

Utjecaj zemljopisnog podrijetla na mineralni sastav i omjer stabilnih izotopa ugljika u vinu

Miloš, Mara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:618315>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

MARA MILOŠ
904/PI

**UTJECAJ ZEMLJOPISNOG PODRIJETLA
NA MINERALNI SASTAV I OMJER
STABILNIH IZOTOPA UGLJIKA U VINU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za fizikalno kemijska i mikrobiološka ispitivanja Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo pod mentorstvom dr.sc. Mare Banović, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, i uz pomoć mr.sc. Renate Leder, rukovoditeljice Laboratorija za fizikalno kemijska i mikrobiološka ispitivanja.

Dr. sc. Mari Banović želim ovom prilikom zahvaliti na pomoći, savjetima i razumjevanju pri odabiru teme, te izradi i pisanju ovog rada.

Posebno zahvaljujem mr. sc. Renati Leder na mentorstvu, podršci i pomoći, te svim djelatnicima Hrvatskog zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo koji su, svatko na svoj način, doprinijeli realizaciji ovog rada.

Najveću zaslugu za ovo postignuće pripisujem članovima svoje obitelji, koji su uvijek bili uz mene, i bez kojih sve ono što sam do sada postigla ne bi bilo moguće. Hvala!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ZEMLJOPISNOG PODRIJETLA NA MINERALNI SASTAV I OMJER STABILNIH IZOTOPA UGLJIKA U VINU

Mara Miloš, 904/PI

Sažetak: Utvrđivanje geografskog podrijetla vina je od velikog značaja za potrošače i proizvođače vina, budući da utječe na kriterije za definiranje kvalitete i cijene vina. Cilj ovog rada bio je proučiti odnos analiziranih mikro i makroelemenata, te omjera stabilnih izotopa ugljika odabranih hrvatskih vina s obzirom na njihovo zemljopisno podrijetlo. Analizirani uzorci potječu iz četiri podregije sa zaštićenim oznakama izvornosti (ZOI): Plešivica, Slavonija, Istra te Srednja i Južna Dalmacija. Mjerenja koncentracija odabranih elemenata (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mo, Mn, Na, Pb, Rb, Sn, Sr, V i Zn) provedena su spektrometrijom optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES), a mjerenje omjera stabilnih izotopa ugljika spektrometrijom masa omjera izotopa (IRMS). Rezultati su pokazali da je potrebno proširiti istraživanje na veći broj uzoraka vina i provesti statističku obradu rezultata analize, kako bi se pouzdano odredili odgovarajući regionalni deskriptori.

Glavne riječi: vino, mineralni profil, stabilni izotopi, zemljopisno podrijetlo

Rad sadrži: 55 stranica, 5 slika, 13 tablica, 70 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Mara Banović*

Pomoć pri izradi: *Renata Leder, mr. sc.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić
2. Prof.dr.sc. Mara Banović
3. Prof. dr.sc. Nada Vahčić
4. Izv. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac (zamjena)

Datum obrane: 26. Rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF THE GEOGRAPHICAL ORIGIN ON THE MINERAL COMPOSITION AND THE RATIO OF STABLE CARBON ISOTOPES IN WINE

Mara Miloš, 904/PI

Abstract: Determining the geographical origin of wine is of great importance to consumers and wine producers, as they affect the criteria for defining the quality and price of wine. The aim of this paper was to study the relationship between analyzed micro and macro elements and the ratio of stable isotopes of carbon of selected Croatian wines with regard to their geographical origin. The tested samples originate from four protected designations of origin (ZOI): Plešivica, Slavonia, Istria and Central and Southern Dalmatia. The measurements of the concentration of the selected elements (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mo, Mn, Na, Pb, Rb) are made by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES), and the measurement of the isotope ratio by mass spectrometry of the isotope ratio (IRMS). The results have shown that it is necessary to extend research to a greater number of wine samples and to carry out statistical analysis of the results in order to determine the appropriate regional descriptors.

Keywords: wine, mineral profile, stable isotopes, geographical origin

Thesis contains: 55 pages, 5 figures, 13 tables, 70 references, 1 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis is in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Mara Banović, Phd, full professor*

Technical support and assistance: *Renata Leder, M. eng.*

Reviewers:

1. Phd. Karin Kovačević Ganić, Full professor
2. Phd. Mara Banović, Full professor
3. Phd. Nada Vahčić, Full professor
4. Phd. Vlatka Petravić Tominac, Associate professor

Thesis is defended: 26 of September 2018.

SADRŽAJ:

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	AUTENTIČNOST PREHRAMBENIH PROIZVODA	2
2.2	AUTENTIČNOST VINA	3
2.3	MINERALNI SASTAV VINA	7
2.4	UTVRĐIVANJE AUTENTIČNOSTI VINA	10
2.4.1	Atomska apsorpcijska spektrometrija (ASS)	11
2.4.2	Spektrometrija optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES)	12
2.4.3	Masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (ICP-MS)	13
2.4.4	Stabilni izotopi	14
2.4.5	Maseni spektar stabilnih izotopa (IRMS)	16
2.5	UTVRĐIVANJE ZEMLJOPISNOG PODRIJETLA VINA	19
2.5.1	Vinogradarske regije u Hrvatskoj	21
2.5.2	Zaštićene oznake izvornosti (ZOI)	22
3	EKPERIMENTALNI DIO	24
3.1	MATERIJALI	24
3.1.1	Uzorci vina	24
3.1.2	Kemikalije	24
3.1.3	Instrumenti i pribor	26
3.2	METODE	26
3.2.1	Automatizirani sustav za ekstrakciju etanola (ADCS)	26
3.2.2	Automatski titrator po Karl Fischer-u	28
3.2.3	Multielementarna metoda određivanja elemenata	29

3.2.4	Spektrometar masa omjera stabilnih izotopa (IRMS).....	31
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	33
4.1	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	34
4.2	MINERALNI PROFIL UZORAKA VINA	40
4.3	OMJERI IZOTOPA UGLJIKA	44
5	ZAKLJUČCI.....	46
6	LITERATURA	48
7	PRILOZI	
7.1	TABLICA UKUPNIH REZULTATATA ISTRAŽIVANJA	

1 UVOD

Autentičnost i podrijetlo prehrambenih proizvoda su teme velikog interesa za prehrambenu industriju, ne samo za potrošače već i za proizvođače i distributere. Upotreba zemljopisnih oznaka omogućuje proizvođačima prepoznatljivo tržište, a često i vrhunsku cijenu. Posljednjih godina je napravljen veliki napredak u određivanju autentičnosti hrane, pogotovo u području utvrđivanja zemljopisnog podrijetla. U primjenjivanim metodama se obično kombiniraju brojne kemijske analize s multivarijantnim statističkim analizama kemijskih podataka, kako bi identificirali i klasificirali agrokulturalne proizvode prema zemljopisnom podrijetlu. Osim mineralnog sastava, posebna pozornost se skreće i na potencijal koji u daljnjim istraživanjima pruža i istraživanje omjera izotopa određenih elemenata.

Vino je proizvod koji se široko konzumira diljem svijeta, a opsežno se istražuje zbog prijevara, uključujući krivotvorenje dodavanjem vode i/ili šećera, lažne godine berbe i zemljopisna podrijetla. Vino je po kemijskom sastavu vrlo složena otopina različitih elemenata, organskih i anorganskih spojeva, te njihovih kompleksa. Na sastav vina utječu brojni čimbenici koji su povezani s regijom proizvodnje, primjerice sorta vinove loze, tlo i klima, kvasci, postupci pri proizvodnji vina, te socijalno demografski uvjeti.

Svrha ovog rada je utvrđivanje geografskog podrijetla hrvatskih vina na osnovu mineralnog sastava i omjera stabilnih izotopa ^{12}C i ^{13}C . U odabranim uzorcima odrediti će se mineralni sastav primjenom ICP-MS metode, a omjer stabilnih izotopa ^{12}C i ^{13}C biti će određen IRMS metodom.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 AUTENTIČNOST PREHRAMBENIH PROIZVODA

Sve veća svijest javnosti o kvaliteti i sigurnosti hrane dovela je do ubrzanog rasta na polju utvrđivanja autetičnosti hrane. Globalizacija tržišta hrane podrazumijeva da potrošači dolaze u kontakt s raznovrsnom hranom, pa su neki europski i svjetski potrošači izrazili zabrinutost zbog manjka informacija. Unatoč napretku i razvoju novih metoda, raznolikost i raznovrsnost namirnica, njihov kemijski sastav i fizikalna svojstva predstavljaju izazov u kojem se i dalje pomiču postojeće granice i popunjavaju praznine utvrđivanja autetičnosti hrane. Posebnu pažnju su privukla svjetska zbivanja vezana uz patvorenja i kontaminacije hrane, kao što je slučaj sa mlijekom u Kini i svinjskim mesom u Irskoj, oboje 2008. godine (Ellis i sur., 2012).

Problem autetičnosti hrane nije moderni problem ili fenomen uzrokovan djelovanjem medija i pritiska javnosti, već je područje koje se paralelno istražuje od početaka proizvodnje hrane. Tako je njemački znanstvenik Accum, kao jedan od ranih predstavnika moderne znanosti, početkom 19. stoljeća, istraživao patvorenja i kontaminacije hrane. To je bio prvi zabilježeni, ozbiljniji pokušaj da se prikažu posljedice nekontroliranog dodavanja aditiva i opasnosti patvorenja namirnica (Accum, 1820).

Sredinom 19.stoljeća, Hassal se nadovezuje na Accumova saznanja istraživanjem koje je uključivalo analizu patvorenja na više od tisuću uzoraka hrane i pića (Hassal, 1855). Zakonski okvir prati korak sa znanstvenim istraživanjima pa 1860. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu izlazi “Akt o patvorenju” (eng. *Adulteration Act*), a već 1875 . godine i Zakon o prodaji hrane i lijekova (eng. *Sale of Food and Drugs Act*), koji su poslužili kao podloga za brojne moderne, globalne regulative.

Unatoč nastojanjima, u 21. stoljeću je i dalje vidljivo da malverzacije hranom ne poznaju granice. Zabilježeni su brojni pokušaji patvorenja velikog broja proizvoda, kao što su čokolada, vino, viski, maslac, čaj, sir, mlijeko, ulje i drugi (Bricout i sur., 1987; Parker i sur., 1998;

Rossman i sur, 2000; Kelly i Rhodes, 2002; Kokkinofta i sur., 2013). Patvorenja se javljaju zbog brojnih razloga, a najčešće su povezani sa financijskom dobiti. Porast profitabilnosti se postiže prividnim povećanjem kvalitete proizvoda, kako bi se oponašala kvaliteta već poznatog proizvoda ili produžila njegova trajnost (Toher i sur., 2007)..

Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organisation; WHO) je u 2007. godini prijavila kinesku krizu s mlijekom kao jednu od najvećih sigurnosnih prijetnji s kojima se organizacija susrela u posljednjim godinama. Istraživanje se proširilo na internacionalne razmjere i uključivalo je jaja u prahu u Japanu i Južnoj Koreji, svježa jaja u Hong Kongu, kekse u Švicarskoj, slatkiše u Novom Zelandu, prašak za pecivo u Maleziji i proizvode u mnogim drugim državama svijeta sa potencijalno patvorenim proizvodima (Ellis i sur., 2012).

Osim očitog problema sigurnosti, moderno otvoreno tržište predstavlja još jedan problem - izvornost proizvoda. Regionalno označeni prehrambeni proizvodi nerijetko sa oznakom podrijetla nose oznake očekivane kvalitete koja opravdava povećanu cijenu. Poseban fokus imaju vino i maslinovo ulje, kao neke od najcjenjenijih i regionalno specifičnih proizvoda (Pereira i Martins-Lopes, 2018).

2.2 AUTENTIČNOST VINA

U svijetu vina, autentičnost nije samo poželjna, već se aktivno istražuje i dokazuje. Autentičnost vina se opsežno istražuje, jer vina, zbog kemijskog sastava i proizvodnje širom svijeta, mogu biti lako patvoreni proizvod. Mnoge zemlje i zemljopisna područja su poznati po proizvodnji vrhunskih vina, i etiketa sa zemljopisnim podrijetlom vina, što u konačnici pridonosi njegovoj komercijalnoj vrijednosti (Luykx i Ruth, 2008). Utvrđivanje zemljopisnog podrijetla vina je pitanje od najveće važnosti za zemlje diljem svijeta, kako bi se zaštitili kvalitetni proizvodi u slučaju lažnih izjava o njihovom zemljopisnom podrijetlu. Lažne izjave izvornosti mogu dovesti do negativnog gospodarskog utjecaja na industriju vina (Versari i sur. 2014).

U vinskoj industriji postoje brojni primjeri kako proizvođači koriste različite metode krivotvorenja kako bi povećali profit. Procjena autentičnosti vina uključuje provjere nekoliko tvrdnji, kao što su zemljopisno podrijetlo, godina berbe i način proizvodnje. Shodno tome metode istraživanja podrazumijevaju da kemijski sastav poljoprivrednih proizvoda, kao što je vino, odražavaju sastav tla zemlje na kojoj je raslo (Rebolo i sur., 2000). Ta teorija se kroz literaturu uveliko istražuje u brojnim zemljama-proizvođačima vina, gdje se uspoređuju regionalna vina, kao i vina iz različitih zemalja (Larcher i Nicolini, 2001; Angus i sur., 2006; Fabiani i sur., 2010; Di Paola-Naranjo i sur., 2011; Fabrina i sur., 2011.; Coetzee i sur., 2011; Coetzee i sur., 2014; Pisano i sur., 2014).

Vinska industrija treba analitičke alate za provjeru autentičnosti visokovrijednih proizvoda, kako bi zaštitili svoje oznake kvalitete i izvornosti. Idealno, ti alati trebaju omogućiti brzu i jeftinu analizu u bilo kojem trenutku duž distribucijskog lanca. Budući da se proizvodna područja šire, a time i vidljive oznake izvornosti i kvalitete, to se odražava u konačnoj cijeni gotovog proizvoda, stoga je određivanje zemljopisnog podrijetla jedan od primarnih zahtjeva pri potvrđivanju autentičnosti vina. Pitanje zemljopisne identifikacije vina postalo je ključno, pogotovo kada se odnosi na manje proizvodne površine (Bernardova i sur., 2013).

