

# Udjeli makro- i mikroelemenata te omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika kao parametri za određivanje zemljopisnoga podrijetla hrvatskih vina

---

Leder, Renata

Doctoral thesis / Disertacija

2021

*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:159:806231>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-11**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Renata Leder

**UDJELI MAKRO- I MIKROELEMENATA TE  
OMJERI STABILNIH IZOTOPA UGLJIKA I  
KISIKA KAO PARAMETRI ZA  
ODREĐIVANJE ZEMLJOPISNOGA  
PODRIJETLA HRVATSKIH VINA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Renata Leder

**UDJELI MAKRO- I MIKROELEMENATA TE  
OMJERI STABILNIH IZOTOPA UGLJIKA I  
KISIKA KAO PARAMETRI ZA  
ODREĐIVANJE ZEMLJOPISNOGA  
PODRIJETLA HRVATSKIH VINA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Mara Banović

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

Faculty of food technology and biotechnology

Renata Leder

**CONTENTS OF MACRO- AND  
MICROELEMENTS AND RATIOS OF  
STABLE ISOTOPES OF CARBON AND  
OXYGEN AS PARAMETERS FOR  
DETERMINING THE GEOGRAPHICAL  
ORIGIN OF CROATIAN WINES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Mara Banović, PhD, Professor

Zagreb, 2021.

Ova disertacija izrađena je u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu, Centru za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo, Odjelu za fizikalno kemijska ispitivanja pod vodstvom prof. dr. sc. Mare Banović.

Tema doktorskog rada pod nazivom „Udjeli makro- i mikroelemenata te omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika kao parametri za određivanje zemljopisnoga podrijetla hrvatskih vina“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanja mentora, prihvaćena je na 3. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta akademske godine 2017./2018. u Zagrebu održanoj dana 13. prosinca 2017. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 27. veljače 2018. godine na 8. sjednici u 349. akademskoj godini (2017./2018.).

## **Hvala ...**

... mojoj mentorici prof. dr. sc. Mari Banović na pomoći, savjetima i razumijevanju pri odabiru teme te izradi i pisanju ovog rada.

... povjerenstvu: prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić, prof. dr. sc. Nadi Vahčić, dr. sc. Igoru Lukiću, jer su konstruktivnim sugestijama doprinijeli kvaliteti ovog rada.

... Upravi Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu i Centra za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo na kontinuiranom podržavanju mojih nastojanja za postizanjem dodatnih znanja i vještina te osiguravanju uvjeta za izradu eksperimentalnog dijela ovog doktorata.

... posebno zahvaljujem dr. sc. Ivani Vladimiri Petric na motiviranju, pomoći i spremnosti na razmjenu mišljenja i rješavanje problema.

... dragim kolegicama labosicama (sadašnjim i bivšim) na toploj podršci i razumijevanju.

... svim djelatnicima Centra za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo koji su svatko na svoj način doprinijeli realizaciji ovog rada.

Neizmerno hvala mami Ljubici koja mi je najveći oslonac, tati Josipu koji je tamo negdje gore sada najponosniji i bratu Robertu koji je uvijek spreman slušati i pomoći.

*Najviše zahvaljujem suprugu Igoru i kćerima Dori i Marti što mi svakodnevno griju srce i obogaćuju život. Vama u cijelosti posvećujem ovaj rad.*

**Informacija o mentoru:**  
**prof. dr. sc. Mara Banović**

**Prof. dr. sc. Mara Banović** je redovita profesorica u trajnom zvanju na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na istom Fakultetu je diplomirala, magistrirala i doktorirala. Nakon diplome zapošljava se na Fakultetu 1984. godine, gdje ostaje do danas. Član je Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo. Tijekom rada na Fakultetu obavljala je različite funkcije: pročelnica Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina, zamjenik pročelnika Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te sudionik u radu raznih odbora Fakulteta.

Znanstveno-istraživačka djelatnost vezana je pretežito uz područje kemije i tehnologije vina te tehnologije i konzerviranja voća i povrća, kvalitete hrane i osiguranja kvalitete hrane. Rezultati znanstveno-istraživačkog rada očituju se kroz objavljene znanstvene radove, sudjelovanja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima te radu na znanstvenim projektima. Do sada je objavila preko 50 znanstvenih radova od kojih je 25 citirano u bazama Current Contents i Science Citation Index Expanded. Za različite nacionalne i međunarodne znanstvene časopise recenzirala preko 60 znanstvenih radova.

