летней выдержки (завод марочных вин и коньяков "Коктебель", Крым), и "Патриарх" – из коньячного спирта, заложенного на выдержку и хранение в 1925 году (Тираспольский винно-коньячный завод Kvint, Молдавия, бутылка № 00001). Впервые в отечественной и международной практике применения масс-спектрометрии отношений стабильных изотопов легких элементов по методологии IRMS/SIRA изучены характеристики коллекционных коньяков, изготовленных из коньячных спиртов со сроками созревания от 30 лет и выше.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Инструментальное обеспечение

Метод GC-IRMS/SIRA основан на применении аналитического комплекса (рис.1), в состав которого входят следующие

Рис.1. Аналитический комплекс для исследования стабильных изотопов легких элементов в Лаборатории фундаментальных и прикладных исследований качества и технологий пищевых продуктов (ПНИЛ) ЦКП (Научно-образовательного центра) РУДН

Таблица 1. Образцы винодельческой продукции и ректификованных спиртов, использованные для апробации метода GC-IRMS/SIRA

№	Наименование	Общая характеристика	Происхождение
1	Виноматериал белый сухой	Сорт винограда "Шардоне", урожай 2017 года	Краснодарский край
2	Виноматериал красный сухой	Сорт винограда "Пино Нуар", урожай 2017 года	
3	Виноматериал белый сухой	Сорт винограда "Шардоне", урожай 2017 года	Крым
4	Виноматериал красный сухой	Сорт винограда "Мерло", урожай 2017 года	
5	Коньячный спирт	"Молодой" дистиллят, крепость 67,2 об.%	
6	Коньячный спирт	Возраст 5 лет, крепость 69 об.%	Грузия
7	Спирт	Спирт 96 об.% из свекловичной мелассы	
8	Спирт	Спирт 96 об.% синтетический	Крым
9	Коньяк "Македонский"	Возраст коньячных спиртов 30 лет	
10	Коньяк "Патриарх"	Возраст коньячных спиртов более 90 лет	Молдавия

щие специальные приборы и оборудование общелабораторного назначения:

- газовый хроматограф Trace GC Ultra (ThermoScientific, США) с капиллярной колонкой с неподвижной фазой GsBP-5 (5% дифенилполисилоксана в диметилполисилоксане) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной слоя неподвижной фазы 0,25 мкм (General Separations Technologies, США), автоматическим податчиком жидких проб TriPlus AS (ThermoScientific, США) и встроенным окислительным микрореактором, представляющим собой

керамическую трубку диаметром 1,55 мм (внутренний диаметр 0,50 мм) и длиной 320 мм, внутри которой размещены три проволочных катализатора из чистой меди, никеля и платины (рис.2);

- сплит-система GC Combustion III (ThermoScientific, США) со встроенным восстановительным микрореактором, представляющим собой керамическую трубку диаметром 1,55 мм (внутренний диаметр 0,50 мм) и длиной 320 мм, внутри которой разме-

Рис.2. Газовый хроматограф Trace GC Ultra с автоматическим податчиком жидких проб TriPlus AS

Рис.3. Сплит-система GC Combustion III со встроенным восстановительным микрореактором

щены три проволочных катализатора из чистой меди (диаметр 0,125 мм), и сплит-системой для управления газовыми потоками (рис.3);

- IRMS/SIRA-масс-спектрометр, предназначенный для измерения отношений стабильных изотопов легких элементов в изотопомерах элементарных газов, модель Delta V Advantage (ThermoScientific, США) (рис.4);
- компьютерная рабочая станция Optiplex 745 (Dell, США) с программным обеспечением высокого уровня Isodat NT 2.5 (ThermoScientific, США) для подготовки и контроля измерения, регистрации данных и расчета конечных результатов;
- инфраструктурное оборудование (ООО "Сигм-Плюс", Россия) для стабильного снабжения аналитического комплекса рабочими газами высокой степени очистки, в том числе газом-носителем – гелием (99,9999%, АО "МГПЗ", Россия), рабочим стандартным газом – диоксидом углерода (99,997%, АО "МГПЗ"), вспомогательным газом – кислородом (99,999%, АО "МГПЗ");
- оборудование общелабораторного назначения (автоматические дозаторы, лабораторная посуда и др.) для нормализации исходных образцов винодельческой продукции путем их разбавления дистиллированной водой до единой концентрации этанола (около 1 об.%) и микрофильтрации через мембранный фильтр из гидрофильного политетрафторэтилена (ПТФЭ) с размером пор 0,45 мкм.