Temeljna pretpostavka je da se vina razlikuju po regijama na osnovu svoga mineralnog sastava, budući da se mineralne tvari uglavnom crpe iz tla. Nadalje, pretpostavka je da mineralne tvari, preko korijena, dospjevaju do bobica grožđa u istim izotopnim omjerima u kojima se pojavljuju u tlu na kojem raste loza (Almeida i Vasconcelos 2003). Općenito, elementi koji su odabrani kao deskriptori za zemljopisno podrijetlo vina bi trebali imati snažnu povezanost između sastava vina i geokemije tla. Međutim, ne smije se zaboraviti da na elementarni profil vina može utjecati nekoliko čimbenika, kao što su onečišćenje okoliša, vinogradarske prakse, klimatske promjene i procesi proizvodnje vina, što utječe na mineralni sadržaj vina (Geana, 2016).

Dodatak šećera odšećerne repe, šećerne trske ili koncentriranog mošta u masulj, ili vino, povećava prirodnu koncentraciju etanola, a time i vrijednost vina. Ipak, ovakvi poduhvati su legalni samo u posebnim regijama ili berbama koje imaju manjak sunčanih dana tijekom sezone zrenja, što dovodi do niskih koncentracija šećera u grožđu. Prema Zakonu o vinu u RH nije dozvoljeno dodavanje šećera, koncentriranog mošta ili drugih slatkih tvari u masulj, mošt ili vino, osim ako Zakonom nije drugačije određeno (Zakon o vinu, NN 96/03, 25/09, 22/11, 55/11,

82/13, 14/14). Dodatak vode, kako bi se povećao volumen, se također smatra vinarskim patvorenjem. Važno je spomenuti da se u ovim slučajevima često narušava prirodna stabilnost vina (Đorđević i sur., 2013).

Kako bi se neko vino smatralo autentičnim, osnovni preduvjet je provjera usklađenosti sa zakonskim regulacijama zemljopisne regije u kojoj je proizvedeno. U Tablici 1. su prikazane trenutne zakonske regulacije u Republici Hrvatskoj, povezane sa autentičnosti vina.

Tablica 1. Trenutne zakonske regulative na području vina u RH povezane sa autentičnosti vina

<i>Zakon o vinu</i>	NN 96/03, 25/09, 22/11, 55/11, 82/13, 14/14
<i>Pravilnik o vinu</i>	NN 96/96, 7/97, 117/97, 57/00
<i>Lista zemljopisnih oznaka</i>	NN 6/04, 111/08
<i>Pravilnik o nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze</i>	NN 53/14
<i>Pravilnik o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze</i>	NN 74/12, 80/12, 48/13, 159/13
<i>Pravilnik o proizvodnji vina</i>	NN 2/05, 137/08, 48/14
<i>Zakon o zajedničkoj organizaciji tržišta poljoprivrednih proizvoda i posebnim mjerama i pravilima vezanim za tržište poljoprivrednih proizvoda</i>	NN 82/13, 14/14
<i>Pravilnik o stavljanju u promet vina i vina sa zaštićenom oznakom izvornosti</i>	NN 142/13, 49/14
<i>Pravilnik o označavanju vina oznakom sorte vinove loze</i>	NN 79/17
<i>Pravilnik o zaštićenim oznakama izvornosti i zaštićenim oznakama zemljopisnog podrijetla, tradicionalnim izrazima i označavanju vina</i>	NN 141/10, 31/11, 78/11, 120/12

Kroz znanstvenu literaturu se može uočiti da se za istraživanje autentičnosti vina koriste različite analitičke metode.

U 2012. godini istraživanje Belajove i Suhaja je za zadatak imalo ocijeniti kakvoću slovačkih vina sa zaštićenom zemljopisnom oznakom koja potječe od konvencionalne i organske proizvodnje u skladu s europskim propisima o vinu te ih razlikovati na temelju kompozicijske analize nekih sastojaka vina, uglavnom saharida i glicerola. U tu svrhu određena je koncentracija glukoze i fruktoze, omjera glukoza/fruktoza i omjera glicerol/etanol. Tehnika tekućinske kromatografije visokog učinka (HPLC) korištena je za ispitivanje 14 organskih i 21 konvencionalnih suhih i crnih vina, kao i vinove loze. Zaključeno je da procjena na osnovu koncentracije saharida i glicerola daje okvirno dobru informaciju o stupnju zrelosti grožđa i uvjetima fermentacije, ali i daje previše raspršene rezultate kako bi se mogli izvesti pouzdani zaključci o zemljopisnom podrijetlu. Iako je većina radova objavljenih do tada ukazivala na separaciju većeg broja vinskih fenola u jednoj kromatografskoj analizi, u ovom radu je primjećeno da je metoda prikladna za manji broj fenola i da su potrebne daljnje prilagodbe parametara kako bi se povećala uspješnost metode (Belajova i Suhaj, 2012).

Mogućnost klasifikacije crvenih i bijelih uzoraka vina prema sortnom i zemljopisnom podrijetlu, ispitivana je u slovenskim vinima, određivanjem jednostavnih enoloških deskriptora. Utvrđeni su sljedeći enološki parametri: relativna gustoća (u g / mL na 20° C), sadržaj ukupnog ekstrakta (g / L), ukupna kiselost (g / L), hlapljivost (g / L), hlapljiva kiselost (g / L), pepeo (g / L), slobodni SO₂ mg / L), reducirajući šećeri (g / L), ekstrakt bez šećera (g / L), etanol (u %) i pH. Utvrđeno je da su svi proučeni deskriptori odabrani za karakterizaciju uzoraka vina statistički značajni u odnosu na razlikovanje crvenih i bijelih vina. Uočene su brojne razlike u odnosu na njihovu važnost s obzirom na kategorije ciljanih varijabli- sorta, zemljopisno područje i godina berbe (Bernardova i sur., 2013).

Hrvatska je zemlja sa dugom tradicijom uzgoja vinove loze i proizvodnje vina, sa oko 200 vrsta registriranih u Ministarstvu poljoprivrede. Prema popisu kultivara, graševina je najrasprostranjenija bijela sorta grožđa, a slijedi je Istarska Malvazija, što ukazuje da bijela vina imaju velik značaj u Hrvatskoj tradicionalnoj proizvodnji (NN 53/14).

U istraživanju provedenom 2016. godine, hrvatska bijela vina su podvrgnuta metodi matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (MALDI-TOF/MS), što se pokazalo kao relativno jednostavna i brza tehnika za razlikovanje. Iako metoda koja se inače koristi u diferencijaciji ulja, dobar omjer rezultata i smetnji ide u prilog predloženom daljnjem istraživanju na uzorcima vina. Ovo bi moglo dovesti do razvoja nove, brze, jednostavne i reproducibilne metode za procjenu autentičnosti vina (Rešetar i sur., 2016).

Istraživanjem 2017. godine, Leder i suradnici su metodom spektrometrije optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES) proučili uzorke bijelog vina u cilju diferencijacije vina iz različitih regija na osnovu mikro i makroelemenata. Analizom varijance utvrđene su statistički opravdane razlike u koncentracijama pojedinih elemenata između vina ispitivanih zaštićenih oznaka izvornosti. Rezultati PCA analize su potvrdili različitost između pojedinih ZOI-a, kao i važnost pojedinih elemenata u sastavu vina određenih UOI-a u Republici Hrvatskoj (Leder i sur., 2017).

Elementarni profil uzoraka 188 vina sakupljenih iz različitih kineskih pokrajina je analiziran pomoću tri metode: masene spektrometrije induktivno spregnute plazme (ICP-MS), spektrometrije optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES) i spektroskopijom masenih omjera izotopa (IRMS). Rezultati istraživanja su pokazali da je kombinacija rezultata omjera izotopa kisika ^{18}O i rezultata mineralnog profila obećavajuća metoda u autentifikaciji kineskih vina (Fan i sur., 2018).

2.3 MINERALNI SASTAV VINA

Vino je namirnica kompleksnog sastava - u njemu su prisutni brojni organski i anorganski spojevi. Kvaliteta i svojstva vina su uvjetovani udjelom i međusobnim omjerima pojedinih sastojaka, a mineralni sastav vina zauzima visoko mjesto važnosti. Osim svojstava vina, mineralni sastav ima i veliki utjecaj na konzumaciju i sigurnost konzumacije vina, pa je

poznavanje sastava nužno i zbog moguće toksičnosti i utjecaja na zdravlje potrošača (Aceto i sur., 2002).

Na sastav vina utječu mnogi čimbenici kao što su sorta grožđa, tlo i klima, kvasac, vrsta vina koje se proizvodi, transport i skladištenje (Bertoldi i sur., 2011). Svi oni imaju važan utjecaj na kvalitetu vina, a od iznimne su važnosti za razlikovanje vina i otkrivanje mogućih patvorenja. Ovi čimbenici posebno su važni za vina proizvedena korištenjem određenih sorti grožđa, kultiviranih u posebnim zemljopisnim područjima, pod kontroliranim uvjetima uzgoja i proizvodnje vina sa zaštićenim oznakama izvornosti (ZOI) (Alvarez i dr., 2007).

Vinova loza uzima minerale iz tla, preko korijenskog sustava i prenosi ih dalje do svih organa koji onda mikro i makroelemente koriste za normalan rast i razvoj biljke. Minerali također ulaze i u veliki broj spojeva koji čine građevne jedinice biljnih organizama i na taj način utječu na cijeli razvoj vinove loze, a naročito na proizvodnju bobica grožđa. Minerali utječu i na veliki broj spojeva koji sudjeluju u različitim kemijskim procesima u bobicama, što se uveliko može odraziti na mošt i vino (Mullins i sur., 1991).

Mikro i makroelementi su od posebne važnosti za mošt jer direktno utječu na proces alkoholne fermentacije. Reguliranjem sadržaja makro i mikroelemenata u moštu za vrijeme fermentacije regulira se hranjenje kvasaca, a na taj način se direktno regulira i alkoholna fermentacija. Važno je navesti da elementi kao željezo, bakar, mangan, sumpor, magnezij i dr., ulaze u sastav enzima kvasčevih stanica i tako sudjeluju u procesu fermentacije. Osim utjecaja na fermentaciju, ovi elementi utječu i na važne fizikalno-kemijske procese u vinu kao što su stabilizacija vina, te različita katalitička ili regulacijska djelovanja. U vinu se nalaze isti minerali kao i u moštu, ali u manjoj količini budući da jedan dio utroše kvasci, a veći dio prelazi u netopljive spojeve, te se taloži. Mnogi elementi mogu negativno utjecati na kvalitetu vina sudjelujući u procesima taloženja tartarata, oksidacije vina, te pojavom zamućenja (McKinnon i Scollary, 1997; Larcher i Nicolini, 2001; Pessanha i sur., 2010).

Određivanje metala u vinima se rutinski provodi u većini enoloških laboratorija jer je razina određenih elemenata zakonski ograničena. Pravilnikom o vinu (NN, 34/95) u RH regulirane su i dozvoljene razine određenih elemenata (Tablica 2).

Tablica 2. Djelomični prikaz nekih mikro i makroelemenata definiranih Pravilnikom o vinu (NN, 34/95)

Element	Kemijski symbol	Najviša dozvoljena koncentracija u vinu
<i>Olovo</i>	Pb	0,3 mg/L
<i>Cink</i>	Zn	5,0 mg/L
<i>Srebro</i>	Ag	0,1 mg/L
<i>Bakar</i>	Cu	1,0 mg/L
<i>Kadmij</i>	Cd	0,01 mg/L
<i>Arsen</i>	As	0,2 mg/L
<i>Antimon</i>	Sb	0,2 mg/L
<i>Aluminij</i>	Al	10,0 mg/L
<i>Krom</i>	Cr	0,1 mg/L
<i>Željezo</i>	Fe	10 mg/L bijela vina 15 mg/L ružičasta vina 20 mg/L crna vina
<i>Nikal</i>	Ni	0,1 mg/L
<i>Natrij*</i>	Na	20 mg/L (kao čisti Na)
<i>Brom</i>	Br	1,0 mg/L

* Rješenjem za označavanje vina s oznakom kontroliranog porijekla, može se dopustiti veća količina natrija u vinu, ako je natrij svojstven za određeno vinogradarsko područje.

Mineralni profil se pokazao kao najbolji kriterij za istraživanje diferencijacije prema zemljopisnom podrijetlu zbog izravnog odnosa s tlom. Ova diferencijacija se može provesti određivanjem sastavnih elemenata ili elemenata u tragovima. Također treba napomenuti da

klimatski uvjeti utječu na potrebne fungicidne tretmane vina koja određuju razinu bakra u grožđu, a edafička svojstva tla utječu na razinu metala kao što su Na, Ca, K i Fe u grožđu. Sadržaj pojedinih elemenata u vinu može biti pod utjecajem čimbenika kao što je njihova u tlu, praksama gnojidbe i uvjetima prerade grožđa (Alvarez i dr., 2007).

Podatci o mineralnom sastavu mikro i makroelemenata hrvatskih vina su relativno oskudni u usporedbi sa stranom literaturom, a važno je napomenuti kako se u literaturi, u velikom broju istraživanja, mineralni sastav koristi kao osnova za utvrđivanje geografske pripadnosti vina (Theil i Danzer, 1997; Larcher i Nicolini, 2001; Alvarez, 2007; Coetzee, 2011., Coetzee, 2014).

2.4 UTVRĐVANJE AUTENTIČNOSTI VINA

Kroz dostupnu znanstvenu literaturu se može susresti primjena različitih analitičkih metoda za određivanje autentičnosti vina - od klasičnih gravimetrijskih i titrimetrijskih metoda do spektrometrijskih metoda. Uz različite metode atomske apsorpcijske spektrometrije, primjenjuju se metode spektrofotometrije, kompleksometrijske titracije, diferencijalne pulsne polarografije i rendgenske fluorescencije za određivanje željeza, bakra i arsena, te elektrokemijske metode za određivanje raznih metala (Aceto i dr., 2002).

Određivanje metala u vinu redovito se provodi u većini enoloških laboratorija jer pojedini elementi moraju biti pod nadzorom u skladu sa zakonom. Nekoliko zemalja, uključujući Hrvatsku, ima zahtjeve koji ograničavaju sadržaj pojedinih metala u vinu, a proizvođači ih moraju ispuniti kako bi dobili pravo uvoza (Aceto i sur., 2002).

2.4.1 Atomska apsorpcijska spektrometrija (ASS)

Atomske spektroskopije služe u analizi metala i metaloida. Temelje se na tri procesa: atomskoj apsorpciji, atomskoj emisiji i atomskoj fluorescenciji. Temelj atomske apsorpcijske spektrometrije je pobuda elektrona u vanjskoj ljusci metalnog atoma tj. prijelaz slobodnog atoma u više energetska stanje, npr. apsorpcijom toplinske energije ili energije zračenja.

