



**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ - ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ**

V СТУДЕНТСКА КОНФЕРЕЦИЈА, Штип, 13.11.2024

**СОСТАВ НА ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ ВО
ВИНА ОД СОРТАТА ВРАНЕЦ
ОПРЕДЕЛЕНИ СО CZE-ESI-QTOF-MS
ТЕХНИКА**

Жанета Нечева

Земјоделски факултет, Универзитет, “Гоце Делчев”,
Штип, Република С. Македонија

Виктор Шандор, Лила Макзин, Лаура Деуш-Наги, Балаш Бериш,
Трајче Стафилов, Ференц Килар, Виолета Иванова Петропулос



ВОВЕД

- ❖ Во 2010 година се регистрирани 86 винарски визби. **ОВА е СТАР ПОДАТОК!!**
- ❖ Вкупниот капацитет во државата на ставање на виното во шишиња изнесува 0,65 милиони хектолитри годишно. **ОВА ДА СЕ ПРОВЕРИ СПОРД НАЈНОВИ ПОДАТОЦИ!!**
- ❖ Црвеното вино застапува речиси 60 % од националното производство на вино, вклучувајќи автохтони сорти и интернационални сорти на грозје.



ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

- Важни соединенија во виното кои влијаат на стабилноста, вкусот, аромата, бојата, рН, како и на хемиската и микробиолошка стабилност
- Содржината на вкупна киселост во грозјето се движи во граници од 8 до 13 g/L, а во виното од 5,5 до 8,5 g/L.

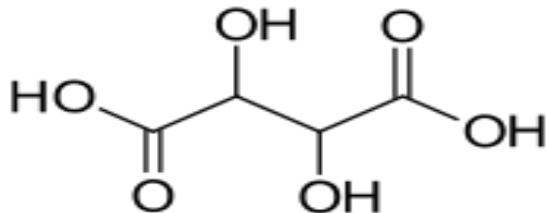
Поделени се на:

- *Органски киселини кои потекнуваат од грозјето*
- *Органски киселини кои се создаваат во текот на ферментацијата*

ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

Органски киселини кои потекнуваат од грозјето - Винска киселина

- ✓ Доминантната киселина во сите зелени делови на лозата: корен, стебло, лист, зеленото и зрелото грозје.
- ✓ Концентрацијата на винска киселина во зелено грозје може да достигне до 15 g/L, а во шира и вино од 2-6 g/L
- ✓ Лозје одгледувано на пониски температури може да има винска киселина од 6 g/L, додека, грозје зреено во потопли реони може да има пониска концентрација на винска киселина која ќе се движи во граници од 2-3 g/L.



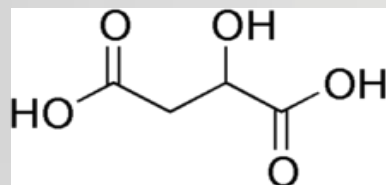
Структура на винска киселина

ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

Органски киселини кои потекнуваат од грозјето

Јаболкова киселина

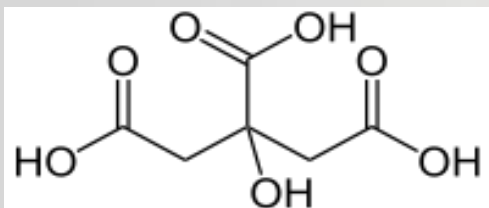
- ја има во сите видови овошни плодови, особено во зеленото јаболко, од кадешто и го добила своето име. Во зелено грозје во кое е застапена со содржина од 15-25 g/L.



Структура на јаболкова киселина

Лимонска киселина

- ја има во грозјето во концентрација до 0,7 g/L. Во шира и вино се движи во граници од 0,2 – 0,7 g/L. Согласно законските прописи, не смее да биде повисока од 1 g/L.