В качестве стандартного образца для калибровки рабочего газа – диоксида углерода был использован образец

сравнения – 96 об.% этанол виноградного происхождения BCR-656, значение показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ которого составляет $-26,91 \pm 0,07\text{‰}$ (European Commission, Community Bureau of Reference BCR, индивидуальный идентификационный номер образца 00425).

Условия хроматографического выделения этанола

Непосредственно перед анализом исходные образцы винодельческой продукции (см. табл.1) разбавляли дистиллированной водой до содержания этанола около 1 об.% и после фильтрации в объеме 1,5 мл вносили в стандартные стеклянные емкости для хроматографии. Емкости размещали в держателе автоподатчика жидких проб на газовом хроматографе. Для отбора и последующей инъекции пробы в колонку хроматографа использовали микрошприц на 5,0 мкл (ThermoScientific, США).

Хроматографическое выделение этанола проводили в соответствии со следующими условиями: температура инжектора – 250 °C; газ-носитель – гелий (99,9999%); скорость потока газа-носителя через колонку – 1 мл/мин; объем раствора пробы, вводимый в инжектор – 0,1 мкл; режим ввода пробы в колонку – с делением потока (коэффициент деления 100); температурная программа колонки: а) начальный участок – 35 °C, выдержка 2 мин, б) подъем температуры до 45 °C со скоростью 10 °C/мин, в) подъем температуры до 220 °C со скоростью 100 °C/мин, г) конечный участок – 220 °C, выдержка 2 мин.

Длительность хроматографического этапа в данных условиях составляет 7 мин. При этом фракция чистого этанола подается в окислительный реактор системы уже на пятой минуте после инъекции пробы в колонку хроматографа. Время окислительно-восстановительного преобразования, измерения и регистрации его результатов составляет не более 6 мин, а для восстановления настроек газового хроматографа до начальных значений требуется 4 мин. Таким образом, общая длительность анализа для одной пробы в разработанном методе GC-IRMS/SIRA не превышает 17 мин.

Условия окислительно-восстановительного преобразования

После выхода из хроматографической колонки фракция чистого этанола автоматически подается в микрореактор хроматографа для окислительного преобразования при температуре 940 °C. Продукты окисления направляются в восстановительный реактор (650 °C). Регенерация катализаторов в окислительном микрореакторе происходит автоматически после каждого анализа путем продувки чистым кислородом (99,999%). Из восстановительного микрореактора выходит газовая смесь, содержащая изотопомеры диоксида углерода. Она подвергается очистке

Рис.4. IRMS/SIRA-масс-спектрометр Delta V Advantage

для удаления молекул воды с помощью диффузионной системы на основе молекулярного мембранного сита Nafion. Для количественного измерения состава изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в изотопомерах углекислого газа, образовавшихся из этанола, соответствующий объем газа направляли в IRMS/SIRA-масс-спектрометр Delta V Advantage. Ускоряющее напряжение масс-спектрометра составило 3,07 кВ, рабочее давление в ионном источнике – $1,2 \cdot 10^{-7}$ кПа. Генерацию ионизированных молекул углекислого газа проводили методом электронного удара (энергия электронов составила 124 эВ). IRMS/SIRA-масс-спектрометр Delta V Advantage оснащен пятью детекторами – ионными ловушками ("чашками Фарадея"), три из которых осуществляют одновременный непрерывный мониторинг сигнала $[\text{CO}_2]^+$ для трех основных ионов с массами 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ и $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) и 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$). Для обеспечения значимого уровня сигнала резисторы отклика настроены на значения $3 \cdot 10^8$, $3 \cdot 10^{10}$ и $1 \cdot 10^{11}$ Ом для масс 44, 45 и 46 соответственно. В начале каждого измерительного цикла в масс-спектрометр подавали по три импульса калиброванного рабочего газа – чистого диоксида углерода.