Energetske razlike ovih prijelaza su određene atomskom strukturom elementa budući da je energija emitiranog ili apsorbiranog fotona karakteristična za element (Beaty i Kerber, 2002). Ova metoda se primjenjuje za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 elemenata. ASS se može primijeniti samo na proučavanje atoma u plinovitoj sredini, u kojoj su pojedinačni ioni međusobno dobro razdvojeni. Kako bi se to postiglo, primjenjuje se atomizacija, proces kojim se uzorak isparava i razgrađuje uz nastanak atomske pare. Atomizacija je najkritičniji korak kod ASS metoda jer je njenom učinkovitošću i reproducibilnošću određena osjetljivost, preciznost i točnost metode.

Najčešće metode atomizacije su: (i) atomizacija u plamenu, (ii) elektrotermička atomizacija, (iii) atomizacija u induktivno spregnutoj plazmi, (iv) atomizacija u plazmi istosmjerne struje (Skoog i sur, 1999).

ASS sa elektotermičkom atomizacijom se koristi u određivanju Mn, Cd i Pb u vinima. Direktno i istovremeno određivanje više elemenata u tragovima je naročito pogodno za rutinske analize u laboratorijima jer smanjuje troškove i trajanje samih analiza (Freschi i dr., 2001).

Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (*eng. Flame Atomic Absorption Spectroscopy*) se uglavnom koristi u analizi vina, prvenstveno zbog niske cijene instrumenta što tehniku čini lako dostupnom većini enoloških laboratorija. S obzirom na kompromis između potrebnog troška i osjetljivosti, ASS u plamenu se smatra dobrom metodom za određivanje alkalijskih i zemnoalkalijskih metala u vinu, kao i za određivanje Cu, Fe, Mn i Zn. Kao manu svakako treba navesti da metoda nije primjerena za određivanje toksičnih elemenata kao As, Cd, Cr, Hg i Pb, osim za uzorke sa visokim koncentracijama toksikanata (Aceto i dr., 2002).

Frias i suradnici su proučili koncentracije 11 metala (K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li i Rb), odabranih prema njihovom enološkom značaju i informacijama koje mogu pružiti o

vinskom geografskom podrijetlu. U istraživanju su korištena suha i slatka vina s otoka El Hierro, La Palma i Lanzarote, kako bi se utvrdio utjecaj metala na zrenje grožđa i proučio odnos između sadržaja metala i zemljopisnog porijekla vina pomoću ASS metode. Između uzoraka su pronađene značajne razlike u koncentracijama metala, ovisno o otoku s kojeg je vino dobiveno. Linearna diskriminantna analiza je pokazala da su koncentracije Rb, Mn, Na i Sr pouzdani diskriminacijski elementi na osnovu kojih se može razlikovati zemljopisno podrijetlo uzoraka (Frias i sur., 2002).

Glavni nedostatak ASS-a je što se pri mjerenju najčešće određuje jedan ili nekoliko elemenata, priprema uzorka je zahtjevna i dugotrajna, te iziskuje velike količine potrebnih kemikalija. Kao dobra alternativa pokazalo se korištenje induktivno spregnute plazme (ICP). Široki linearni dinamički raspon ove tehnike (do šest redova veličine) omogućuje istodobno određivanje nekoliko analita od elemenata do elemenata u tragovima. Visoka temperatura plazme (oko 10 000 K) daje optimalne uvjete za učinkovito “razbijanje” organske tvari (Aceto i sur., 2002).

2.4.2 Spektrometrija optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES)

Metoda spektrometrije optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES, *engl. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) je multielementarna metoda sa vrlo dobrom detekcijom, visokom pouzdanošću i velikom brzinom određivanja analita.

U optičkoj emisijskoj spektrometriji uzorak se podvrgava temperaturama koje su toliko visoke da ne uzrokuju samo disocijaciju na atome, već i pojavu pobuđivanja i ionizacije atoma u uzorku. Kad se atomi i ioni nađu u pobuđenom stanju oni emitiraju određenu količinu energije prilikom povratka u osnovno stanje. Intenzitet emitirane svjetlosti pri specifičnoj valnoj duljini se mjeri i koristi za određivanje koncentracije pojedinog elementa (Boss i Fredeen, 1999).

Prema definiciji, plazma je vodljiva plinska smjesa koja sadrži znatnu količinu kationa i elektrona. U argonskoj plazmi primjenjenoj za emisijske analize, ioni argona i elektroni su osnovne vodljive vrste, iako vodljivosti pridonose i kationi uzorka. Ioni argona, jednom stvoreni

u plazmi, apsorbiraju dovoljno snage iz vanjskih izvora, koja održava temperature na prikladnome stupnju za daljnju ionizaciju i beskonačno održavanje plazme. Temperature plazme mogu biti iznimno visoke, čak do 10 000°C (Montaser i Golightly, 1992).

Kad atomi uzorka dolaze u područje promatranja u plazmi, oni su proveli već približno 2 ms pri temperaturama od 6000°C do 8000°C. Ta vremena i temperature su dvostruke ili čak trostruke, u odnosu na one u najtoplijim gorivim plamenima. Na taj način, atomizacija je gotovo potpuna, a uključene su i manje kemijske interferencije. Pojava ionizacijske interferencije je vrlo mala ili se uopće ne javlja. S plazma-izvorom povezano je još nekoliko prednosti. Kao prvo, atomizacija nastaje u kemijski inertnoj okolini, što pozitivno utječe na trajnost uzorka. Nadalje, temperaturni presjek plazme je relativno jednoličan, sa gotovo neprimjetnim razlikama u temperaturi, što omogućuje uglavnom linearne rezultate za velike raspone različitih koncentracija (Skoog i sur., 1999).

Zbog visoke temperature i stabilnosti plazme, utjecaj matriksa na rezultat mjerenja je znatno smanjen, a to je naročito važno kod vina kao složenog organskog matriksa. Ovom metodom otvara se mogućnost analize i bez ikakve prethodne pripreme (Theil i Danzer, 1997).

Deset uzoraka bijelih i crnih vina kupljenih lokalnom supermarketu su podvrgnuti analizi koncentracija Hg, i Pb (ICP-OES) i analizi koncentracija Ca, K, Cr, Mn, Sn, Cd (HG-ICP-OES). Cilj istraživanja je bio odrediti koncentracije toksičnih metala u uzorcima vina iz različitih dijelova Turske. Zaključeno je da kvantitativno određivanje žive, olova i kadmija zahtijeva osjetljive analitičke tehnike jer su obično prisutne u tragovima i da se ICP-OES pokazao kao dobra metoda za tu namjenu (Aydin i sur., 2010).

2.4.3 Masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (ICP-MS)

Kod ove metode, atomizacija se postiže na isti način kao i kod ICP-OES metode, a kao detektor služi maseni spektrometar. Na taj način se pridonosi visokoj osjetljivosti metode, ima vrlo nisko pozadinsko zračenje, limiti detekcije su u području ng/L, a omogućeno je i kvantitativno

određivanje doslovno svih elemenata. Određivanje elemenata u tragovima može biti iznimno teško zbog potencijalnih smetnji i interferencija koje nastaju u uzorcima s visokim koncentracijama velikog broja elemenata (relativno kompleksni matriks). Utjecaj matriksa i pojava preklapanja se mogu znatno smanjiti odgovarajućim postavkama instrumenata za plazmu i unos uzorka (Boss i Fredeen, 1999).

Analiza kineskog rižinog vina tri poznate vinarije u Kini provedeno je prema sadržaju mineralnog elementa u studiji 2012. godine. Spektrometrijom induktivno spregnute plazme (ICP-MS) u 117 uzoraka određeno je 19 minerala (Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, V, Cr, Co, Ni, As, Se, Mo, Cd, Ba i Pb). Zaključeno je da “otisak” (*eng. fingerprint*) koji daje mineralni sastav može služiti kao učinkovita metoda za određivanje autentičnosti rižinih vina (Shen i sur., 2013).

2.4.4 Stabilni izotopi

Stabilni izotopi su izotopi jednog elementa koji su stabilni i koji tijekom vremena ne propadaju kroz radioaktivne procese. Većina elemenata se sastoji od više od jednog stabilnog izotopa. Na primjer, vodik postoji kao dva stabilna izotopa (^1H i ^2H), ugljik postoji kao dva stabilna izotopa (^{12}C i ^{13}C), a kisik postoji kao tri stabilna izotopa (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O). U većini slučajeva, najveća koncentracija jedne vrste stabilnog izotopa obično sadrži najmanji broj neutrona za taj element. Stabilni izotopi se moraju razlikovati od radioaktivnih izotopa nekog elementa. Radioaktivni izotopi imaju konačan životni vijek i prolaze kroz reakcije propadanja kako bi formirali neki drugi element. Vrijeme potrebno za ovo propadanje može varirati u rasponu od nekoliko trenutaka do tisuća godina (Ghidini i sur., 2006).

Vino i maslinovo ulje su jedni od najcjenjenijih prehrambenih proizvoda s obzirom na komercijalne prijevare i patvorenja. Angerosa i sur. su napravili mjerenja koncentracija izotopa ^{13}C i ^{18}O ulja i nekih njegovih frakcija, kako bi se dobile informacije o zemljopisnom podrijetlu maslinovog ulja proizvedenog u Grčkoj, Maroku, Španjolskoj, Italiji, Tunisu i Turskoj. Primjenom statističkih postupaka pokazali su da uzorci ulja pokazuju trend klastera prema različitim klimatskim područjima uzgoja okoliša plodova. Ipak, uočene su sličnosti u rezultatima za uzorke iz susjednih zemalja koji imaju slične klime (Angerosa i sur., 1999).

Kelly i Rhodes su istaknuli nove tehnike kao što su spoj spektroskopije i specifična izotopna masena spektrometrija. Ova dostignuća nude mogućnost pružanja bržeg i poboljšanog otkrivanja patvorenja biljnih ulja (Kelly i Rhodes, 2002).

Tablica 3. Stabilni izotopi i njihove količine izražene u postotcima za elemente koji se najčešće koriste u istraživanjima autentičnosti hrane (Ghidini i sur., 2006)

Element	Izotop	Obilje (%)
Vodik	1H	99,985
	2H	0,015
Ugljik	^{12}C	98,89
	^{13}C	1,11
Dušik	^{14}N	99,63
	^{15}N	0,37
Kisik	^{16}O	99,759
	^{17}O	0,037
	^{18}O	0,204
Sumpor	^{32}S	95,00
	^{33}S	0,76
	^{34}S	4,22
	^{36}S	0,014
Stroncij	^{84}Sr	0,56
	^{86}Sr	9,86
	^{87}Sr	7,02
	^{88}Sr	82,56

U vinu, IRMS se može koristiti i za određivanje zemljopisnog porijekla uzoraka i za otkrivanje krivotvorenja. Gremaud i sur. su karakterizirali švicarske vinograde i uspjeli su razlikovati pet glavnih proizvodnih zona. Dobiveni su rezultati kombinirani sa varijacijama $\delta^{18}O$, s elementarnim sastavom (Mn, Al, B, Ba, Ca, Fe, Mg, Na, Rb, Sr, Zn) i podacima FT-IR analize (Gremaud i sur., 2004).

Istraživanje na talijanskim vinima, koje su proveli Đorđević i suradnici, ocjenjuje metodu trenutno prihvaćenu za provjeru autentičnosti vina koja koristi stabilne omjere izotopa za otkrivanje dodavanja šećera i vode. Iz rezultata je vidljivo da učinkovitost otkrivanja patvorenja varira i ovisi o vrijednostima izotopnih omjera određenog uzorka koji se obrađuje i vrsti patvorenja. Koristeći bogatstvo informacija dostupnih u europskoj vinskoj bazi podataka i simulacijom realističnih uzoraka i krivotvorenja, jasno je da se dobivaju značajna poboljšanja primjenom multivarijantnih metoda (Đorđević i sur., 2013).

Fokus u istraživanju stabilnih izotopa su omjeri izotopa vodika, ugljika, dušika, kisika, sumpora i stroncija, prikazani u Tablici 3, koji se trenutno koriste u metodama istraživanja zemljopisnog podrijetla vina, usporedbom sa već poznatim uzorcima i materijalima (Ghidini i sur., 2006; Camin i sur., 2017).

2.4.5 Maseni spektar stabilnih izotopa (IRMS)

Analiza hrane se drastično poboljšala u zadnjih desetak godina i sve veća je vjerojatnost da će krivotvorenja ili pogrešno označavanje prehrambenih proizvoda sve više doći do izražaja, kako u prehrambenoj, tako i u vinskoj industriji. Međutim, više suptilnih oblika modifikacija se pojavljuju kao rezultat želje proizvođača da povećaju svoju dobit.

Jedna od najkorisnijih tehnika koja se koristi u ispitivanjima autentičnosti hrane je maseni spektar stabilnih izotopa (IRMS). IRMS je pronašao primjenu u autentifikaciji širokog raspona prehrambenih proizvoda, posebno za otkrivanje dodanog šećera šećerne trske u voćnim

sokovima, vinima, azličitim alkoholnim pićima, medu i dodacima umjetnih aroma (Kokkinofta, 2013).

Za vrijeme fotosinteze, asimilacija ugljikovog plina u biljkama odvija se prema dva principa ovisno o tipu metabolizma: metabolizam C_3 (Calvinov ciklus) i C_4 (Hatch-Slackovput razgradnje u fotosintezi). Ova dva načina fotosinteze predstavljaju različite tipove frakcioniranja izotopa. Šećeri, proizvodi fotosinteze, kao i etanol nastao fermentacijom iz tih šećera podrijetlom iz C_4 biljaka, imaju višu razinu ^{13}C nego iz C_3 biljaka. Biljke kao što je vinova loza i šećerna repa pripadaju C_3 grupi. Šećerna trska i kukuruz pripadaju C_4 grupi. Mjerenjem sadržaja ^{13}C omogućuje se identificirati i kvantificirati šećer porijeklom iz C_4 biljaka (šećerne trske, šećerne repe i kukuruza) koji se mogu dodavati proizvodima dobivenim od grožđa (mošt i vino). Kombinacijom informacija o sadržaju ^{13}C i deuterija omogućuje kvantifikaciju mješavine dodanih šećera ili alkohola porijeklom iz biljaka C_3 i C_4 . Sadržaj izotopa ^{13}C određuje se iz ugljičnog dioksida dobivenog potpunim sagorijevanjem uzorka. Uzorak je etanol ekstrahiran iz vina, odnosno destilat koji sadrži od 92 % do 93 % masenog udjela etanola. Za ekstrakciju etanola može se primjeniti bilo koja metoda sve dok se u destilatu dobiva 98,0 do 98,5 % od ukupnog alkohola prisutnog u uzorku vina (Metoda: OIV-MA-AS312-06:R2001, International Organisation of Vine and Wine).