Tijekom dosadašnjeg rada na Fakultetu sudjelovala je u izvođenju vježbi i predavanja na više kolegija. Tijekom uvođenja Bolonjskog sustava bila je uključena u program i uvođenje novih predmeta na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima, bilo kao koordinator ili kao suradnik. Na preddiplomskom i diplomskom studiju voditelj je predmeta „Kemija i tehnologija vina“, „Zakonski propisi u kontroli i kvaliteti hrane“ i „Sustavi osiguranja kvalitete“. Na poslijediplomskim studijima voditelj je predmeta „Tehnologija vina“, „Zakonski propisi o hrani“ i „Food Legislation“. Također sudjeluje u izvođenju nastave na još sedam predmeta na navedenim studijima. Pod njenim mentorstvom izrađeno je 70 diplomskih radova, 14 završnih radova, 3 znanstvena magistarska rada, 2 specijalistička magistarska rada, 18 specijalističkih završnih radova te 5 doktorata. Stručna djelatnost prof. dr. sc. Mare Banović obuhvaća suradnju s gospodarstvom, sudjelovanju na stručnim projektima, sudjelovanje na stručnim skupovima u RH, sudjelovanju u donošenju zakonske regulative i objavljivanju stručnih radova.

Članica je Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Hrvatske mljekarske udruge te Društva sveučilišnih nastavnika i ostalih znanstvenika Hrvatske.



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

Doktorski rad

UDK: 54.027:543.51:663.2(497.5)(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Znanstvena grana: Inženjerstvo

### UDJELI MAKRO- I MIKROELEMENATA TE OMJERI STABILNIH IZOTOPA UGLJIKA I KISIKA KAO PARAMETRI ZA ODREĐIVANJE ZEMLJOPISNOGA PODRIJETLA HRVATSKIH VINA

*mr. sc. Renata Leder, dipl. ing.*

Rad je izrađen u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu, Centru za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo, Odjelu za fizikalno kemijska ispitivanja.

**Mentor:** prof. dr. sc. Mara Banović

#### **Kratki sažetak**

Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika između vina iz kontinentalnog i primorskog područja Hrvatske, iz tri vinogradarske zone (B, CI i CII), četiri regije uzgoja (Središnja bregovita Hrvatska, Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija) i odabranih zaštićenih oznaka izvornosti (ZOI). U ovome su radu prikazani rezultati analize 22 makro- i mikroelementa spektrometrijom optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES) te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika spektrometrijom masa omjera izotopa (IRMS) u 190 uzoraka vina, od kojih je dio proizveden konvencionalno, a dio mikrovinifikacijom. Dobiveni podaci obrađeni su metodama deskriptivne i multivarijatne statističke analize. Najveći stupanj razlikovanja vina proizvedenih u hrvatskim vinogradarskim područjima (kontinentalnom i primorskom) postignut je općom diskriminacijskom analizom (GDA) koja je pokazala točnu klasifikaciju 97,9 % svih ispitivanih uzoraka, 100,0 % autentičnih uzoraka i 84,8 % konvencionalnih uzoraka u matrici unakrsne provjere valjanosti. Najvažniji pokazatelji razlikovanja primorskog i kontinentalnog područja bili su  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, K, Rb, Sn, Li i  $\delta^{13}\text{C}$ . GDA je za vina iz tri vinogradarske zone u Hrvatskoj pokazala veću razinu ispravno klasificiranih uzoraka ako su u analizi upotrijebljeni samo autentični uzorci (94,9 %) nego za sve uzorke zajedno (86,3 %) ili za konvencionalne uzorke (66,1 %) u unakrsnoj provjeri. Pri tome su najznačajnije mjerne veličine bile  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, Rb, Li, K i Sn. Obzirom na regije uzgoja vinove loze točna klasifikacija uzoraka postignuta je za 93,6 % autentičnih vina, za 70,0 % svih vina ukupno te 53,6 % konvencionalnih uzoraka, gdje su statistički najznačajniji bili  $\delta^{18}\text{O}$ , Sn, Fe, Cu, Cr i K. GDA vina iz šest odabranih ZOI, ispravno je svrstala 93,0 % autentičnih uzoraka, 58,2 % svih uzoraka ukupno te 34,5 % konvencionalnih uzoraka, a statistički značajni bili su  $\delta^{18}\text{O}$  i Sn. Dobiveni rezultati pokazali su da odnosi između izotopnih omjera i koncentracija različitih razmatranih elemenata u kombinaciji s odgovarajućim statističkim modelom predstavljaju vrijedan alat u razlikovanju vina proizvedenih u različitim hrvatskim vinorodnim područjima, regijama, zonama i ZOI.