Регистрация, обработка результатов исследований, а также управление всеми приборами аналитического комплекса осуществляли через специализированную компьютерную рабочую станцию Dell Optiplex 745 и программный пакет высокого уровня Isodat NT 2.5. На рис.5 представлен типичный цифровой и графический модуль регистрации и обработки данных измерения одной пробы, проведенного методом GC-IRMS/SIRA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования отношений стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ выражены в виде величины $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ в промилле (‰). Значения $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ рассчитаны непосредственно в процессе регистрации и обработки данных программным пакетом Isodat NT 2.5 по формуле:

$$\delta^{13}\text{C} = [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{пр}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{СТ}} / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{СТ}}] \cdot 1000,$$

где $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{пр}}$ – отношение изотопов углерода в пробе, $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{СТ}}$ – отношение изотопов углерода в стандартном образце.

Рис.5. Типичный цифровой и графический модуль регистрации и обработки данных исследования состава стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в этаноле винодельческой продукции методом GC-IRMS/SIRA

Таблица 2. Состав стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в этаноле винодельческой продукции и ректификованных спиртах методом GC-IRMS/SIRA

№ образца	Значение $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)	Погрешность измерений $\pm U$ (‰)
1	-25,78	0,10
2	-25,94	0,02
3	-28,15	0,06
4	-25,67	0,03
5	-27,83	0,06
6	-26,69	0,03
7	-26,59	0,01
8	-30,46	0,03
9	-24,48	0,07
10	-24,94	0,06

В расчете использовали измеренные значения интенсивности сигналов молекул углекислого газа с массами 46 и 44. Для контроля правильности результатов важна одновременная коррекция интенсивности сигнала для исключения возможного влияния изобар $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ и $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, доля которых определяется по активности сигнала по массе 45 с учетом степени распределения изотопов ^{13}C и ^{17}O в природе (соответственно 1,1 и 0,0375%).

Результаты исследования десяти образцов представлены в табл.2. Измерения проводили в трех повторностях, для каждой серии рассчитывали погрешность (неопределенность) измерений (U) на основе относительного стандартного отклонения (RSD), коэффициента охвата $k=2$, доверительной вероятности $P=95\%$ в соответствии с рекомендациями [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Практическая апробация разработанного метода GC-IRMS/SIRA подтвердила ряд достоинств, которые выделяют его в качестве предпочтительного в исследовании изотопии углерода и других легких элементов в летучих соединениях винограда и продуктов его переработки, включая винную и коньячную продукцию. К основным преимуществам метода GC-IRMS/SIRA можно отнести:

- простую подготовку алкогольсодержащих продуктов к исследованию;

- отсутствие необходимости в использовании специального лабораторного оборудования для выделения и очистки исследуемых летучих компонентов, например, для выделения этанола дистилляцией;
- отсутствие риска изотопного фракционирования и/или загрязнения пробы в ходе ее подготовки к исследованию и непосредственно в ходе анализа, что обеспечивает высокий уровень достоверности результатов измерения;
- низкие общие затраты времени на анализ благодаря исключению отдельной стадии подготовки пробы для выделения и очистки исследуемого летучего соединения, что обеспечивает высокую производительность метода при его рутинном применении;
- высокую чувствительность измерения при использовании сверхмалых объемов проб (например, 0,1 мкл раствора пробы для анализа, вводимого в колонку хроматографа, содержат около $5,2 \times 10^{-7}$ г углерода);
- возможность автоматизации измерения, повышающей эффективность использования оборудования и работы персонала лаборатории;
- возможность увеличения селективности исследования изотопии широкого спектра летучих соединений за счет использования специальных хроматографических колонок двух типов. Первый тип – ахиральные колонки с полиэтиленовой или пропиленгликолевой фазой (Carbowax 20M, CP-Wax-57CB, CP-Wax-52CB и др.) для одновременного анализа изотопного состава, например, основных продуктов брожения – этанола и глицерина. Второй тип – хиральные колонки с химически модифицированной β -циклодекстриновой фазой для исследования, например, побочных продуктов брожения – 2,3-бутандиола или изотопии R/S-энантиомеров ароматизующих веществ винограда, винной и коньячной продукции для изучения природы ароматической фракции (β -DEX, Cyclodex, Cydex, ChiralDEX, Lipodex, BGB и др.);
- универсальность применения, позволяющую внедрить данный метод в практику исследований летучих соединений практически любых продуктов растительного происхождения (например, фруктов, овощей, соков, пюре, экстрактов, масел, ароматических композиций и т.п.).