Analiza izotopnih omjera $^{18}O / ^{16}O$ koji se nalaze u vinskoj vodi, $^{13}C / ^{12}C$ u etanolu i minerala u vinu korištena je za analizu vina iz različitih područja Brazila. Izotopna analiza $\delta^{18}O$ vina i minerala Mg i Rb bila su najučinkovitiji za razlikovanje regija. Koristeći izotopne omjere i mineralnu analizu i analizu kao parametar razlikovanja bilo je moguće klasificirati vina s juga Brazila (Dutra, 2011).

Autentičnost 141 vina proizvedenih na Cipru dobivenih od grožđa autohtonih i drugih vinovih loza, ispitan je koristeći naprednu tehnologiju kao što je SNIF-NMR i IR-MS za određivanje izotopa stabilne i ICP spektroskopije za neke teške metale. Spektroskopske karakteristike su statistički evaluirane koristeći različite kemometrijske metode. Odnos ovisnosti omjera deuterij / vodik metilenskog mjesta u molekuli etanola (D / H) II, kao i $\delta^{18}O$ vrijednosti vinske vode, bili su najkorisniji parametri. Izotopni rezultati su omogućili kompletnu sliku o regionalnoj varijabilnosti izotopa. Pokazano je da se metoda može koristiti za istraživanje autentičnosti komercijalnih vina, kada se uspoređuju s autentičnim uzorcima iz iste regije.

Iako je korelacija stabilnih izotopa i teških metala u svrhu autentičnosti još uvijek pod istragom, preliminarni rezultati pokazuju da je metoda bila sposobna razlikovati ciparska vina uglavnom zbog vrste vinifikacije (crvene ili bijele) i sorte grožđa, a manje s obzirom na zemljopisnom podrijetlo. To se pripisuje opsegu ciparskih vinograda i njihovih sličnih klimatskih uvjeta (Kokkinofta, 2013).

Tablica 4. Prikaz dostupnih znanstvenih radova u kojima se koriste kombinacije metoda određivanja mineralnog profila vina i omjera stabilnih izotopa

Zemlja	Parametri	Metode	Vino	Autori
Brazil	Omjer stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$; Koncentracije Mg, Mn, Ca, Rb, Li.	IRMS/ AAS	Crna vina	Dutra i sur., 2013
Cipar	Omjer stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$; koncentracije teških metala- Cd, Cr, Ni, Pb	SNIF-NMR/ ICP/ IRMS	Crna i bijela vina	Kokkinofta i sur., 2014
Rumunjska	Omjer stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$; koncentracije As, Be, Bi, Co, Cr, Cu, K, Li, In, Tl, Se, Rb, V, U, Mg, Ni, Ba, Al, Cd, Fe, Ag I Zn	IRMS/ ICP- MS	Crna i bijela vina	Dinča i sur., 2016
Kina	Omjer izotopa ^{18}O ; koncentracije Ca, Al, Mg, B, Fe, K, Rb, Mn, Na, P, Co, Ga, As, Sr	IRMS/ ICP-MS/ ICP-OES	Crna i bijela vina	Fan sur., 2018

Proizvodnja i konzumacija pjenušavih vina se znatno povećala u posljednjim godinama. Uz povećanu potražnju pojavljuje se potreba za provjerom autentičnosti pjenušavog vina, jer praksa dodavanja CO_2 u pjenušava vina nije dopuštena. Kontrola se može vršiti određivanjem koncentracije ^{13}C iz CO_2 , jer šećer dodan tijekom druge fermentacije određuje izotopnu vrijednost CO_2 , u skladu s procesom razgradnje. Iz tog razloga, cilj istraživanja iz 2016. godine bio je usporediti odnos između vrijednosti ^{13}C mirnih i pjenušavih vina, kako bi se postavile

granične vrijednosti za kontrolu karbonizacije. Analizirano je 38 vina koja su dobivena laboratorijskom mikroviniifikacijom i 59 uzoraka komercijalnih pjenušavih vina IRMS metodom. Najniža vrijednost prirodnog ^{13}C u mirnom vinu je bila -24,7 ‰, može se pretpostaviti da su niže vrijednosti indikator industrijskog dodatka CO_2 . Među komercijalnim pjenušavim vinima iz Južne Amerike ocijenjenih u ovoj studiji, 10% od uzoraka pokazalo je znakove karbonizacije (Leonardelli i sur., 2016).

Uočeno je da noviji znanstveni radovi kombiniraju rezultate mineralnog profila vina sa IRMS tehnikom određivanja stabilnih izotopa za utvrđivanje zemljopisnog podrijetla uzoraka vina. U Tablici 4. su prikazani neki znanstveni radovi koji su koristili kombinirane metode određivanja mineralnog profila vina i omjera stabilnih izotopa.

2.5 UTVRĐIVANJE ZEMLJOPISNOG PODRIJETLA VINA

U vinogradarstvu, pojam *terroir* (franc. *terroir*) se odnosi na utjecaj koji kompletna prirodna okolina vinograda ima na krajnji proizvod – vino, odnosno na senzorske osobine vina uvjetovane okolišem grožđa i stoga predstavlja važan opis povezanosti vina i njihovog podrijetla. Obuhvaća i prirodne čimbenike tla, klime i topografije, te ljudske uloge u upravljanju vinogradima (Van Leeuwen i Seguin, 2006). Tlo je jedan od najvažnijih čimbenika *terroira*, što ga čini od posebnog interesa za procjenu utjecaja na okoliš na mineralni sastav vinove loze. Mineralni sastav vina odražava okolinu u kojoj se uzgajala vinova loza (Bertoldi i sur., 2011; Pessanha i sur., 2010). Kao posljedica toga, na proizvod grožđa (tj. konzumno grožđe, sok, vino) utjecat će sastav tla. Najvažnije karakteristike tla koje utječu na mineralnu sastavu vinove loze su fizička i kemijska svojstva tla, poput tipa tla, strukture tla, dubine tla, plodnosti, temperature i vlažnosti, pH-vrijednost, razdioba minerala unutar tla, te sadržaj Ca (Likar i dr, 2015). Osim sastava tla, biotski čimbenici kao što su sorta grožđa i podloga na kojoj raste, kao i mikrobiom tla također mogu imati duboke učinke na dostupnost i prihvaćanje minerala iz tla (Wooldridge i sur., 2010; Amorós i sur., 2011).

Odnosi između okoliša i prehrambenog lanca čvrsto su povezani i sa geološkim čimbenicima kao što su petrografija, mineralnost stijena, krajolik i klima, kao i čimbenici koji su specifično korelirani s kemijom tla i koji se tiču metoda prijenosa elemenata od stijena do tla, pa dalje do biljaka i ljudskih organizama. Iako se vinova loza može prilagoditi mnogim vrstama tla, ono značajno utječe na grožđe i sastav vina, što utječe na okus konačnog proizvoda. Vinova loza uzgojena na jako propusnim tlima i pod uvjetima okoline s velikim dnevnim razlikama temperature ima za rezultat brži proces fotosinteze, više koncentracije šećera te jači intezitet i osjet na nepcu (Xu i sur., 2009; Li i sur., 2012). Stoga, različite vrste tla mogu dovesti do odstupanja u sastavu vina, čak i pod istim klimatskim uvjetima. Krško područje, odnosno tereni izgrađene od okršanih karbonatnih stijena, karakterizira visoka propusnost zbog mnogobrojnih pukotina različitih dimenzija kojima protječe voda u složenim podzemnim mrežama. Relativno jednostavno zagađenje podzemnih voda i njihovih izvora, s obzirom na dinamiku napajanja u krškom području predstavlja značajan problem. Za Republiku Hrvatsku je to važno budući da oko 48% njenog teritorija čini krš (Mandić i sur., 2007).

Likar i suradnici su utvrdili varijabilnost mineralnog sastava vinove loze s obzirom na prostorni položaj u proizvodnim vinogradima duž istočne obale Jadrana, te je utvrđena i uspoređena razlika između konvencionalnog i održivog upravljanja vinogradima. Faktorska analiza otkriva tri čimbenika s jakim opterećenjem K, P i Mn, koji objašnjavaju 67% ukupne varijance u mineralnom sastavu. Varijacije ova tri elemenata mogu se objasniti abiotičkim i biotičkim parametrima tla, s koncentracijama K, Fe i Cu, sadržajem organske tvari i vezikularna kolonizacija koje pokazuju najsnažnije učinke na mineralni sastav vinove loze. Osim toga, analiza podataka o aminokiselinskom sastavu pokazuje značajne razlike između različito održavanih vinograda, s povećanom bioakumulacijom P i K u održivim vinogradima, dok je koncentracija Zn povećana u konvencionalnim vinogradima. Klastiranje nije nalikovalo grupiranju minerala u listovima loze prema općoj potrebi vinove loze, već prema njihovim interakcijama u vinogradu ili tlu i njihovim svojstvima. Ovi podatci potvrđuju važnost upravljanja tlom i vinogradarstva u konceptu teroara (Likar i sur., 2015).

2.5.1 Vinogradarske regije u Hrvatskoj

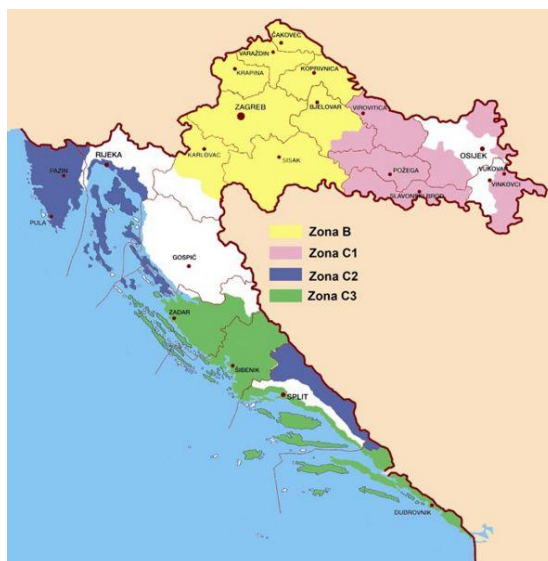
Hrvatska se vinogradarski ugrubo dijeli u tri regije: Istočnu kontinentalnu, Zapadnu kontinentalnu i Primorsku Hrvatsku (Pravilnik o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze, NN 74/2012). Ova područja se odlikuju zemljopisnim, geološkim, agroekološkim, ampelografskim, gospodarskim i drugim posebnostima.

Od krajnjeg sjeverozapada Hrvatske koji je pod utjecajem srednjoeuropske, te istočnih predjela uz Dunav i obronke Fruške gore s izrazitim utjecajem panonske klime, pa do Istre na sjeveru i dubrovačke općine do ulaska u Bokokotorski zaljev na jugu jadranskog priobalja, s izrazitim utjecajem mediteranske klime, nalazi se velik broj vinogradarskih područja koja se međusobno znatno razlikuju. Te razlike su glavni razlog zbog kojeg se područje Hrvatske dijelimo u pet vinogradarskih klimatskih zona, a iskazuju se podacima o srednjoj godišnjoj temperaturi i zbroju (sumi) topline, oscilaciji temperatura i pojavi kasnih proljetnih i ranih jesenskih mrazeva, količini i rasporedu oborina, vlažnosti zraka i drugim pojavama poput magle, tuče, rose i snijega, učestalosti vjetrova i njihova intenziteta, broja vedrih dana itd. Prava je rijetkost na tako malom prostoru susresti toliku raznovrsnost sorata, kategorija i tipova vina, a upravo to Republiku Hrvatsku i u svjetskim mjerilima svrstava u iznimno zanimljivo vinogradarsko i vinarsko područje (Fazinić, 1997).

Prema pravilniku o vinogradarskim područjima (NN 74/2012) vinogradarsko područje Republike Hrvatske se dijeli na zone, regije, podregije, vinogorja i vinogradarske položaje.

Zemljopisno područje uzgoja vinove loze Hrvatske pripada sljedećim vinorodnim zonama proizvodnje:

- **Zona B:** Moslavina, Prigorje – Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje – Međimurje.
- **Zona CI:** Hrvatsko Podunavlje i Slavonija.
- **Zona CII:** Hrvatska Istra, Hrvatsko primorje, Dalmatinska zagora.
- **Zona CIII:** Sjeverna Dalmacija i Srednja i Južna Dalmacija.



Slika 1. Vinogradarske zone u Republici Hrvatskoj prema A.J. Winkleru (dostupno online:

<http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=Datoteka:ZoneWinkler.jpg>, 14.05.2018.)

2.5.2 Zaštićene oznake izvornosti (ZOI)

Zbog posebnosti zemljopisnog položaja, klimatskih uvjeta i bogate tradicije, Republika Hrvatska posjeduje veliki broj autohtonih prehrambenih proizvoda koji zbog svojih specifičnosti uspješno konkuriraju na domaćem i stranim tržištima. Pojedini proizvodi su postali prepoznatljivi po kvaliteti, kao i područja u kojima se oni proizvode. Zaštita proizvoda se razvila kao potreba zbog više cjenovne kategorije autohtonih proizvoda, stvaranja identiteta i prepoznatljivosti, izravne veze proizvoda s određenim područjem koja daje dodatnu vrijednost i prepoznatljivost tom području, te osnivanja interesnih udruženja u svrhe zajedničkog nastupa na tržištu.

Nacionalni postupak zaštite naziva ZOI, ZOZP, ZTS poljoprivrednog ili prehrambenog proizvoda se provodi u skladu sa Zakonom o poljoprivredi (NN 30/15) i Pravilnikom o zaštićenim oznakama izvornosti, zaštićenim oznakama zemljopisnog podrijetla i zajamčeno tradicionalnim specijalitetima poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda (NN 65/15).

Zaštićene oznake izvornosti vina u Hrvatskoj na razini Europske Unije su: Dalmatinska zagora, Dingač, Hrvatska Istra, Hrvatsko Podunavlje, Hrvatsko primorje, Istočna kontinentalna Hrvatska, Moslavina, Plešivica, Pokuplje, Prigorje-Bilogora, Primorska Hrvatska, Sjeverna Dalmacija, Slavonija, Srednja i Južna Dalmacija, Zagorje-Međimurje i Zapadna kontinentalna Hrvatska. Trenutno su u obradi dva zahtjeva u postupku registracije na nacionalnoj razini - Muškati Momjanski i Ponikve.

3 EKPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Uzorci vina

U ovom su radu prikazani rezultati istraživanja koje je obuhvatilo uzorke od 20 vina (Tablica 5). Tri Hrvatske vinogadarske regije su zastupljene sa najmanje jednom vinskom zonom - Istočna kontinentalna Hrvatska je predstavljena zonom B, Zapadna kontinentalna Hrvatska zonom CI, a Primorska Hrvatska- zonama CII i CIII. Zone su zastupljene sa jednom podregijom predstavnikom zone: B-Plešivica, CI- Slavonija, CII- Hrvatska Istra, CIII- Srednja i Južna Dalmacija.