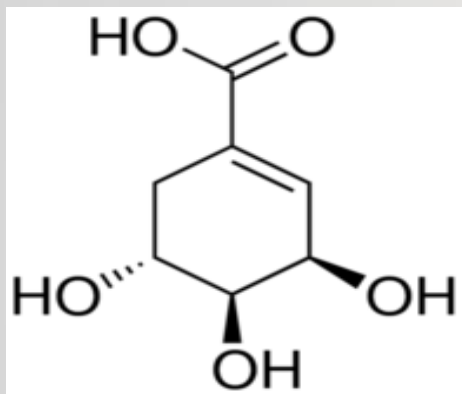
Структура на лимонска киселина

ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

Органски киселини кои потекнуваат од грозјето

Шикимска киселина

➤ служи како фактор за утврдување на потеклото на грозјето. Присутна е во многу ниски концентрации во шира и вино (0,1 до 0,15 g/L).



Структура на шикимска киселина

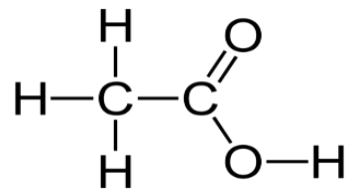


ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

Органски киселини што се формираат во текот на ферментација

Оцетна киселина

- главна испарлива киселина во вината која што ја произведуваат квасците за време на ферментацијата.
- Нормалната просечна концентрација на оцетната киселина, како корисен аромат кој ја зголемува комплексноста на вкусот и мирисот во црвеното вино, изнесува <300 mg/L, а доколку оваа содржина е поголема од 300 mg/L, на виното ќе му даде остар и кисел вкус и притоа ќе ја намали овошноста.



Структура на оцетна киселина

ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

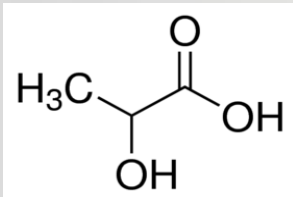
Органски киселини што се формираат во текот на ферментација

Млечната киселина

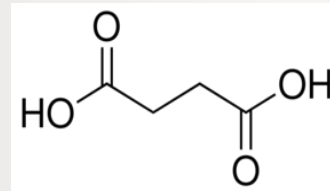
- неиспарлива киселина, која што се создава во мали количества за време на алкохолната ферментација, а во поголеми концентрации за време на зреењето на виното, како последица на биолошкото разградување на јаболковата киселина во млечна киселина и CO_2 .
- Млечната киселина во црвеното вино е присутна во концентрација од 1-3 g/L .

Килибарна киселина

- во виното се јавува како производ на алкохолната ферментација, а во помала мера, се јавува и како последица на разложувањето на глутаминската киселина.
- Концентрација на килибарната киселина во виното е околу 1 g/L.