Хромато-масс-спектрометрический метод GC-IRMS/SIRA в проведенной практической апробации показал свою высокую эффективность при измерении отношений изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в этаноле алкогольсодержащих продуктов из разных категорий, в том числе в винах, вино-

материалах, коньячных дистиллятах/спиртах, коньяках и ректификованных спиртах (табл.1). Результаты апробации (см. табл.2, показатель $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$) представляют несомненный интерес с точки зрения прикладного значения метода GC-IRMS/SIRA, в особенности для сферы оценки качества продукции и выявления манипуляций с ее составом путем использования недопустимых технологических приемов и компонентов. Так, например, сведения о составе изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в этаноле алкогольсодержащего продукта позволяют дать оценку природе спирта. В исследованиях [1, 3] и целом ряде других работ показаны различия в изотопии углерода в этаноле, полученном из углеводов растений C3- (например, виноград, сахарная свекла) и C4-пути (например, сахарный тростник, кукуруза) фотосинтеза, и синтетическом этаноле. Наглядно это показано и в нашем исследовании, например, на образцах 7 и 8 (см. табл.1–2) с применением метода GC-IRMS/SIRA. Вместе с тем, природное фракционирование изотопов углерода в компонентах как C3-, так и C4-растений характеризуется весьма широкой вариабельностью значений, зависимость которых от внешних агроклиматических (географических) факторов выражена более существенно, чем от механизмов биохимических циклов ассимиляции углерода.

Доминирующее влияние агроклиматических (географических) факторов на изотопный состав компонентов винограда и других растений впервые было показано в 80-х годах прошлого века в фундаментальных работах Г.Фаркуара [14] и подтверждено позднее в работах других исследователей, например, [15]. Совокупность результатов проведенных зарубежных и отечественных исследований, учитывающих влияние агроклиматических и биохимических факторов, позволяет сформировать базовый интервал изменения количественных значений для показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ в сахарах винограда от $-28,00$ до $-20,00\text{‰}$.

Природный состав изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ углеводов винограда подвержен неизбежным изменениям в технологических процессах, используемых в производстве винодельческой продукции. При изготовлении виноматериалов решающее влияние оказывает брожение сахаров, основными продуктами которого являются этанол и диоксид углерода. Результаты фундаментальных и прикладных исследований показывают, что этанол обладает пониженным общим количественным уровнем показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ в сравнении с исходными сахарами, из которых он был получен при брожении [2, 4–5]. К настоящему моменту сформирована база научных знаний об изотопии углерода и механизме его фракционирования при брожении, что позволяет обосновать общий интервал значений показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ для этанола виноградного происхождения в пределах от $-30,70$ до $-20,93\text{‰}$.

Если в технологии вина главным фактором и причиной техногенного фракционирования изотопов углерода

в образующемся спирте является брожение сахаров, то технология коньяков дополнительно включает целый ряд сложных процессов, потенциально влияющих на изотопный баланс углерода в этаноле на стадии получения и выдержки коньячных спиртов. Общая схема производства коньяка складывается из следующей последовательности технологических этапов:

- коньячные виноматериалы получают из винограда технических сортов, не имеющих яркого сортового аромата;
- виноград перерабатывают "по-белому" – с отделением гребней и осветлением сусла, запрещены любые виды сульфитации;
- хранят коньячные виноматериалы в среде инертных газов, при пониженных температурах, либо предварительно пастеризованными;
- перегонка виноматериалов на коньячный спирт имеет свои особенности: проводится строгое фракционирование получаемых спиртов, для высококачественных коньяков рекомендуют применять "шарантскую" технологию;
- при созревании коньячных спиртов в дубовых бочках или в емкостях в присутствии дубовой клепки происходит экстракция фенольных веществ и их окисление, при этом сильноокисленные и конденсированные таниды теряют растворимость. Растворенные в коньячном спирте окисленные таниды благоприятно влияют на вкус и цвет коньяка; в коньячный спирт из дуба переходят гемицеллюлозы, которые при гидролизе превращаются в сахара. Из сахаров под действием температур и кислот образуются приятно пахнущие альдегиды фуранового ряда, которые частично преобразуются в меланоидины. При выдержке из древесины дуба извлекаются азотистые вещества, среди которых преобладают аминокислоты; в результате окислительного дезаминирования и декарбоксилирования аминокислот появляются альдегиды и ацетали – важные компоненты букета коньяка. Значительную роль в создании букета играет процесс экстракции лигнина дуба, из которого при выдержке образуются ароматические альдегиды (ванилин, сиреневый альдегид и др.) [16];
- производство собственно коньяков ведется из выдержанных коньячных спиртов, для чего в купаж добавляют умягченную воду, сахарный сироп, а в ординарные коньяки еще сахарный колер для придания нарядного цвета (купаж коньяка подвергается технологической обработке для стабилизации к помутнениям).

На технологических этапах производства коньяка используются процессы, основанные на физических

(например, перегонка) и физико-химических (например, деме­тализация) принципах. Кроме того, неизбежно влияние других техногенных и внешних факторов, например, температуры, атмосферных газов, длительности созревания коньячных спиртов, ингредиентов коньячного купажа. Эти и другие факторы способны инициировать реакции изотопного обмена, которые приводят к изменению количественных уровней показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ в сравнении с исходным коньячным виноматериалом.

Сегодня количество экспериментальных данных об особенностях динамики изотопного обмена углерода на различных стадиях коньячного производства незначительно. В работе научного коллектива из ЮАР, результаты которой были опубликованы в 2007 году [17], представлены данные по изменению состава изотопов легких элементов (углерода, водорода и кислорода) в виноградных бренди на различных технологических этапах их производства. В научной работе применяли методы: IRMS / SIRA масс-спектрометрии отношений стабильных изотопов углерода ($\delta^{13}\text{C}$) и кислорода ($\delta^{18}\text{O}$) и ядерного магнитного резонанса SNIF-NMR для анализа содержания изотопа водорода – дейтерия в метильной и метиленовой группах молекулы этанола ($(\text{D}/\text{H})_I$ и $(\text{D}/\text{H})_{II}$). Основным итог – установлена зависимость изотопного состава исследованных элементов от способов перегонки (дистилляции), условий созревания спиртов и видов используемых в рецептуре ингредиентов.

Если для этанола виноградного происхождения в винах (виноматериалах) накоплено достаточно экспериментальных данных, которые позволяют проводить оценку его природы на основе изотопии углерода (показатель $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ – интервал изменения от –30,70 до –20,93‰), то тема изотопии водорода и кислорода (показатели $\delta^2\text{H}(\text{D})_{\text{VSMOW}}$ и $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$) в настоящее время раскрыта не полностью. Ряд опубликованных разрозненных работ [18–20] позволяет определить только предварительные интервалы изменения количественных значений показателей $\delta^2\text{H}(\text{D})_{\text{VSMOW}}$ и $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ для этанола, содержащегося в винах, которые составляют от –261,39 до –186,00‰ и от 12,12 до 35,05‰ соответственно. Таким образом, в сложившейся ситуации без проведения дополнительных целевых научно-исследовательских работ не представляется возможным сформировать единую нормативную базу для показателей изотопного состава углерода, водорода и кислорода в группе коньячных продуктов (коньячные дистилляты, спирты, коньяки). Исходя из большого практического значения нормирования показателей состава изотопов легких элементов для этанола, входящего в состав коньячной продукции, проведение исследований динамики изотопного обмена на различных стадиях производства коньяка весьма актуально. Востребованность такой работы подчеркивают результаты апробации раз-

работанного метода GC-IRMS / SIRA, для уникальных продуктов – коньяков "Македонский" (возраст спирта 30 лет) и "Патриарх" (возраст спирта более 90 лет), значения показателя $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ в которых составили –24,48 и –24,94‰ соответственно.