Sva vina korištena u istraživanju su imala definiranu zemljopisnu oznaku izvornosti, a korištena su isključivo sortna vina proizvedena od jedne sorte grožđa (100%). Zastupljene su sorte: graševina, rajnski rizling, malvazija istarska, cabernet sauvignon, plavac mali, plavac mali crni i muškati žuti. U Tablici 3. je prikazana podjela uzoraka s obzirom na regiju i zonu, te ZOI i sortu, zajedno sa oznakom uzorka korištenom pri obradi podataka.

3.1.2 Kemikalije

- HNO₃ (CAS: 7697-37-2)
- Ultračista voda provodljivosti 18MΩ/cm
- Argon (čistoće 99,999%)
- Dušik (čistoće 99,999%)
- Krom (Acros organics, 195911000)
- Bor (Acros organic, 195861000)
- Zinc (Perkin Elmer Pure)
- Kalij (Perkin Elmer Pure)

- Stroncij (Reagecon, 1000ug/ml u 2-5% HNO₃)
- Barij (Reagecom, Ba u 2-5 % HNO₃)

Tablica 5. Podjela uzoraka s obzirom na regiju, zonu, ZOI i sortu vinove loze.

Regija	Zona	ZOI	Sorta
ISTOČNA KONTINENTALNA HRVATSKA	B	Plešivica	Rajnski Rizling
			Rajnski Rizling
			Rajnski Rizling
			Graševina
			Graševina
ZAPADNA KONTINENTALNA HRVATSKA	CI	Slavonija	Graševina
			Rajnski Rizling
			Graševina
			Graševina
			Graševina
PRIMORSKA HRVATSKA	CII	Hrvatska Istra	Malvazija Istarska
			Muškat Žuti
			Malvazija Istarska
			Malvazija Istarska
			Cabernet Sauvignon
	CIII	Srednja i Južna Dalmacija	Plavac Mali
			Plavac Mali
			Plavac Mali Crni
			Plavac Mali Crni
			Plavac Mali Crni

3.1.3 Instrumenti i pribor

- Aparatura za automatizirani sustav za ekstrakciju etanola (ADCS)
- Aparatura za automatsko titriranje po Karl Fischeru-u
- Spektrometar optičke emisije induktivno spregnute plazme, Optima 2000 DV, Perkin Elmer, opremljen peristaltičkom pompom za unošenje uzoraka i staklenom komorom po Meinhardu za prevođenje uzorka u oblik aerosola. Spektrometrom se upravlja putem softwera WinLab 32, Perkin Elmer
- Spektrometar omjera masa stabilnih izotopa IRMS Delta V Plus sa automatskim izmjenjivačem uzoraka za Flash EA AI 1310. Analizator elemenata povezan sa spektrometrom masa u kojem se u reaktoru odvija sagorijevanje uzorka (etanola) te se u kromatografskoj koloni razdvajaju pikovi referentnih plinova te analiziranih plinova; primjenjuje se za metodu određivanja $\delta^{13}\text{C}$ u etanolu vina FLASH EA. Program kojim se upravlja, Isodat 3.0 softver za upravljanje, prikupljanje i evaluaciju podataka, integralni je dio IRMS sustava

3.2 METODE

3.2.1 Automatizirani sustav za ekstrakciju etanola (ADCS)

ADCS sustav za destilaciju služi za ekstrakciju etanola iz vina ili drugih proizvoda od grožđa u uvjetima bez dodatne izotopne frakcionacije. Cadiot kolona služi da se iz uzorka ekstrahira između 96 – 98,5 % etanola vina bez dodatnog frakcioniranja izotopa uz dobivanje destilata alkoholne jakosti do 95 vol%.

Svi pripremni postupci moraju biti provedeni bez značajnijeg gubitka etanola isparavanjem, što bi promijenilo izotopni sastav uzorka. Ovako pripremljen destilat služi za određivanje omjera izotopa deuterija tehnikom SNIF-NMR kao i za određivanje omjera izotopa ugljika $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tehnikom IRMS. ADCS sustav automatizira cijeli proces, te potpuno kontrolira destilaciju i preko softvera omogućuje pohranjivanje i obradu rezultata (Metoda:OIV-MA-AS311-05, Compendium of international analysis of methods).

➤ Destilacija

200 ml homogenog uzorka vina poznate alkoholne jakosti ulije se u tikvicu za destilaciju te koja se spoji na aparaturu. Također se spoji i prethodno odvagana tikvica za prihvatanje destilata, kako je prikazano na Slici 2. Hlađenje se provodi tekućom vodom kroz povratno hladilo s konstantnim omjerom refluksa kod nivoa kondenzatora. Destilacija se odvija pri 78,0 - 78,2 °C. Ako temperatura prijeđe 78,5°C, prikupljanje destilata se zaustavlja na 5 minuta. Kad se temperatura vrati na 78 °C, nastavlja se prikupljanje destilata do 78,5 °C, te se taj postupak nastavlja uz održavanje konstantne temperature. Potpuna destilacija traje oko dva sata. Na ovaj način se omogućuje da 98-98,5 % ukupnog alkohola u uzorku vina prijeđe u destilat, koji tada ima jakost od 92 do 93 % masenog udjela etanola (95 vol %).

Izmjeri se masa prikupljenog destilata s točnošću ($\pm 0,1$ g). Da bi se izbjeglo frakcioniranje izotopa, destilat se mora do analize čuvati u hermetički zatvorenoj kivetu. Homogeni ostatak nakon destilacije čuva se u tikvici i predstavlja vodu vina. Omjer izotopa u ostatku nakon destilacije također se može mjeriti po potrebi.



Slika 2. Postavljena aparatura za automatsku destilaciju (Osobna fotografija)

3.2.2 Automatski titrator po Karl Fischer-u

Iskorištenje destilacije određuje se određivanjem vode u destilatu titracijom po Karl Fischer-u, aparaturom koja je prikazana na Slici 3.. Određivanje vode Karl Fischer-ovom titracijom je kemijska metoda za određivanje vode u različitim medijima, a temelji se na specifičnoj i kvantitativnoj reakciji između vode sadržane u uzorku i Karl-Fischer-ovog reagensa koji se sastoji od joda, SO_2 , piridina i metanola (stehiometrijska reakcija između jednog mola vode i jednog mola joda).

Kod primjene ove metode provodi se titracija uzorka sa Karl Fischer-ovim reagensom do pojave slobodnog joda, koji označava kraj titracije (sve dok je voda prisutna troši se jod iz Karl Fischer-ovog reagensa).

➤ Titracija

U titracijsku čašicu se doda oko 60 mL svježeg otapala tako da je elektroda uronjena. Ta količina otapala je dovoljna za oko 5 titracija. Zatim se titrira s jodom (predtitracija) da se neutralizira voda prisutna u otapalu tako da kad se doda uzorak titracija počinje od nule. Nakon toga se mora provjeriti količina vode koja ulazi u čašicu za titraciju, taj postupak se zove “određivanje drifta”. Titriranje uzorka se provodi dodavanjem $\pm 0,2$ mL uzorka se injekcijom u čašicu.

Vrijednost mase uzorka unosi se u softver za izračun prisutne vode.



Slika 3. Aparatura za Karl-Fischer titraciju (osobna fotografija)

3.2.3 Multielementarna metoda određivanja elemenata

Tehnikom ICP-OES određen je sadržaj Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mo, Mn, Na, Pb, Rb, Sn, Sr, V i Zn u vinima na uređaju Optima DV 2000, Perkins Elmer. Za identifikaciju pojedinih elemenata primjenjene su valne duljine koje su karakteristične za svaki element, a za kvantifikaciju je provedena integracija površine ispod pika sa određenim brojem točaka integracije po piku (Bukovčan, 2007).

➤ Priprema uzorka:

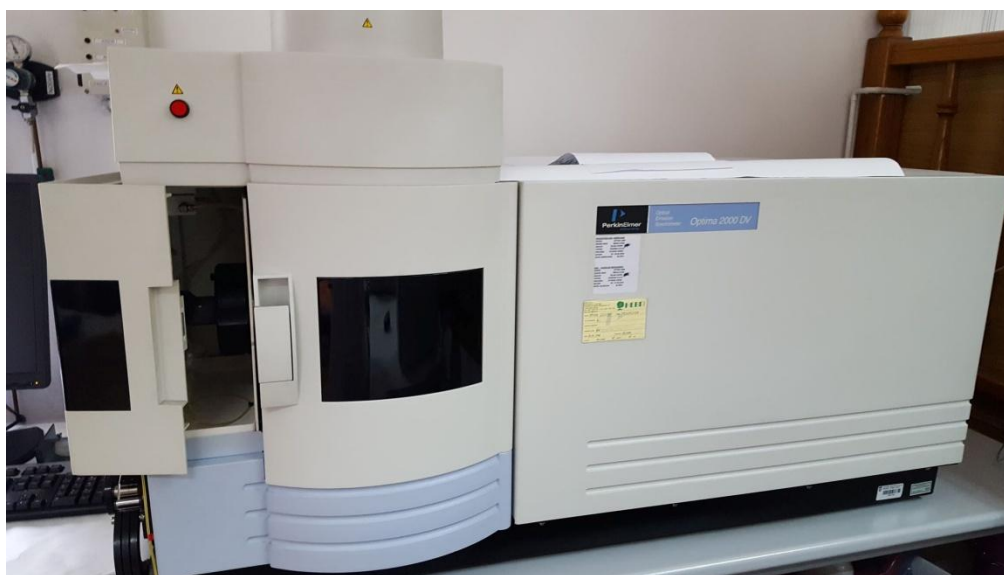
Uzorak vina bez etanola, nakon destilacije za analizu izotopa, je potrebno dobro promiješati na vortex-u i profiltrirati jedamput ili dva puta, po potrebi. Najčešće je potrebno razrijediti uzorak dodavanjem 2% (v/v) HNO_3 u omjeru 1:1.

Postavke spektrometra optičke emisije induktivno spregnute plazme koje uključuju glavni i pomoćni protok argona za održavanje plazme, te protok za raspršivanje uzorka dane su u tablici 6. Tablica 6. također sadrži i navode za potrebnu snagu generatora radiofrekvencije,

frekvencije elektromagnetskog polja, te brzine uvođenja uzorka u instrument pomoću peristaltičke pumpe.

Tablica 6. Postavke instrumenta ICP-OES, Optima 2000 DV, Perkin-Elmer, Connenticut, SDA

Parametar		Vrijednost
Protok Ar	Glavni	15 L/min
	Pomoćni	0,2 L/min
	Za raspršivanje uzorka	0,8 L/min
Snaga generator		1300 W
Frekvencija		40 MHz
Brzina unosa uzorka		1,5 mL/min



Slika 4. Fotografija instrumenta ICP-OES, Optima 2000 DV, Perkin-Elmer, Connenticut, SAD (osobna fotografija)

3.2.4 Spektrometar masa omjera stabilnih izotopa (IRMS)

Spektrometrija masa omjera izotopa (IRMS) je omogućila određivanje relativnog sadržaja ^{13}C koji se prirodno sadržan u CO_2 sa internom točnošću od 0,05 ‰ ili izraženo kao relativna vrijednost. Ovdje je interna točnost definirana kao razlika između dva mjerenja istog uzorka CO_2 . Spektrometar masa koji se koristi za mjerenje izotopnih omjera je opremljen trostrukim kolektorom za simultano mjerenje intenziteta $m/z = 44, 45$ i 46 . Spektrometar masa omjera stabilnih izotopa korišten u analizi je model IRMS Delta V Plus s automatskim izmjenjivačem uzoraka za za Flash EA AI 1310.

Analizator elemenata (EA) AI 1310 korišten u analizi je uređaj u kojem se odvija sagorijevanje uzorka u kojem se etanol kvantitativno prevodi u ugljični dioksid i u kojem se eliminiraju svi ostali produkti sagorijevanja uključujući vodu, bez frakcioniranja izotopa (izotopna frakcionacija: obogaćivanje jednog izotopa u relativnom odnosu prema drugom u kemijskom ili fizikalnom procesu). Analizator elemenata zajedno sa spektrometrom masa čini integrirani sustav s kontinuiranim protokom helija (Metode: OIV-MA-AS311-05:R2011, International Organisation of Vine and Wine; OIV-MA-AS312-06:R2001, International Organisation of Vine and Wine).

➤ *Priprema uzorka*

Pripremljeni uzorak se smjesti u odgovarajuću kapsulu ukoliko se radi sa izmjenjivačem uzoraka za krutine, ili se spremi u odgovarajuće zapečaćene kapsule za injektiranje pomoću izmjenjivača uzoraka za tekućine.

Kapsule se moraju pažljivo zatvoriti pincetom. Za svaki uzorak pripreme se po dvije kapsule ili vijale. Na početku i na kraju serije uzoraka sistematično se moraju umetnuti radni referentni materijali. U seriju uzoraka također se ravnomjerno moraju umetnuti i uzorci za provjeru.

U tablici 7. su prikazane prihvatljive početne razine uvjeta instrumenta kako bi mogli započeti s analizom.

Tablica 7. Prihvatljive vrijednosti temeljnih uvjeta za početak analize na instrumentu IRMS Delta V Plus

	voda	zrak	CO ₂
ioni (m/z)	16 (O)	28 (N ₂)	28 (CO)
	17 (OH)	32 (O ₂)	44 (CO ₂)
	18 (H ₂ O)	40 (Ar)	
korak magneta	6400-7000	9000/9800/11000	9000/11800
maksimalni dozvoljeni intenzitet pika	1 V	30 mV za Ar	50 mV za CO ₂
omjeri intenziteta između tri pika	1:2:4	4:1:0,7	



Slika 5. Fotografija radne jedinice sa spojenim IRMS Delta V Plus instrumentom (osebna fotografija)

4 REZULTATI I RASPRAVA

U ovome je radu analizirano ukupno 20 uzoraka vina u kojima su određeni 22 makro i mikroelementa (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mo, Mn, Na, Pb, Rb, Sn, Sr, V i Zn), te omjer ugljikovih izotopa (^{12}C i ^{13}C).

Rezultati prikazani u Tablicama 8, 9, 10 i 11 su dobiveni mjerenjima koncentracija mikroelementa i predstavljaju mineralni profil uzoraka vina, a rezultati prikazani u Tablici 13 omjere ^{12}C i ^{13}C izotopa.