Структура на млечна киселина



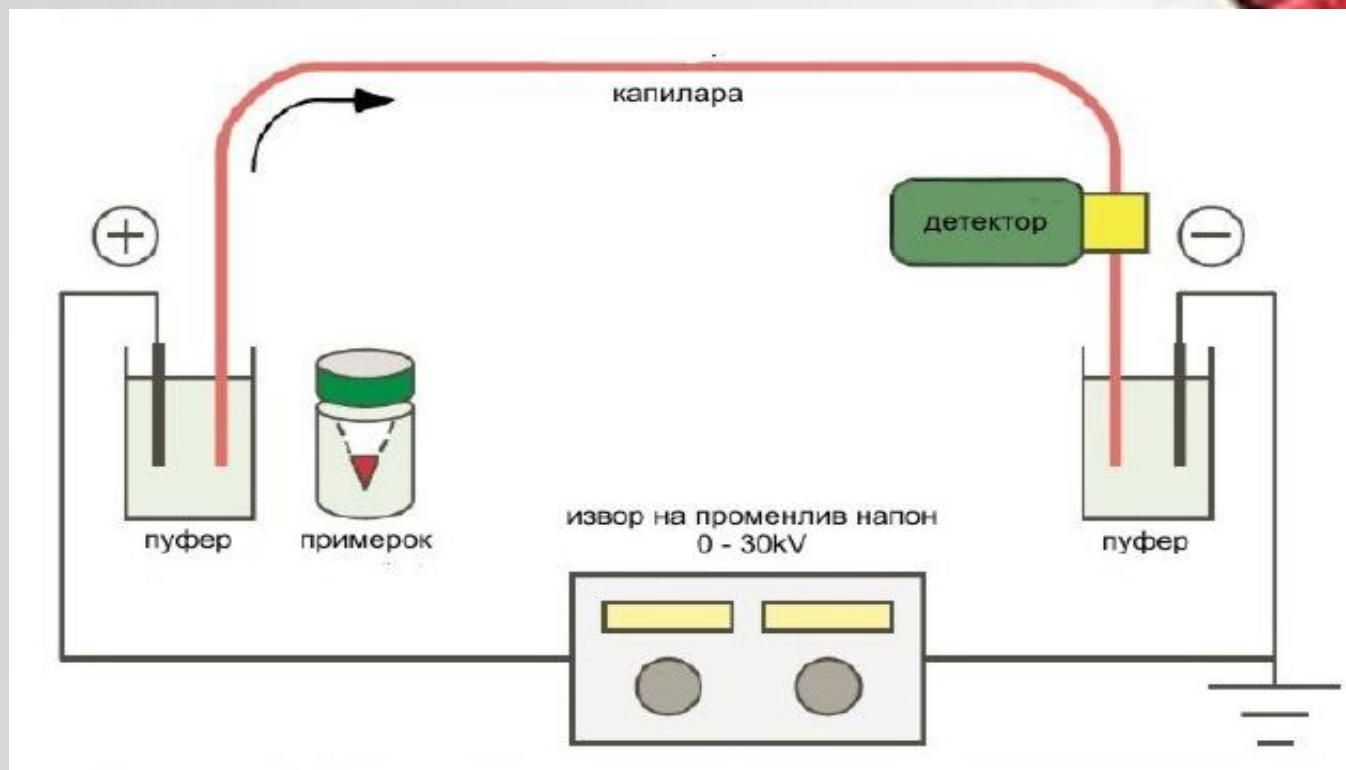
Структура на килибарна киселина

Производство на вино



Капиларна електрофореза (СЕ)

- ✓ Техника на раздојување на аналити, во која примерокот се инјектира во пуферен раствор, кој е сместен во капиларна цевка.



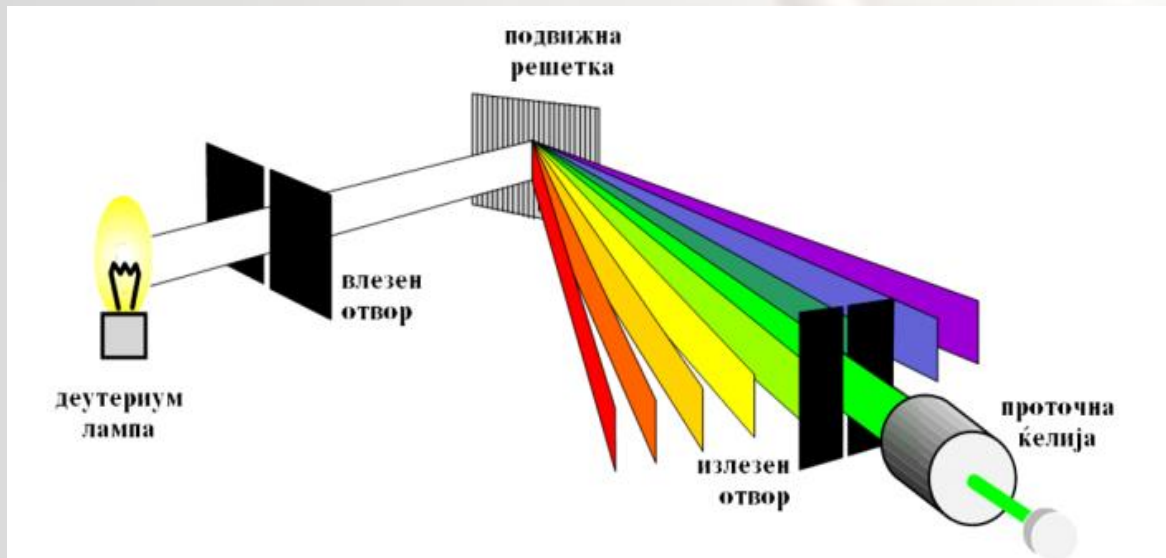
Шематски приказ на системот за капиларна електрофореза