Применение метода GC-IRMS / SIRA при нормировании показателей качества винодельческой продукции, контрольно-надзорных и экспертных мероприятиях, производственной и торговой деятельности, а также в сфере оценки соответствия должно осуществляться с учетом взаимосвязи полученных экспериментальных сведений с агроклиматическими условиями выращивания винограда и технологических особенностей его переработки в зависимости от категории изготавливаемого продукта. Широкий ассортимент отечественной и импортной винодельческой продукции не всегда отвечает возросшим требованиям, предъявляемым к ее качеству и безопасности. Необходимость постоянного совершенствования нормативной правовой базы требует использования современных фундаментальных и прикладных знаний о природе процессов и явлений, которые должны обязательно приниматься во внимание, в особенности, при осуществлении контрольно-надзорных мероприятий. При этом очень важны практическое участие научных и экспертных ресурсов, применение прецизионного аналитического оборудования и современных методов исследования. Именно они позволяют подтвердить с необходимой точностью и достоверностью не только соответствие продукции определенным требованиям к качеству, но и ее географическую принадлежность, определяемую агроклиматическими факторами региона выращивания винограда.

Авторы выражают благодарность российским предприятиям и специалистам виноградарской и винодельческой отраслей, предоставившим аутентичные образцы вин, виноматериалов, ректификованных спиртов, коньячных дистиллятов/спиртов и коньяков для исследования состава изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в этаноле методом GC-IRMS / SIRA.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Rossmann A., Schmidt H.-L., Reniero F., Versini G., Moussa I., Merle M.H.** Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany // *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-forschung*. 1996. V. 203. P. 293–301.
2. **Колеснов А., Филатова И., Малошицкая О., Зенина М., Питрюк И.** Методические и экспертные вопросы оценки винодельческой продукции на присутствие сахаров и спиртов невиноградного происхождения // *Виноделие и виноградарство*. 2014. № 6. С. 4–11.
Kolesnov A., Filatova I., Maloshitskaya O., Zenina M., Pitryuk I. Methodological and expert evaluation of wine