**Broj stranica:** 139

**Broj slika:** 13

**Broj tablica:** 21

**Broj literaturnih navoda:** 178

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** makro- i mikroelementi, masena spektrometrija omjera izotopa, optička emisija induktivno spregnute plazme, stabilni izotopi, zemljopisno podrijetlo hrvatskih vina

**Datum obrane:** 14. prosinca 2021. godine

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (predsjednik)
2. Prof. dr. sc. Nada Vahčić (član)
3. dr. sc. Igor Lukić, viši znan. sur. (član)
4. Prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan (zamjenski član)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate University Doctoral Study Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 54.027:543.51:663.2(497.5)(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Food Technology

Scientific Branch: Engineering

### CONTENTS OF MACRO- AND MICROELEMENTS AND RATIOS OF STABLE ISOTOPES OF CARBON AND OXYGEN AS PARAMETERS FOR DETERMINING THE GEOGRAPHICAL ORIGIN OF CROATIAN WINES

*Renata Leder, M. Sc.*

Thesis performed at Croatia Agency for Agriculture and Food, Center for Viticulture, Enology and Edible Oils Analysis, Department of Physico-Chemical Testing.

Supervisor: Mara Banović, PhD, professor

#### Short abstract

The aim of this study was to determine whether there is a difference between wines from the continental and coastal area of Croatia, from three wine-growing zones (B, CI and CII), four growing regions (Croatian Uplands, Slavonia and Croatian Danube, Croatian Istria and Kvarner, and Dalmatia) and selected protected designations of origin (PDO).

This study presents the results of the analysis of 22 macro- and microelements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and the of carbon and oxygen isotopes by isotope ratios mass spectrometry (IRMS) in 190 wine samples, part of which were produced conventionally and part by microvinification. The obtained data were processed by methods of descriptive and multivariate statistical analysis. The highest power for discrimination of wines produced in Croatian winegrowing areas was achieved by general discriminant analysis (GDA) showing correct classification of 97.9% of all investigated samples, 100.0% of microvinified samples and 84.8% of commercial samples in the cross-validation matrix. The most significant markers for discrimination of coastal and continental areas found by GDA were  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, K, Rb, Sn, Li, and  $\delta^{13}\text{C}$ . GDA showed higher levels of correctly classified samples from three viticultural zones in Croatia if only microvinified samples were employed in the analysis (94.9%) than for all samples together (86.3%) or for commercial samples (66.1%) in the cross-validation matrix. The discrimination of viticultural zones B, CI, and CII in Croatia was achieved by  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, Rb, Li, K and Sn. Considering the winegrowing regions, the correct classification was achieved for 93.6% of authentic wines, for 70.0% of all wines, and 53.6% of conventional samples, where the statistically most significant were  $\delta^{18}\text{O}$ , Sn, Fe, Cu, Cr and K. GDA for wines from selected PDOs correctly classified 93.0% of authentic samples, 58.2% of all samples and 34.5% of conventional samples, where the statistically significant were  $\delta^{18}\text{O}$  and Sn. The results obtained showed that the relationships between the isotopic ratios and concentrations of different considered elements combined with appropriate statistical model represent a powerful tool in discrimination of wines produced in different Croatian winegrowing areas, zones, regions and PDOs.