4.1 REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Tablica 8 . Mineralni profil uzoraka vina, ZOI- Plešivica

Sorta	Rajnski rizling	Rajnski rizling	Rajnski rizling	Graševina	Graševina
Al (mg/L)	0,481	0,480	0,130	0,132	0,163
As (µg/L)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B (mg/L)	3,495	2,915	3,145	2,150	3,140
Ba (mg/L)	0,077	0,060	0,056	0,064	0,355
Ca (mg/L)	78,0	82,0	83,5	90,0	136,0
Cd (µg/L)	0,535	0,000	0,357	2,710	0,493
Co (µg/L)	3,42	2,93	3,71	7,00	28,50
Cr (µg/L)	12,65	27,70	13,35	13,35	20,35
Cu (mg/L)	0,052	0,071	0,125	0,119	0,166
Fe (mg/L)	1,075	0,770	1,535	1,140	0,380
K (mg/L)	695	505	555	745	1035
Li (µg/L)	7,300	6,050	1,905	2,255	25,850
Mg (mg/L)	57,00	57,50	56,00	68,50	111,50
Mn (µg/L)	0,436	0,347	0,220	0,287	3,190
Mo (µg/L)	3,085	2,145	2,450	5,000	5,500
Na (mg/L)	3,850	3,700	3,965	7,800	5,900
Pb (µg/L)	25,60	24,20	23,40	66,00	64,00
Rb (mg/L)	0,640	1,030	0,740	0,430	0,865
Sn (mg/L)	0,004	0,017	0,006	0,000	0,000
Sr (mg/L)	0,349	0,304	0,188	0,345	0,665
V (µg/L)	57,5	57,0	56,5	77,5	118,5
Zn (mg/L)	0,301	0,200	0,610	0,550	0,840

Tablica 9. Mineralni profil uzoraka vina, ZOI- Slavonija

Sorta	Graševina	Rajnski rizling	Graševina	Graševina	Graševina
Al (mg/L)	0,164	0,765	0,765	0,128	0,171
As (µg/L)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B (mg/L)	2,450	2,330	1,660	1,855	1,170
Ba (mg/L)	0,101	0,182	0,147	0,094	0,120
Ca (mg/L)	68,0	129,0	98,5	64,0	55,0
Cd (µg/L)	1,550	0,000	1,650	0,000	0,000
Co (µg/L)	7,00	9,00	7,50	4,13	5,75
Cr (µg/L)	19,20	55,50	16,45	15,05	8,60
Cu (mg/L)	0,122	0,160	0,147	0,057	0,261
Fe (mg/L)	0,249	1,350	1,750	1,175	0,870
K (mg/L)	645	770	535	419	428
Li (µg/L)	7,350	5,900	3,705	10,600	20,200
Mg (mg/L)	85,00	85,00	96,00	61,50	63,50
Mn (µg/L)	0,555	1,335	1,065	1,095	1,710
Mo (µg/L)	5,000	8,500	4,000	4,515	3,595
Na (mg/L)	5,000	12,25	10,050	4,340	5,050
Pb (µg/L)	68,50	80,50	70,00	41,25	36,15
Rb (mg/L)	1,290	0,366	0,980	0,970	0,590
Sn (mg/L)	0,000	0,012	0,000	0,029	0,027
Sr (mg/L)	0,336	0,525	0,436	0,291	0,252
V (µg/L)	89,5	92,5	101,0	57,5	59,5
Zn (mg/L)	0,550	0,640	0,770	0,397	0,429

Tablica 10. Mineralni profil uzoraka vina, ZOI- Istra

Sorta	Malvazija Istarska	Muškat žuti	Malvazija Istarska	Malvazija Istarska	Cabernet Sauvignon
Al (mg/L)	0,161	0,580	0,935	0,344	0,293
As (µg/L)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B (mg/L)	3,430	5,050	3,280	3,370	6,950
Ba (mg/L)	0,054	0,081	0,232	0,093	0,105
Ca (mg/L)	72,5	83,0	73,0	83,5	75,0
Cd (µg/L)	2,010	1,960	1,940	1,990	1,120
Co (µg/L)	9,50	11,00	11,50	20,00	6,50
Cr (µg/L)	18,05	27,60	15,00	31,75	17,95
Cu (mg/L)	0,152	0,219	0,110	0,141	0,102
Fe (mg/L)	0,515	0,438	1,170	1,275	2,510
K (mg/L)	670	1475	985	765	1465
Li (µg/L)	1,940	9,900	1,600	2,130	1,500
Mg (mg/L)	87,00	61,00	97,00	69,50	73,00
Mn (µg/L)	0,565	0,860	1,375	1,720	1,105
Mo (µg/L)	5,500	8,500	6,000	8,000	4,500
Na (mg/L)	5,700	5,250	22,350	5,500	14,200
Pb (µg/L)	58,00	91,50	58,50	70,00	68,00
Rb (mg/L)	0,910	2,040	1,070	1,035	1,415
Sn (mg/L)	0,023	0,023	0,041	0,039	0,029
Sr (mg/L)	0,331	0,284	0,439	0,248	0,302
V (µg/L)	90,00	65,5	98,0	74,0	81,0
Zn (mg/L)	0,550	0,480	0,486	0,545	0,129

Tablica 11. Mineralni profil uzoraka vina, ZOI- Srednja i Južna Dalmacija

Sorta	Plavac mali 1	Plavac mali 2	Plavac mali crni 1	Plavac mali crni 2	Plavac mali crni
Al (mg/L)	0,328	0,357	0,243	0,496	0,574
As (µg/L)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B (mg/L)	4,130	4,710	3,510	4,340	4,020
Ba (mg/L)	0,060	0,082	0,074	0,110	0,065
Ca (mg/L)	96,5	94,5	84,9	100	83,7
Cd (µg/L)	2,210	2,710	0,000	0,000	0,000
Co (µg/L)	5,50	8,50	2,00	4,00	1,00
Cr (µg/L)	2,08	24,50	10,40	23,40	14,80
Cu (mg/L)	0,242	0,107	0,127	0,095	0,149
Fe (mg/L)	4,570	1,115	0,875	2,140	3,770
K (mg/L)	1175	1150	1210	866	990
Li (µg/L)	1,915	2,265	1,920	3,270	1,660
Mg (mg/L)	98,00	108,00	109,00	111,00	109,00
Mn (µg/L)	0,775	1,030	0,63	1,130	0,768
Mo (µg/L)	6,000	6,500	2,000	2,000	3,000
Na (mg/L)	7,650	9,500	5,810	20,100	6,480
Pb (µg/L)	71,50	72,50	22,80	16,80	38,00
Rb (mg/L)	0,810	1,115	0,988	1,870	1,030
Sn (mg/L)	0,036	0,045	0,076	0,088	0,082
Sr (mg/L)	0,335	0,525	0,339	0,497	0,324
V (µg/L)	99,0	108,0	110,0	111,0	111,00
Zn (mg/L)	0,392	0,575	0,604	1,580	0,866

Tablica 12.Prosječne vrijednosti koncentracije minerala po ZOI

Sorta	Plešivica	Slvonija	Hrvatska istra	Srednja i južna Dalmacija
Al (mg/L)	0,277	0,399	0,463	0,400
As (µg/L)	0	0	0	0
B (mg/L)	2,969	1,893	4,416	4,142
Ba (mg/L)	0,122	0,129	0,086	0,078
Ca (mg/L)	93,9	82,9	77,4	91,9
Cd (µg/L)	0,819	0,640	1,804	0,984
Co (µg/L)	9,11	6,68	11,70	4,2
Cr (µg/L)	17,48	22,96	22,07	18,79
Cu (mg/L)	0,107	0,149	0,145	0,144
Fe (mg/L)	0,980	1,079	1,182	2,494
K (mg/L)	707	559	1072	1078
Li (µg/L)	8,272	9,551	3,414	2,206
Mg (mg/L)	70,10	78,20	77,5	107,00
Mn (µg/L)	0,896	1,152	1,125	0,868
Mo (µg/L)	3,636	5,122	6,500	3,900
Na (mg/L)	5,043	7,338	10,600	9,908
Pb (µg/L)	40,64	59,28	56,60	44,32
Rb (mg/L)	0,741	0,839	1,294	1,163
Sn (mg/L)	0,005	0,014	0,031	0,065
Sr (mg/L)	0,370	0,368	0,321	0,404
V (µg/L)	73,40	80,00	81,70	107,80
Zn (mg/L)	0,819	0,640	1,804	1,960

Tablica 13. Omjer izotopa ugljika po ZOI

ZOI	Plešivica	Slavonija	Istra	Srednja i Južna Dalmacija
13/12C	-26,06	-28,19	-27,13	-25,57
	-29,02	-28,10	-27,16	-25,17
	-29,07	-26,33	-26,20	-25,00
	-28,59	-27,05	-27,93	-25,47
	-28,49	-28,37	-26,19	-25,45
PROSJEČNA VRIJEDNOST	-28,25	-27,61	-26,92	-25,33

4.2 MINERALNI PROFIL UZORAKA VINA

Određene su koncentracije 22 elemenata u vinima koji su korišteni kao deskriptori kako bi odredili kriterije za klasifikaciju i diferencijaciju uzoraka na osnovu zemljopisnog porijekla. Analizirani elementi se mogu podjeliti na: makroelemente ($c > 10\text{mg/L}$), mikroelemente ($c > 10\mu\text{g/L}$) i elemente u tragovima ($c < 10\mu\text{g/L}$). Pregledom rezultata vidljivo je da su makroelementi u vinu K, Ca, Mg i Na, najveće koncentracije mikroelemenata imaju Al, B, Ba, Cu, Fe, Pb, Rb, Sr i Zn, dok ostali određivani elementi predstavljaju elemente u tragovima (Tablice 8., 9., 10., i 11.).

U svih 20 uzoraka udio određivanih elemenata nije prelazio granice (Tablica 2.) određene zakonskom regulativom Republike Hrvatske (Pravilnik o vinu NN, 34/95.), iz čega se može proizvesti zaključak da je primjena mineralnih i organskih gnojiva, anorganskih pesticida i drugih pomoćnih tvari u vinogradarskoj i vinarskoj praksi unutar zakonski propisanih ograničenja. Također se može zaključiti da nema onečišćenja okoliša iz ostalih izvora, kao što su industrijska onečišćenja, otpadne vode i ispušni plinovi (Bukovčan, 2009). U svim ispitanim uzorcima, koncentracija arsena je bila ispod praga detekcije, što je indikator da tijekom obrade vinograda nisu korišteni pesticidi koji u svome sastavu imaju arsen. Uporedbom sa istraživanjem iz 2009. kada je najviša koncentracija As u uzorku bila $0,034\text{ mg/L}$, a prosječna vrijednost 0.005 mg/L (Bukovčan, 2009), vidljivo je da su vinari u Hrvatskoj u potpunosti iz upotrebe izbacili pesticide koji sadrže arsen. Promatranjem rezultata dobivenih za kamdij (Tablice 8, 9, 10, i 11) u hrvatskim vinima možemo zaključiti, da je kao i kod As, udio toliko nizak da ne predstavlja opasnost u smislu toksičnog učinka.

Pregledom dostupne znanstvene literature najbolju karakterizaciju vinarskih regija u Hrvatskoj predstavljaju elementi - Cd, Fe, Cr, K, Mg, Ca, Pb i Co, i to za bijela vina iz kontinentalnih hrvatskih regija. Nadalje, pretpostavka je da bijela vina priobalnog dijela Hrvatske karakteriziraju koncentracije elemenata- Na, Sn, Ni, Al, Cu i Zn. S druge strane, pokazalo se da su elementi poput K, Ca, Mg, Na i Co karakteristični za crvena vina podrijetlom iz kontinentalne Hrvatske, dok su Cd, Ni, Cr, Zn i Al karakteristični za crna vina Primorske Hrvatske (Leder, 2015).

Pregledom rezultata za koncentraciju elemenata po ZOI vidljivo je da se prosječna koncentracija Al kretala od 0,28 mg/L u Plešivici do 0,46 mg/L u Istri, što ne predstavlja značajniju razliku, te se Al ne može koristiti kao deskriptor. Taj podatak se razlikuje od podataka dostupnih za rumunjska vina, gdje se koncentracija Al pokazala kao pouzdan deskriptor u ispitivanju kromatografskih metoda za utvrđivanje autentičnosti vina sa zemljopisnim oznakama izvornosti (Geana, 2016).

Male koncentracijske razlike Ba, s prosječnim koncentracijama od 0,07 mg/L u Srednjoj i Južnoj Dalmaciji do 0,12 mg/L u Plešivici, ukazuju da je u ovom istraživanju, kao i za Al, mala vjerojatnost da bude pouzdan deskriptor zemljopisnog podrijetla. Istraživanja mineralnog profila španjolskih “fino” vina u svrhu određivanja zemljopisnog podrijetla su pokazala slične koncentracije Ba, od 0,03 mg/L do 0,12 mg/L i smatra se nepouzdanim deskriptorom (Alvarez i sur., 2011). Unatoč tome isti autori navode da je statističkom obradom potataka moguće povećati značajnost Ba kao deskriptora zemljopisnog podrijetla. U istraživanjima na australskim vinima, također provedenima ICP metodom, Ba je opisan kao pouzdan deskriptor nakon obrade rezultata istraživanja multivarijatnom statističkom obradom podataka (Martin i sur., 2012).

Prosječna koncentracija Ca se kretala od 77,4 mg/L u Istri, do 93,9 mg/L u Plešivici, te je vidljivo da vina iz Istre imaju niže koncentracije Ca, što se može iskoristiti kao deskriptor zemljopisnog podrijetla. Prosječna koncentracija Ca za brazilska vina je 62,06 mg/L (Dutra i sur., 2013), turska 44,118 do 42,195 mg/L (Aydin i sur., 2010), te od 11,2 mg/L do 14,5 mg/L za rumunjska vina (Geana i sur., 2016). U usporedbi sa navedenim svjetskim vinima, specifičnost hrvatskih vina je viša koncentracija Ca, s prosječnom vrijednosti od 86,53 mg/L.

Prosječne koncentracije Co su se kretale od 4,2 µg/L u Srednjoj i Južnoj Dalmaciji, do 11,70 µg/L u Istri, te Mo od 3,64 µg/L u Plešivici do 6,50 µg/L u Istri, što je niže nego u literaturnim navodima istraživanja turskih vina gdje su se vrijednosti Co kretale od 0,214 do 0,134 mg/L (Aydin i sur., 2010), i argentinskih vina sa vrijednostima Mo od 20 µg/L do 24 µg/L (Di Paola-Naranjo i sur., 2011), te predstavljaju potencijalne deskriptore za daljnja istraživanja.