- products for the presence of sugars and alcohols of non-grape origin // *Vinodelie i vinogradarstvo* [Winemaking and Viticulture]. 2014, No. 6. P. 4–11.
3. **Christoph N., Hermann A., Wachter H.** 25 Years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Union – Review and outlook // *BIO Web of Conferences*. 2015. 5. 02020. 8 p. (DOI: 10.1051/bioconf/20150502020).
4. **Колеснов А., Агафонова Н.** Контроль подлинности и качества винодельческой продукции. Часть 3. Метод IRMS/SIRA в исследовании состава стабильных изотопов углерода в компонентах винограда и винодельческой продукции Крыма // *Контроль качества продукции*. 2016. № 6. С. 45–53.
Kolesnov A., Agafonova N. Control of the authenticity and quality of wine products. Part 3. IRMS/SIRA Method in the Study of the Composition of Stable Carbon Isotopes in Components of Grapes and Wine products from Crimea // *Kontrol' kachestva produktov* [Quality Control of Products]. 2016. No. 6. P. 45–53.
5. **Колеснов А., Агафонова Н.** Контроль подлинности и качества винодельческой продукции. Часть 3 (окончание). Метод IRMS/SIRA в исследовании состава стабильных изотопов углерода в компонентах винограда и винодельческой продукции Крыма // *Контроль качества продукции*. 2016. № 7. С. 39–45.
Kolesnov A., Agafonova N. Control of the authenticity and quality of wine products. Part 3 (ending). IRMS/SIRA Method in the Study of the Composition of Stable Carbon Isotopes in Components of Grapes and Wine products from Crimea // *Kontrol' kachestva produktov* [Quality Control of Products]. 2016. No. 7. P. 39–45.
6. **Колеснов А., Агафонова Н., Зенина М.** Масс-спектрометрия стабильных изотопов кислорода $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ в винограде и винодельческой продукции Крыма // *АНАЛИТИКА*. 2016. № 3 (28). С. 72–82.
Kolesnov A., Agafonova N., Zenina M. Mass spectrometry of stable oxygen isotopes $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ in grapes and wine products of Crimea // *ANALITIKA* [Analytics]. 2016. No. 3(28). P. 72–82.
7. **Kolesnov A., Agafonova N.** Grapes from the geographical areas of the Black Sea: agroclimatic growing conditions and evaluation of stable isotopes compositions in scientific study // *BIO Web of Conferences*. 2016. 7. 02004. 7 p. (DOI: 10.1051/bioconf/20160702004).
8. **Kolesnov A., Zenina M., Tsimbalaev S., Davlyatshin D., Ganin M., Anikina N., Agafonova N., Egorov E., Guguchkina T., Prakh A., Antonenko M.** Scientific study of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ carbon and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oxygen stable isotopes biological fractionation in grapes in the Black Sea, Don Basin and the Western Caspian regions // *BIO Web of Conferences*, 2017. 9. 02020. 8 p. (DOI: 10.1051/bioconf/20170902020).
9. **Валуйко Г.Г., Косюра В.Т.** Справочник по виноделию // Симферополь: Таврида, 2005. 589 с.
Valuiko G.G., Kosyura V.T. Handbook of Winemaking. Simferopol, Tavrida Publ., 2005, 589 p.
10. **Валуйко Г.Г.** Технология виноделия // Симферополь: Таврида, 2001. 624 с.
Valuiko G.G. Technology of Winemaking. Simferopol, Tavrida Publ., 2001, 624 p.
11. **Шольц-Куликов Е.П., Иванченко К.В., Ермолин Д.В., Геок В.Н.** Химия вина // Ростов-на-Дону: Издательский центр ДГТУ, 2016. 359 с.
Shol'ts-Kulikov E.P., Ivanchenko K.V., Ermolin D.V., Geok V.N. Wine Chemistry. Rostov-na-Donu, DGTU Publ., 2016. 359 p.
12. Method OIV-MA-AS312-06, Type II method "Determination by isotope ratio mass spectrometry $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of wine ethanol or that obtained through the fermentation of musts, concentrated musts or grape sugar (Resolution Oeno 17/2001)" // OIV: Compendium of International Methods of Analysis, 2015.
13. **Wood R., Nilsson A., Wallin H.** Quality in the food analysis laboratory // Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1998. P. 142–147.
14. **Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T.** Carbon isotope discrimination and photosynthesis // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1989. 40. P. 503–537.
15. **Van Leeuwen C., Tregoat O., Choné X., Bois B., Pernet D., Gaudillère J.-P.** Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? // *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 2009. 3 (43). P. 121–134.
16. **Мартыненко Э.Я.** Технология коньяка. – Ялта: Институт винограда и вина "Магарач", 2003. 313 с.
Martynenko E.Ya. Cognac Technology. Yalta, Institute of Vine and Wine "Magarach" Publ., 2003. 313 p.
17. **Victor W., Kotze L., Smit D., Booysen J.** Proof of authenticity of South African brandy // ARC Infruitec-Nietvoorbij, Final report for 2006/7, 2007. 24 p.
18. **Misselhorn K., Brückner H., Müßig-Zufika M., Grafahrend W.** Nachweis des Rohstoff bei hochrektifiziertem Alkohol // *Die Branntweinwirtschaft*, 1983. S. 162–170.
19. **Calderone G.** Application des techniques isotopiques modernes pour la caractérisation de produits alimentaires et de boissons // Thèse de Doctorat, Université de Nantes, European Communities, 2004. 252 p.
20. **Kracht O., Hilkert A., Racz-Fazakas T.** EA-IRMS: ^{13}C and simultaneous ^{18}O and ^2H isotope analysis in ethanol with thermoscientific delta V isotope ratio mass-spectrometers // Application Note AN30147-EN0916, 2016. 5 p.