**Number of pages: 139**

**Number of figures: 13**

**Number of tables: 21**

**Number of references: 178**

**Number of supplements: 0**

**Original in:** Croatian

**Keywords:** Croatian wines fingerprint, geographical origin, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, isotope ratio mass spectrometry, macro- and microelements, stable isotopes

**Date of the thesis defence:** 14<sup>th</sup> December 2021

#### Reviewers:

1. Karin Kovačević Ganić, PhD, Full Professor (president)
2. Nada Vahčić, PhD, Full Professor (member)
3. Igor Lukić, PhD, Senior Research Associate (member)
4. Vesna Zechner-Krpan Full Professor (substitute member)

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23; National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb; University of Zagreb, Square Republike Hrvatske 14.

## SAŽETAK

Velika raznovrsnost vinogradarskih regija i podregija Hrvatske omogućuje proizvodnju grožđa i vina posebnih, svojstvenih karakteristika. Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika između vina iz kontinentalnog i primorskog područja Hrvatske, iz tri vinogradarske zone (B, CI i CII), četiri regije uzgoja (Središnja bregovita Hrvatska, Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija) i odabranih zaštićenih oznaka izvornosti (ZOI). U ovome su radu prikazani rezultati analize 22 makro- i mikroelementa spektrometrijom optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES) te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika masenom spektrometrijom omjera izotopa (IRMS) u ukupno 190 uzoraka vina, od kojih je dio proizveden konvencionalno, a dio mikrovinifikacijom u sklopu postupka proizvodnje autentičnih vina za EU izotopnu banku podataka. Dobiveni podaci obrađeni su metodama deskriptivne i multivarijatne statističke analize, koja je pokazala da se vina međusobno statistički značajno razlikuju obzirom na boju, godinu berbe, način proizvodnje i zemljopisno podrijetlo. Analiza glavnih komponenata (PCA) je pokazala da se na osnovu ispitivanih mjernih veličina, vina diferenciraju s obzirom na zemljopisno podrijetlo, pri čemu su najznačajniji pokazatelji bili stabilni izotopi kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Pomoću PCA je postignuto jasno razdvajanje vina kontinentalnih regija (Središnja bregovita Hrvatska ili zona B, Slavonija i hrvatsko Podunavlje ili zona CI), od primorskih regija (Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija ili zona CII). Međutim, nije bilo moguće jasno međusobno razlikovati dvije kontinentalne regije ili zone B i CI u kojima su uzorci raspoređeni bez grupiranja. PCA je također pokazala da se mikrovinificirana vina mogu koristiti kao reprezentativni skup za ocjenu autentičnosti deklariranog zemljopisnog podrijetla komercijalnih vina (konvencionalno proizvedenih) primjenom ispitivanih stabilnih izotopa i elemenata.

Najveći stupanj diskriminacije vina proizvedenih u hrvatskim vinogradarskim područjima (kontinentalnom i primorskom) postignuta je općom diskriminacijskom analizom (GDA) koja je pokazala točnu klasifikaciju 97,9 % svih ispitivanih uzoraka, 100,0 % autentičnih uzoraka i 84,8 % konvencionalnih uzoraka u matrici unakrsne provjere valjanosti. Najvažniji pokazatelji diskriminacije primorskog i kontinentalnog područja bili su  $\delta^{18}\text{O}$  i Co te K, Rb, Sn, Li i  $\delta^{13}\text{C}$ . GDA je za vina iz tri vinogradarske zone u Hrvatskoj pokazala veću razinu ispravno klasificiranih uzoraka ako su u analizi upotrijebljeni samo autentični uzorci (94,9 %) nego za sve uzorke zajedno (86,3 %) ili za konvencionalne uzorke (66,1 %) u unakrsnoj provjeri. Pri tome su najznačajnije mjerne veličine bile  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, Rb, Li, K i Sn. Pomoću GDA