Капиларна електрофореза (СЕ)

Детектори

UV-Vis детектор:

- ✓ најчесто употребуван детектор во сепарационите техники
- ✓ Може да биде со фиксна бранова должина најчесто (254 nm) и со променлива бранова должина {со низа од диоди (DAD)}.
- ✓ Детекторот со низа од диоди овозможува континуирано следење на UV (UV-Vis) спектарот на различни бранови должини на сè што излегува од колоната/капиларата.

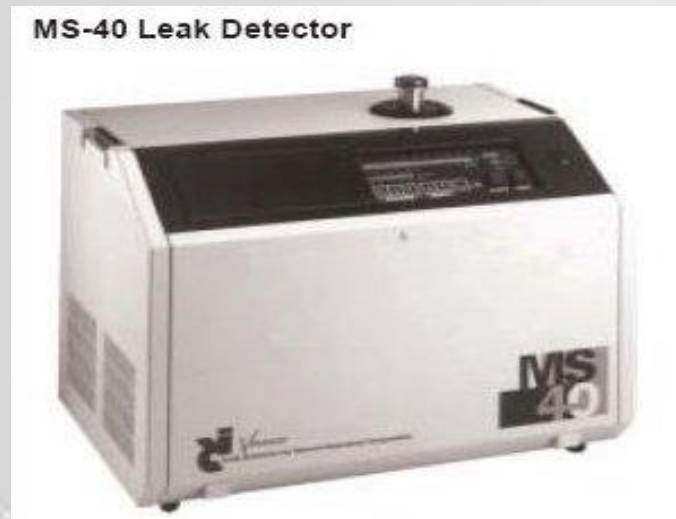


Шематски приказ на UV-Vis детектор со променлива бранова должина

Капиларна електрофореза (CE)

Масена спектрометрија (MS)

- Оваа техника е погодна за проучување на структури на различни компоненти.
- MS се базира на создавање на јони од анализот, нивна анализа според вредноста на односот маса/полнеж (m/z) и нивна детекција.
- MS инструментот се состои од три важни компоненти: јонски извор, масен анализатор и детектор. Перформансите на овие компоненти влијаат на квалитетот на добиените квалитативни и квантитативни резултати.



Масен детектор



ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

- 1. Избор на суровина**
- 2. Производство на вино**
- 3. Примена на капиларна електрофореза (CE) поврзана со масен спектрометар**
 - Оптимизација на метода**
 - Валидација на метода**
- 4. Практична примена на CE-ESI/QTOF-MS методата за анализа на органски киселини во вина Вранец**
- 5. Статистичка анализа на податоците**

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

Производство на вино

Ознаки на вината од сортата Вранец произведени од различни вински локации

Вина од сортата Вранец	Локација	Вински Регион
V1	Бистренци	Тиквеш
V2	Барово	Тиквеш
V3	Битола	Тиквеш
V4	Градско	Тиквеш
V5	Штип	Тиквеш
V6	Виларов	Тиквеш
V7	Лепово	Тиквеш
V8	Курија	Тиквеш
V9	Дреново	Тиквеш
V10	Манастирец	Тиквеш
V11	Радовиш	Струмица-Радовиш
V12	Демир Капија	Тиквеш
V13	Гевгелија	Гевгелија-Валандово
V14	Криволак	Тиквеш
V15	Дисан	Тиквеш
V16	Велес	Тиквеш
V17	Ридиште	Тиквеш