Cu i Cr se u literaturi često spominju kao neki od pouzdanih deskriptora (Fabani i sur., 2010; Dinča i sur., 2016; Geana i sur., 2016). Rezultati za Cu pokazuju premale razlike između prosječnih vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju, da bi se donijeli zaključci o njegovom

značaju bez ispitivanja većeg broja uzoraka i statističke obrade podataka. S druge strane Cr potencijalno može biti iskorišten kao deskriptor između kontinentalnih vina, budući da sa prosječnim vrijednostima od 17,48 µg/L u Plešivici, do 22,96 µg/L u Slavoniji, vina Istočne kontinentalne Hrvatske pokazuju najniže koncentracijske vrijednosti.

Prosječne koncentracije Fe po ZOI su se kretale od 0,98 mg/L u Plešivici, do 2,49 mg/L u Srednjoj i Južnoj Dalmaciji, što potvrđuje osnovu da se Fe učestalo spominje kao jedan od osnovnih deskriptora vina. U prilog tome idu istraživanja na australskim (Martin i sur., 2012), rumunjskim (Geana i sur., 2016) i kineskim vinima (Fan i sur., 2018).

Razlike u koncentraciji K, Na, Zn, i Sn su vidljive između kontinentalnih i priobalnih djelova gdje su se u analiziranim vinima prosječne koncentracije kretale od 559 mg/L u Slavoniji, do 1078 mg/L u Sjevernoj i Južnoj Dalmaciji za K; od 5,04 mg/L u Plešivici, do 10,60 mg/L u Istri za Na; od 0,64 mg/L u Slavoniji do 1,96 mg/L u Srednjoj i Južnoj Dalmaciji za Zn; i od 0,005 mg/L u Plešivici do 0,065 mg/L u Srednjoj i Južnoj Dalmaciji za Sn. Svi ovi elementi se mogu dalje izučavati kao potencijalni deskriptori za pojedine hrvatske vinske regije, a u prilog tome idu i znanstvena istraživanja drugih zemalja kao što su Kina (Bin i sur., 2012; Fan i sur., 2018), Australija (Martin i sur., 2012), Turska (Aydin i sur., 2010).

Koncentracije za ostale mikroelemente Rb, B i Pb su se kretale od 0,84 mg/L u Slavoniji, do 1,29 mg/L u Istri za Rb, od 1,89 mg/L u Slavoniji do 4,41 mg/L u Istri za B i od 40,64 µg/L u Plešivici, do 59,28 µg/L u Slavoniji za Pb.

Kod elemenata u tragovima posebno se izdvojio Li čija se prosječna koncentracija kretala od 2,21 µg/L u Srednjoj i Južnoj Dalmaciji, do 9,55 µg/L u Slavoniji. Za usporedbu, koncentracije Li u hrvatskim vinima su slične podacima dobivenim za brazilska vina, sa prosječnom koncentracijom Li od 5,0 µg/L (Dutra i sur., 2013), ali različita od rumunjska vina, gdje se prosječna koncentracija Li kretala od 27,1 µg/L do 36,1 µg/L (Geana i sur., 2016).

Usporedbom dobivenih rezultata između ZOI je vidljivo da uzorci vina Zapadne kontinentalne Hrvatske, ZOI Plešivica, pokazuju više prosječne koncentracije Co i Li, te niže prosječne koncentracije Fe, Cu i Sn; uzorci vina Istočne kontinentalne Hrvatske, ZOI Slavonija, pokazuju više prosječne koncentracije Cr, Mn, Pb i Li, te niže prosječne koncentracije B i K; uzorci vina Primorske Hrvatske, ZOI Hrvatska Istra, pokazuju više koncentracije Co, Pb, B i Zn, te niže

prosječne koncentracije Ba i Sr., te uzorci vina Primorske Hrvatske, ZOI Srednja i Južna Dalmacija, pokazuju više koncentracije Fe, Mg, K, Zn i Na, te niže koncentracije Mn, Co i Ba.

Geografskim presjekom Hrvatske na sjeverni i južni dio, pri čemu Zapadna i Istočna kontinentalna Hrvatska spadaju u sjeverni, a Primorska Hrvatska u južni dio, vidljive su razlike između uzoraka vina. Sjeverniji dio Hrvatske ima prosječno niže koncentracije K, Na, Rb, B i prosječno više koncentracije Li od južnog djela Hrvatske.

Koz literaturu su pronađene statistički opravdane razlike u koncentracijama pet elemenata (Cd, Pb, Zn, Ca i B) između hrvatskih bijelih vina ispitivanih zaštićenih oznaka izvornosti. Istraživanjem iz 2017. godine je zaključeno da najveći sadržaj Cd, Pb, Zn i B imaju vina iz ZOI Srednja i Južna Dalmacija, a prosječne vrijednosti su im iznosile - 5,92 (Cd $\mu\text{g/L}$), 68,25 (Pb $\mu\text{g/L}$), 0,71 (Zn mg/L) i 5,23 (B mg/L) (Leder, 2017).

Usporedbom s dobivenim prosječnim rezultatima iz Tablice 12., vidljivo je da postoje razlike u prosječnim vrijednostima određivanih elemenata. Prosječni rezultati su izračunati na osnovu dobivenih eksperimentalnih rezultata iz Tablica 8., 9., 10., i 11.. Prema rezultatima dobivenima u ovom istraživanju najveću prosječnu koncentraciju Cd i Zn imaju vina iz ZOI Sjeverna i Južna Dalmacija, najveću prosječnu koncentraciju Pb i B imaju vina iz ZOI Istra, a najveću koncentraciju Ca vina iz ZOI Plešivica. Budući da su uzorci u ovom istraživanju obuhvaćali i bijela i crna vina, ovime možemo zaključiti da postoje razlike u mineralnom profilu, ovisno o boji grožđa, što se slaže sa dostupnom znanstvenom literaturom (Martin i sur., 2012).

Usporedbom dobivenih rezultata, karakteristični deskriptori za crna vina Primorske Hrvatske su slična sa prosječnim rezultatima dobivenim za grupu ZOI Srednja i Južna Dalmacija (Tablica 11.) koja se sastoji od pet uzoraka autohtonih crnih vina. Odabrani uzorci za kontinentalne djelove Hrvatske se sastoje od bijelih autohtonih sorti, te ZOI Plešivica i ZOI Slavonija pokazuju više prosječne koncentracije Ca, a bijela vina ZOI Istra veće prosječne koncentracije Cd, Co. Budući da je u radu korišteno 6 uzoraka crnog vina i 14 uzoraka bijelog vina, nema dovoljno relevantnih uzoraka kako bi se vina sa sigurnošću mogla razlikovati na osnovu mineralnog sastava, a s obzirom na regiju i boju. Iako postoje određene naznake za to, istraživanje bi trebalo proširiti na veći broj uzoraka kako bi se sa većom sigurnošću moglo utvrditi koji elementi su karakteristični za određena vinorodna područja i boju vina.

4.3 OMJERI IZOTOPA UGLJIKA

U posljednjih nekoliko godina kroz znanstvene radove se spominju brojne studije za određivanje zemljopisnog podrijetla vina, među kojima se izdvaja IRMS kao metoda koja daje mogućnost istraživanja različitih faktora. Raščlanjena je analiza različitih omjera izotopa u svrhu utvrđivanja autentičnosti vina, uključujući $^{88}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$ (Geana i sur., 2016), $^{11}\text{B} / ^{10}\text{B}$ (Coetze i sur., 2005), $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ i ^{18}O (Kokkinofa i sur., 2014, Dinča i sur., 2016). Mjerenje omjera različitih stabilnih izotopa, u različitim sastojcima vina kao što su etanol i voda, često daju informacije o podrijetlu izvornih materijala (npr. CO_2 , H_2O , NH_4 i NO_2), njihovim procesima asimilacije, kao i uvjetima rasta, što je indikator botaničkog i zemljopisnog porijekla (Dinča, 2016).

Temeljna pretpostavka ove metode je da etanol koji nastaje fermentacijom iz šećera, podrijetlom iz C_4 biljaka, ima višu koncentraciju ^{13}C izotopa nego iz C_3 biljaka. Biljke kao što je vinova loza pripadaju C_3 grupi. Šećerna trska, šećerna repa i kukuruz pripadaju C_4 grupi. Mjerenjem sadržaja ^{13}C izotopa može se identificirati i kvantificirati šećer porijeklom iz C_4 biljaka (šećerne trske, šećerne repe i kukuruza) koji se može dodavati proizvodima dobivenim od C_3 biljaka, odnosno grožđa.

U ovom istraživanju su omjeri stabilnih izotopa ugljika izmjereni IRMS analizom, prema OIV-MA-AS311-05:R2011 metodi, a rezultati dobiveni analizom su prikazani u tablici 13.

Vrijednosti omjera izotopa $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ su se kretale od -29,07 do -26,26 u ZOI Plešivica, od -28,37 do -26,33 u ZOI Slavonija, od -27,93 do -26,19 u ZOI Istra, te od -25,57 do -25,17 u ZOI Srednja i Južna Dalmacija. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su svi uzorci unutar očekivanih, prihvatljivih vrijednosti, te da u vina nije dodavan šećer.

Među regijama su vidljive razlike u omjerima, što predstavlja mogućnost povezanosti koncentracije izotopa u vinima, s koncentracijama izotopa u tlu na kojima je grožđe za proizvodnju određenog vina raslo. Ovaj rezultat ide u prilog istraživanjima koja povezuju omjere stabilnih izotopa sa zemljopisnom pripadnošću vina (Geana i sur., 2016; Dinča i sur., 2016), iako su potrebna daljnja istraživanja i statističke obrade podataka da bi se takve tvrdnje i potvrdile.

Prosječne vrijednosti omjera izotopa kretale su se od -28,25 u Plešivici, do -25,33 u Srednjoj i Južnoj Dalmaciji, što je u skladu sa prosječnim vrijednostima dobivenim u vinimaa iz različitih europskih regija, srednjih vrijednosti između -26 i -29 ‰ za središnju Europu, te -25 i -27 ‰ za južnu Europu (Christoph i sur. 2003, Dinča 2016).

5 ZAKLJUČCI

Određivanjem mineralnog profila zaključeno je da se među određivanim elementima K, Ca, Mg i Na nalaze u najvišim koncentracijama u ispitivanim uzorcima vina.

Na osnovu rezultata analize je vidljivo da se sve ispitivane koncentracije minerala nalaze unutar okvira zakonskih propisa i ograničenja Republike Hrvatske, pa se može zaključiti da je primjena mineralnih i organskih gnojiva, anorganskih pesticida i drugih pomoćnih tvari u vinogradarskoj i vinarskoj praksi unutar zakonski propisanih ograničenja. Također se može zaključiti da nema onečišćenja okoliša iz ostalih izvora, kao što su industrijska onečišćenja, otpadne vode i ispušni plinovi.

Usporedbom mineralnih profila ispitivanih regija može se zaključiti da:

- Uzorci vina Zapadne kontinentalne Hrvatske, ZOI Plešivica, u odnosu na ostala područja pokazuju više prosječne koncentracije Co i Li, te niže prosječne koncentracije Fe, Cu i Sn.
- Uzorci vina Istočne kontinentalne Hrvatske, ZOI Slavonija, pokazuju više prosječne koncentracije Cr, Mn, Pb i Li, te niže prosječne koncentracije B i K.
- Uzorci vina Primorske Hrvatske, ZOI Hrvatska Istra, pokazuju više koncentracije Co, Pb, B i Zn, te niže prosječne koncentracije Ba i Sr.
- Uzorci vina Primorske Hrvatske, ZOI Srednja i Južna Dalmacija, pokazuju više koncentracije Fe, Mg, K, Zn i Na, te niže koncentracije Mn, Co i Ba.

Pregledom mineralnih profila izabranih uzoraka se može zaključiti da je ICP pouzdana metoda za utvrđivanje deskriptora kojima se određuje zemljopisna pripadnost vina.

Određivanjem omjera stabilnih izotopa ^{13}C / ^{12}C u odabranim uzorcima vina može se zaključiti kako vina korištena u ovom istraživanju nisu patvorena, te da u njih nisu dodavani šećeri porijeklom iz C_4 biljaka (šećerne trske, šećerne repe i kukuruza).

Usporedbom s dostupnom znanstvenom literaturom, zaključuje se da se prosječne koncentracije omjera izotopa ugljika kreću u predviđenim vrijednostima za zemljopisni položaj Hrvatske.

Nadalje, može se zaključiti da broj od 20 uzoraka nije dovoljan za temeljitu usporedbu zemljopisne pripadnosti vina Hrvatske. Iako se radi o relativno malom zemljopisnom području, regionalne, klimatske i sortne različitosti zahtjevaju veći broj uzoraka podjeljenih po boji grožđa i regijama. Samo mineralne koncentracije i omjeri stabilnih izotopa ^{13}C / ^{12}C dobiveni istraživanjem u ovom radu nisu dovoljan podatak za donošenje konkretnijih zaključaka, te je potrebna daljnja statistička obrada dobivenih podataka, kako bi se pouzdano mogli utvrditi odgovarajući deskriptori.

6 LITERATURA

Accum F. (1820) A Treatise On Adulterations Of Food And Culinary Poisons, And Methods Of Detecting Them. Longman, Hurst, Rees, Orme, and Brown, London, UK.

Aceto, M., Abollino, O., Concetta Bruzzonit, M., Mentastiz, E., Sarzanin, C., Malandrino, M. (2002) Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review. *Food Addit. Contam.* **19**, 126-133.

Almeida, C.M.R., Vasconcelos, M.T.S.D. (2003) Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4788–4798.

Alvarez, M., Moreno, I.M., Jos, A.M., Camean, A.M, Gonzales, A.G. (2007) Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. *J. Food Compos. Anal.* **20**, 391-395.

Amorós, J.A., Garcia, F.J., Sanchez, C.J., Pérez de los Reyes C., García, R., Jimenez R. (2011) Trace element distribution in red soils under semiarid Mediterranean environment. *Int. J. Geosci.* **2**, 84–97.

Angerosa, F., Breas, O., Contento, S., Guillou, C., Reniero, F., Sada, E. (1999) Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *J. Agr. Food. Chem.* **47**, 1013-1017.

Angus, N.S., O’Keffe, T.J., Stuart, K.R., Miskelly, G.M. (2006) Regional classification of New Zealand red wines using inductively-coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Aust. J. Grape. Wine. R.* **12**, 170-176 .

Anonymus (2018) Vinogradarske zone u Republici Hrvatskoj prema A.J. Winkleru, <<http://vinopedia.hr>>. Pristupljeno 14. Svibnja 2018.