je postignuto i jasno razdvajanje vina kontinentalnih regija (Središnja bregovita Hrvatska ili zona B, Slavonija i hrvatsko Podunavlje ili zona CI), od primorskih (Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija ili zona CII). Postignuto je i vrlo dobro međusobno razdvajanje dvije primorske regije, Hrvatske Istre i Kvarnera od Dalmacije. Kontinentalne regije Središnja bregovita Hrvatska (zona B) i Slavonija i hrvatsko Podunavlje (zona CI) također su međusobno odijeljene, iako u manjoj mjeri. Točna klasifikacija uzoraka obzirom na regiju postignuta je za 93,6 % autentičnih vina, za 70,0 % svih vina ukupno te 53,6 % konvencionalnih uzoraka, gdje je statistički najznačajniji bio omjer stabilnih izotopa kisika  $\delta^{18}\text{O}$ , te Sn, Fe, Cu, Cr i K. GDA vina iz šest odabranih ZOI (Prigorje-Bilogora, Zagorje-Međimijre, Slavonija, Hrvatsko Podunavlje, Hrvatska Istra, Srednja i južna Dalmacija), ispravno je svrstala 93,0 % autentičnih uzoraka, 58,2 % svih uzoraka ukupno te 34,5 % konvencionalnih uzoraka. Najbolje su međusobno razdvojeni zemljopisno najudaljeniji ZOI (Hrvatska Istra od Srednje i južne Dalmacije), dok se kod onih susjednih, koji pripadaju istoj zoni kontinentalnog područja može primijetiti određeno preklapanje, iako uzorci pojedinih ZOI uglavnom tvore dobro definirane grupe, npr. ZOI Hrvatsko Podunavlje ili ZOI Prigorje-Bilogora. Statistički značajna klasifikacija uzoraka prema ZOI dobivena je samo za  $\delta^{18}\text{O}$  i Sn.

Dobiveni rezultati pokazali su da odnosi između izotopnih omjera i koncentracija različitih razmatranih elemenata u kombinaciji s odgovarajućim statističkim modelom predstavljaju vrijedan alat u razlikovanju vina proizvedenih u različitim hrvatskim vinorodnim područjima, regijama, zonama i ZOI te predstavljaju značajne pokazatelje autentičnosti vina prema zemljopisnom podrijetlu. Rezultati ukazuju na to da predložena metodologija predstavlja vrijedan alat koji bi mogao predstavljati dodatnu vrijednost hrvatskim vinima naglašavajući važnost autentičnosti vina, osobito u svjetlu rastuće turističke industrije i sve veće svijesti o značaju vinarstva kao gospodarske djelatnosti.

**Ključne riječi:** makro- i mikroelementi, masena spektrometrija omjera izotopa, optička emisija induktivno spregnute plazme, stabilni izotopi, zemljopisno podrijetlo hrvatskih vina

## SUMMARY

The great diversity of wine-growing regions and sub-regions of Croatia enables the production of grapes and wine with special, characteristic properties. The aim of this study was to determine whether there is a difference between wines from the continental and coastal area of Croatia, from three wine-growing zones (B, CI and CII), four growing regions (Croatian Uplands, Slavonia and Croatian Danube, Croatian Istria and Kvarner, and Dalmatia) and selected protected designations of origin (PDO). This study presents the results of the analysis of 22 macro and microelements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and the ratios of carbon and oxygen stable isotopes by mass isotope ratios (IRMS) in a total of 190 wine samples, part of which were produced conventionally and part by microvinification as part of the production process of authentic wines for the EU isotope data bank. The obtained data were processed by methods of descriptive and multivariate statistical analysis, which showed that wines statistically significantly differ with respect to color, year of harvest, method of production and geographical origin. The analysis of the main components (PCA) showed that, based on the measured values, the wines were differentiated according to their geographical origin, with the most significant indicators being the stable isotopes of oxygen  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  and carbon  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . The PCA enabled a clear separation of the wines of the continental regions (Croatian Uplands or zone B, Slavonia and Croatian Danube region or zone CI), from the coastal regions (Croatian Istria and Kvarner, and Dalmatia or zone CII). However, it was not possible to clearly distinguish between the two continental regions or zones B and CI in which the samples were distributed without grouping. The PCA has also shown that microvinified wines can be used as a representative set to assess the authenticity of the declared geographical origin of commercial wines (conventionally produced) using the tested stable isotopes and elements.