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

Определување на органски киселини со примена на капиларна електрофореза

- Разредување на вината со дејонизирана вода (1:5), филтрирање со мембрански филтер од 0,22 μm ;
 - Разделување на анализите во капилари во должина од **80** и **120** cm;
 - Кондиционирањето на новите капилари со промивање: вода ,ацетон, 1M NaOH, раствор за покривање (1% p-or од полибрен) и позадински електролит (BGE), промивање на капиларата со дејонизирана вода;
 - Хидродинамично инјектирање на примероците под притисок од 50 mbar, на 2 сек. На крајот од капиларата е користен негативен пол.
 - Напон 15 A на 20 kV, при константан температура од 25 °C.
- **Детекција на органски киселини со масен спектрометар (ESI/QTOF-MS)**
- масен детектор со точна маса и време на прелетување (Accurate-Mass Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometer (QTOF-MS)) (Agilent Technologies).
- **Параметри за валидација:**
- *Линеарност, граница на квантификација, повтроливост, интрадневна повторливост, интердневна репродуктивност.*

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

Статистичка анализа

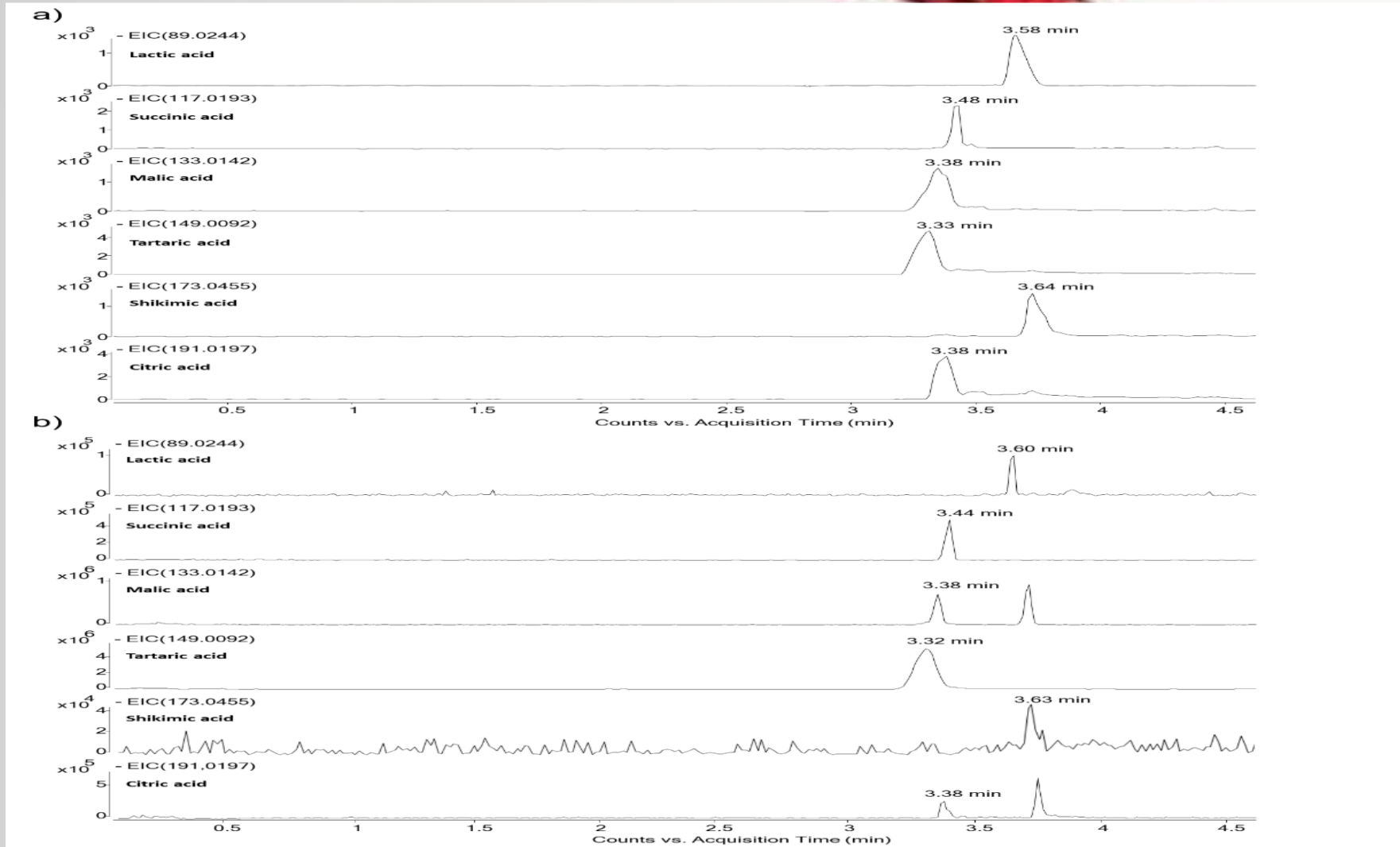
Беше извршена статистичка анализа на податоците за органски киселини во анализираните вина, вклучувајќи пресметка на:

- ✓ средна вредност,
- ✓ минимална,
- ✓ максимална вредност.

За да се утврдат значајните и можни сличности или разлики помеѓу вината, на резултатите за органски киселини беше применет тестот за средни вредности Student–Newman–Keuls.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

CZE-ESI-QTOF-MS анализа на органски киселини во црвени вина од сортата Вранец



Екстрахирани јонски електроферограми на смеса од стандардни раствори на органски киселини (а) и вино вранец (В1)

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Валидација на аналитичката метода за сепарирање на органски киселини во вино

Податоци за линеарна регресија

Органски киселини	Време на мигрирање (мин)	MS (m/z) [M-H] ⁻	Опсег на концентрација (mg/L)	Отсечок	Наклон	R ²	LOQ (mg/L)
Млечна	3,5	89	0.007-0.15	425	28790	0,9918	7,17
Килибарна	3,3	117	0.004-0.07	2673	140997	0,9935	4,68
Јаболкова	3,2	133	0.00004-0.2	2143	118261	0,9905	0,05
Винска	3,1	149	0.005-0.8	-230	115674	0,9990	5,70
Шикимска	3,6	173	0.0005-0.06	1328	171801	0,9902	0,59
Лимонска	3,3	191	0.02-0.65	-146	58946	0,9982	20,5

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Валидација на аналитичката метода за сепарирање на органски киселини во вино

Стандардни додатоци за проверка на точната на CE-QTOF-MS методот за определување на органски киселини (n=3)

Органски киселини	Експериментално најдено (g/L)*	Пресметано (g/L)*	Принос (%)
Млечна	0,56	0,53	104
Килибарна	0,63	0,58	109
Јаболкова	0,39	0,35	112
Винска	1,66	1,51	110
Шикимска	0,33	0,33	99,9
Лимонска	0,54	0,54	98,4

*Вредностите се средна вредност од три повторувања.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Валидација на аналитичката метода за сепарирање на органски киселини во вино

Повторливост и репродуцибилност

Органски киселини	Интердневна повторливост (5 повторувања x 1 ден)		Интрадневна репродуцибилност (3 повторувања x 3 дена)	
	Средна концентрација (g/L)*	RSD (%)	Средна концентрација (g/L)*	RSD (%)
Млечна	0,84	2,64	0,88	8,38
Килибарна	1,82	2,53	1,75	7,43
Јаболкова	0,28	6,70	0,27	8,33
Винска	6,89	3,30	6,73	4,78
Шикимска	0,2	0,65	0,19	2,71
Лимонска	0,65	3,16	0,62	8,21

*Вредностите се средна вредност од три повторувања.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Валидација на аналитичката метода за сепарирање на органски киселини во вино

Концентрација на органски киселини во вина вранец од различни вински региони во Македонија