Aydina, I., Yuksela, U., Guzelb, R., Ziyadanogullaria, B., Aydina, F. (2010) Determination of Trace Elements in Turkish Wines by ICP-OES and HG-ICP-OES. *Atom. Spectrosc.* **31**, 68-71.

Beaty, R.D., Kerber, J.D. (2002) Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry, Perkin Elmer Inc., Shelton (CT).

Belajova, E., Suhaj, M. (2012) Compositional profiling of wines from distinct production systems. *J. Food Nutr. Res.* **51**, 173–183.

Bertoldi, D., Larcher, R., Bertamini, M., Otto, S., Concheri, G., Nicolini, G. (2011) Accumulation and distribution pattern of macro and microelements and trace elements in *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay berries. *J. Agric. Food. Chem.* **59**, 7224–36.

Boss, A.M. (1980) Modern polarographic methods in analytical chemistry, Chapter 9. Marcel Dekker, New York, SAD.

Bricout, J., Koziat, J. (1987) Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 758-760.

Bukovčan, R. (2007) Primjena metoda spektrometrije optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES) za određivanje makro i mikroelemenata u hrvatskim vinima, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno- biotehnološki fakultet, Magistarski rad.

Camin, F., Boner, M., Bontempo, L., Hassek, C.F., Kelly, S.D., Riedl, J., Rossman, A. (2017) Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. *Trends Food Sci. Tech.* **61**, 176-187.

Coetzee, P.P., Greeff, L., Vanhaecke, F. (2011) ICP-MS measurement of $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$ isotope ratios in grapevine leaves and the investigation of possible boron isotope fractionation in grapevine plants. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **32**, 28-34.

Coetzee, P.P., van Jaasveld, F.P., Vanhaecke, F. (2014) Intraregional classification of wine via ICP-MS elemental fingerprinting. *Food Chem.* **164**, 485-492.

Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis: Determination of the deuterium distribution in ethanol derived from fermentation of grape musts, concentrated

grape musts, grape sugar (rectified concentrated grape musts) and wines by application of nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR/RMN-FINS), Method OIV-MA-AS311-05:R2011, International Organisation of Vine and Wine.

Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis: 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, Method OIV-MA-AS312-06:R2001, International Organisation of Vine and Wine.

Compendium of International Analysis of Methods- OIV: Determination of the deuterium distribution in ethanol by SNIF-MR, Method OIV-MA-AS311-05, International Organisation of Vine and Wine.

Dinča, O.R., Ionete, R.E., Costinel, D., Popescu, R., Geana, I.E., Radu, G.L. (2016) Regional and vintage discrimination of Romanian wines based on elemental and isotopic fingerprinting. *Food Anal. Methods* **9**, 2406-2417.

Di-Paola Naranjo, R.D., Baroni, M.V., Podio, N.S., Rubenstein, H.R., Fabiani, M.P., Bandini, R.G. (2011) Fingerprints for main varieties of Argentinean wines: Terroir differentiation by inorganic, organic, and stable isotopic analyses coupled to chemometrics. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 7854-7865.

Dutra, S.V., Adami, L., Marcon, A.R., Carnieli, G.J., Spinelli, F.R., Leornadeli, S., Ducatti, C., Moreira, M.Z., Vanderline, R. (2011) Characterization of wines according to the geographical origin by analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values. *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 1571-1576.

Đorđević, N., Camin, F., Marianella, R.M., Postma, G.J., Buyedens, L.M.C., Wehrens, R. (2013) Detecting the addition of sugar and water to wine. *Aust. J. Grape Wine R.* **19**, 324-330.

Ellis, D.I., Brewster, V.L., Dunn, W.B., Allwood J.W, Golvanov, A.P., Goodacre, R. (2012) Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5706–5727

- Fabiani, M.P., Arrua, R.C., Vasquez, F., Diaz, M.P., Baroni, M.V., Wunderlin, D.A. (2010) Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chem.* **119**, 372-397.
- Fabrina, R., Bentlin, S., Pulgati, F.H., Dressler, V.L., Pozebon, D. (2011) Elemental analyses of wines from South Africa and their classification according to country. *J. Braz. Chem. Soc.* **22**, 327-336.
- Fan, S., Zhong, Q., Gao, H., Wang, D., Li, G., Huang, Z. (2018) Elemental profile and oxygen isotope ratio (^{18}O) for verifying the geographical origin of Chinese wines. *J. Food Drug Anal.* **26**, 1033-1044.
- Fazinić, N., Fazinić, M. (1997) Ekologija u službi hrvatskog vinogradarstva, *Agronomski glasnik*, 5-6.
- Freschi, G.P.G., Dakuzaku, C.S., de Morales, M., Nobrega, J.A., Gomes Neto, J.A. (2001) Simultaneous determination of Cd and Pb in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta B.* **56**, 1987-1993.
- Frias, S., Conde, J.E., Rodriguez-Bencomo, J.J., Garcia-Montelongo, F., Perez-Trujillo, J.P. (2002) Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta* **59**, 335-344.
- Gambelli, L., Santaroni, G.P. (2004) Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *J. Food Compos. Anal.* **17**, 613–618.
- Geana, E.I., Sandru, C., Stanciu, V., Ionete, R.E. (2016) Elemental profile and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope ratio as fingerprints for geographical traceability of wines. *Food Anal. Met.* **10**, 63-73.
- Ghidini, S., Ianieri, A., Zanardi, E., Conter, M. (2006) Stable isotopes determination in food authentication: a review [designation of origin]. **Agris:International Information System For The Agricultural Science And Technology.**

- Gremaud, G., Quaile, S., Piantini, U., Pfammatter, E., Corvi, C. (2004) Characterization of Swiss vineyards using isotopic data in combination with trace elements and classical parameters. *Eur. Food Res. Technol.* **219**, 97-104.
- Hassal, A.H. (1855) Food adulteration and inspection, Longman, Brown, Green and Longmans, London, UK.
- Kelly, S. D., Rhodes, C. (2002) Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry, *Grasas Aceites* **53**, 34-44.
- Kokkinofta, R., Kanari, P., Economidou, N., Tzioni, E., Damianou, K., Savvidou, C., Louka, C., Shiakalli, M. (2013) Authenticity testing of Cypriot Wines by using different spectroscopic techniques, Semantic Scholar.
- Larcher, R., Nicolini, G. (2001) Survey of 22 mineral elements in wines from Trentino (Italy) using ICP-DES. *Ital. J. Food Sci.* **13**, 2, 233-241.
- Leonardelli, S., Dutra, S.V., Carnieli, G.J., Spinelli, F., Ferreira, D.S., Vanderlinde, R. (2016) Exogenous CO₂ in South American Sparkling wine. *Bio Web Conf.*
- Leder, R., Kubanović, V., Petric, I. V., Vahčić, N., Banović, M. (2015) Chemometric prediction of the geographical origin of Croatian wines through their elemental profiles. *J. Food Nutr. Res.* **54**, 229-238.
- Leder, R., Šimon, S., Prša, I., Varga, T., Petric, I.V. (2017) Klasifikacija odabranih hrvatskih bijelih vina različitih zaštićenih oznaka izvornosti prema sastavu makro i mikroelemenata, 52. hrvatski i 12. međunarodni simpozij agronoma, Dubrovnik, Hrvatska.
- Li, W.C., Sun, P., Wang, Z.P. (2012) Effects of different soil condition on physiology and fruit quality of wine grapes. *J. Fruit Sci.* **29**, 837–842.
- Likar, M., Vogel-Mikuš, K., Potisek, M., Hančević, K., Radić, T., Nečemer, M., Regvar, M. (2015) Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. *Sci. Total Environ.* **505**, 724–731.

Luykx, D.M.A.M., Ruth, S.M. (2008) An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chem.*, **107**, 897-91.

Mandić, M., Bojić, D., Lutz, H.O., Kapelj, S., Roller.Lutz, Z. (2007) Hrvatski laboratorij za analizu izotopnih omjera lakih elemenata, Hrvatske vode i Europska unija: izazovi i mogućnosti: zbornik radova, Sveučilišna tiskara, Zagreb, 745-750.

Martin, A.E., Watling, R.J., Lee, G.S. (2012) The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. *Food Chem* **133**,1081-1089.

McKinnon, A.J., Scollary, G.R. (1997) Size fractionation of metals in wine using ultrafiltration. *Talanta* **44**, 1649-1658.

Montaser, A., Golightly, D.W. (1992) Inductively Coupled Plasmas in analytical Atomic Spectrometry, 2nd edition, VCH Publishers, New York, SAD.

Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E. (1991) Biology of the grapevine, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Parker, I G., Kelly, S.D., Sharman, M., Dennis M.J., Howie D. (1998) Investigation into the use of Stable Carbon Isotope Ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of Scotch Whisky Congeners to establish Brand Authenticity. *Food Chem.* **63**, 423-428.

Pereira, L., Martins-Lopes, P. (2018) Applying high-resolution meelting (HRM) technology to oliv oil and wine authenticity. *Food Res. Int.* **103**, 170-181.

Pessanha, S., Carvalho, M.L., Becker, M., Von Bohlen, A. (2010) Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by total reflection X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray fluorescence: comparison on two vineyards. *Food Chem.* **112**, 26–34.

Pisano, P.L., Silva, M.F., Olivieri, A.C. (2014) Anthocyanins as markers for the classification of Argentinean wines according to botanical and geographical origin. Chemometric modeling of liquid chromatograpy-mass spectrometry data, *Food Chem.* **175**, 174-180.

- Rastija, V., Srečnik, G. (2009) Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chem.* **115**, 54–60.
- Rebolo, S., Pena, R.M., Latorre, M.J., Garcia, S., Botana, A.M., Herrero, C. (2000) Characterisation of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra Wines using pattern recognition analysis. *Anal. Chim. Acta.* **417**, 211-220.
- Rešetar, D., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., Katalinić, J.P., Kraljević Pavelić, S. (2016) Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry linear time-of-flight method for white wine fingerprinting and classification. *Food Cont.* **64**, 157-164.
- Rossmann, A., Haberhauer, G., Holzl, S., Horn, P., Pichlmayer, F., Voerkelius, S. (2000). The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 32-40.
- Serapinas, P., Venskutonis, P.R., Aninkevičius, V., Ežerinskis, Ž., Galdikas, A., Juzikienė, V. (2008) Step by step approach to multi-element data analysis in testing the provenance of wines. *Food Chem.* **107**, 1652-1660.
- Shen, F., Wu, J., Ying, Y., Li, B., Jiang, T. (2013) Differentiation of Chinese rice wines from different wineries based on mineral elemental fingerprinting. *Food Chem.* **141**, 4026-2030.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. (1999) Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska.
- Theil, G., Danzer, K. (1997) Direct analysis of mineral components in wine by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Fresen. J. Anal. Chem.* **357**, 553-557.
- Toher, D., Downey, G., Murphy, T.B. (2007) A comparison of model based and regression classification techniques applied to near infrared spectroscopic data in food authentication studies. *Chemometr. Intell. Syst.* **89**, 102-115.
- Tzouros, N.E., Arvanitoyannis, I.S. (2001) Agricultural produces: Synopsis of employed quality control methods for the authentication of foods and application of chemometrics for the classification of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **41**, 287-319.

Van Leeuwen, C., Seguin, G. (2006) The concept of terroir in viticulture. *J. Wine Res.* **17**, 1–10.

Versari, A., Laurie, V.F., Ricci, A. (2014) Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food. Res. Int.* **60**, 2–18.

Wooldridge, J., Louw, P.J.E., Conradie, W.J. (2010) Effects of rootstock on grapevine performance, petiole and must composition, and overall wine score of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and Pinot Noir. *S. Afr. J. Enol. Viticult.* **31**, 45–8.

Xu, S.W., Liu, S.Q., Yang, Z.X., Du, G.Q., Chang, J.H. (2009) Evaluation of Grape Quality and Relationship Between Grape Quality and Soil Texture. *Soils* **41**, 790–795.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F.S. (1999.) Wine analysis and production, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.

7 PRILOZI

7.1 TABLICA UKUPNIH REZULTATATA ISTRAŽIVANJA

Sorta	Rajnski rizling									
ZOI	Graševina	Graševina	Rajnski rizling	Graševina	Graševina	Graševina	Plešivica	Plešivica	Plešivica	Plešivica
13/12C	-27,05	-26,33	-28,10	-28,19	-28,49	-28,59	-29,07	-29,02	-26,06	
Al (mg/L)	0,128	0,765	0,765	0,164	0,163	0,132	0,130	0,480	0,481	
As (µg/L)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
B (mg/L)	1,855	1,660	2,330	2,450	3,140	2,150	3,145	2,915	3,495	
Ba (mg/L)	0,094	0,147	0,182	0,101	0,355	0,064	0,056	0,060	0,077	
Ca (mg/L)	64,0	98,5	129,0	68,0	136,0	90,0	83,5	82,0	78,0	
Cd (µg/L)	0,000	1,650	0,000	1,550	0,493	2,710	0,357	0,000	0,535	
Co (µg/L)	4,13	7,50	9,00	7,00	28,50	7,00	3,71	2,93	3,42	
Cr (µg/L)	15,05	16,45	55,50	19,20	20,35	13,35	13,35	27,70	12,65	
Cu (mg/L)	0,057	0,147	0,160	0,122	0,166	0,119	0,125	0,071	0,052	
Fe (mg/L)	1,175	1,750	1,350	0,249	0,380	1,140	1,5335	0,770	1,075	
K (mg/L)	419	535	770	645	1035	745	555	505	695	
Li (µg/L)	10,600	3,705	5,900	7,350	25,850	2,255	1,905	6,050	7,300	
Mg (mg/L)	61,50	96,00	85,00	85,00	111,50	68,50	56,00	57,50	57,00	
Mn (µg/L)	1,095	1,065	1,335	0,555	3,190	0,287	0,220	0,347	0,436	
Mo (µg/L)	4,515	4,000	8,500	5,000	5,500	5,000	2,450	2,145	3,085	
Na (mg/L)	4,340	10,050	12,25	5,000	5,900	7,800	3,965	3,700	3,850	
Pb (µg/L)	41,25	70,00	80,50	68,50	64,00	66,00	23,40	24,20	25,60	
Rb (mg/L)	0,970	0,980	0,366	1,290	0,865	0,430	0,740	1,030	0,640	
Sn (mg/L)	0,029	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,006	0,017	0,004	
Sr (mg/L)	0,291	0,436	0,525	0,336	0,665	0,345	0,188	0,304	0,349	
V (µg/L)	57,5	101,0	92,5	89,5	118,5	77,5	56,5	57,0	57,5	
Zn (mg/L)	0,397	0,770	0,640	0,550	0,840	0,550	0,610	0,200	0,301	

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Mara Miliš