Вино	Млечна киселина (g/L)	Килибарна киселина (g/L)	Јаболкова киселина (g/L)	Винска киселина (g/L)	Шикимска киселина (mg/L)	Лимонска киселина (g/L)	Вкупна содржина на киселини (g/L)
B1	0,75±0,14	0,83±0,20a	0,29±0,05	3,33±0,55a	31,2±2,41	0,28±0,02a	5,51±0,65a
B2	1,46±0,23a	1,10±0,42b	0,06±0,003	2,51±0,44b	22,8±1,65a	0,71±0,034b	5,87±0,46a
B3	0,19±0,08a	1,00±0,06b	2,45±0,55a	3,14±0,52a	41,7±4,67	0,29±0,01a	7,11±0,98b
B4	0,24±0,08a	0,78±0,05a	2,05±0,37	2,80±0,27c	58,4±8,45b	0,64±0,05	6,57±1,55
B5	0,37±0,09b	0,73±0,08a	4,03±0,62	2,61±0,22b	3,98±0,32c	0,76±0,04b	8,50±0,23
B6	0,20±0,08a	0,56±0,07c	2,69±0,14a	3,72±0,36	21,2±3,04a	0,36±0,01	7,54±0,62c
B7	0,43±0,12b	0,62±0,05c	1,44±0,08b	3,66±0,41	6,05±,0,85d	0,52±0,02c	6,67±0,26d
B8	0,35±0,11b	0,71±0,07a	1,66±0,07b	3,92±0,58	15,9±1,13e	0,26±0,01a	6,93±0,33
B9	0,34±0,08b	0,63±0,04c	1,81±0,07	3,28±0,44a	7,44±0,88	0,40±0,003d	6,46±0,25d
B10	0,36±0,05b	0,73±0,07a	0,85±0,05d	4,96±0,82d	<LOQ	0,42±0,02d	7,32±0,20c
B11	0,39±0,11b	1,19±0,24b	2,37±0,66	3,95±0,65	13,7±1,84	0,55±0,04c	8,47±0,59
B12	0,60±0,16	0,67±0,11b,c	1,52±0,23b	4,26±0,96	4,15±0,76c	0,29±0,003a	7,34±0,37
B13	0,22±0,06a	0,43±0,08	1,40±0,16b	2,91±0,57c	<LOQ	0,89±0,06e	5,84±0,19a
B14	0,11±0,04a	0,21±0,04d	0,61±0,07	2,09±0,45	5,73±0,15d	0,51±0,04c	3,53±0,13e
B15	0,40±0,10b	0,62±0,05c	1,11±0,20c	2,95±0,60c	15,2±0,93e	0,81±0,05e	5,91±0,32a
B16	0,21±0,05a	0,17±0,006d	0,83±0,11d	2,29±0,11b	<LOQ	0,44±0,03d	3,92±0,06e
B17	0,34±0,02b	0,50±0,07c	1,04±0,14c	4,87±0,75d	55,9±4,52b	0,32±0,01a	7,12±0,92b
Средна вредност	0,41	0,68	1,54	3,37	21,67	0,50	6,51
Минимум	0,11	0,17	0,06	2,09	3,98	0,26	3,53
Максимум	1,46	1,19	4,03	4,96	58,4	0,89	8,50

ЗАКЛУЧОК

- ❖ Одредувањето на органските киселини беше извршено со примена на софистрицирана техника за сепарација, капиларната електрофореза поврзана со масен детектор со време на прелетување (CZE-ESI/QTOF-MS). Со оваа техника се постигна брза и едноставна анализа на јаболкова, килибарна, млечна, винска, шикимска и лимонска киселина, со претходна минимална подготовка на вината. Методот беше оптимизиран и валидиран, а потоа применет за анализа на вина од сортата Вранец. Во сите вина беше забележана релативно висока содржина на винска киселина што е карактеристика на сортата Вранец.
- ❖ Важно е да се напомене дека досега не се објавени литературни податоци за шикимска киселина определена со капиларна електрофореза. Содржината на шикимска киселина во македонски вина неодамна е определена со примена на HPLC но границата на квантификација (7 mg/L или 0,015 mM) е значително повисока споредено со резултатите од ова истражување (0,59 mg/L или 0,0034 mM). Со ова се потврдува дека високата чувствителност и точност на определувањата со QTOF-MS техника е особено важно за соединенија присутни во ниски концентрации.
- ❖ Резултатите ќе им бидат од корист и на производителите на вино во Македонија со цел да ги прилагодат своите винификациски протоколи за оваа сорта, а со тоа да произведат стабилни вина со висок квалитет.

A close-up photograph of a wine glass filled with red wine. A stream of wine is being poured into the glass from the left, creating a dynamic splash and foam. The background is plain white.

**БЛАГОДАРАМ НА
ВНИМАНИЕТО**