The highest power for discrimination of wines produced in Croatian winegrowing areas was achieved by general discriminant analysis (GDA) showing correct classification of 97.9% of all investigated samples, 100.0% of microvinified samples and 84.8% of commercial samples in the cross-validation matrix. The most significant markers for discrimination of coastal and continental areas found by GDA were  $\delta^{18}\text{O}$  and Co, followed by K, Rb, Sn, Li, and  $\delta^{13}\text{C}$ . GDA showed higher levels of correctly classified samples from three viticultural zones in Croatia if only microvinified samples were employed in the analysis (94.9%) than for all samples together (86.3%) or for commercial samples (66.1%) in the cross-validation matrix. The discrimination

of viticultural zones B, CI, and CII in Croatia was achieved by  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, Rb, Li, K, and Sn. The GDA enabled a clear separation the wines of the continental regions (Croatian Uplands or zone B, Slavonia and the Croatian Danube region or zone CI), from the coastal regions (Croatian Istria and Kvarner, and Dalmatia or zone CII).

A very good separation was achieved between the two coastal regions, Croatian Istria and Kvarner from Dalmatia. The continental regions of Croatian Uplands (Zone B) and Slavonia and Croatian Danube region (Zone CI) are also separated from each other, although to a lesser extent. Considering the winegrowing regions, the correct classification was achieved for 93.6% of authentic wines, for 70.0% of all wines, and 53.6% of conventional samples, where the statistically most significant were  $\delta^{18}\text{O}$ , Sn, Fe, Cu, Cr and K. GDA for wines from six selected PDOs correctly classified 93.0% of authentic samples, 58.2% of all samples and 34.5% of conventional samples. Geographically most distant PDOs (Croatian Istria, Central and Southern Dalmatia) are best distinguished from each other, while in neighboring PDOs, which belong to the same zone of the continental area, a certain overlap can be noticed, although samples of individual PDOs mostly form well-defined groups (i.e. PDO Hrvatsko Podunavlje and PDO Prigorje-Bilogora). A statistically significant classification of samples according to PDO was obtained only for  $\delta^{18}\text{O}$  and Sn.

The obtained results showed that the relationships between the isotopic ratios and concentrations of different considered elements combined with appropriate statistical model represent a powerful tool in discrimination of wines produced in different Croatian winegrowing areas, zones, regions and PDOs, and represent significant indicators of wine authenticity according to the geographical origin. The results indicate that the proposed methodology is a valuable tool that could add value to Croatian wines, emphasizing the importance of wine authenticity, especially in light of the growing tourism industry and growing awareness of the importance of enology as an economic activity.

**Keywords:** Croatian wines fingerprint, geographical origin, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, isotope ratio mass spectrometry, macro- and microelements, stable isotopes

## POPIS SLIKA

- Slika 1. Vinogradarske zone Hrvatske. Kontinentalna Hrvatska = zona B (Središnja bregovita Hrvatska) + zona CI (Slavonija i hrvatsko Podunavlje). Primorska Hrvatska = zona CII = Hrvatska Istra i Kvarner + Dalmacija. Sivo područje nije vinogradarska regija. (Uredba (EU) 1308/2013 Dodatak I; (Leder i sur., 2021).
- Slika 2. Spektrometar optičke emisije induktivno spregnute plazme u laboratoriju HAPIH-CVVU. Vlastita fotografija.
- Slika 3. Automatizirani sustav za destilaciju (lijevo) i automatski volumetrijski titrator po Karl Fischer (desno) u laboratoriju HAPIH-CVVU. Vlastita fotografija.
- Slika 4. Analizator elemenata u laboratoriju HAPIH-CVVU. Vlastita fotografija.
- Slika 5. Maseni spektrometar IRMS u laboratoriju HAPIH-CVVU. Detektor Delta V Plus (lijevo dolje) i periferna jedinica za pripremu i uvođenje plina (desno gore). Vlastita fotografija.
- Slika 6. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka (A) i varijabli (B - omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije 22 elementa) na faktorske ravnine PC1xPC3, razlikovanih obzirom na način proizvodnje vina (autentična i konvencionalna vina).
- Slika 7. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka i varijabli (omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije 22 elementa) na faktorske ravnine PC1xPC2 (A – uzorci, C – varijable) i PC1xPC3 (B - uzorci, D - varijable).
- Slika 8. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3, razlikovanih obzirom na zemljopisna područja: kontinentalna i primorska Hrvatska.
- Slika 9. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3 razlikovanih s obzirom na vinogradarske zone B, CI i CII.
- Slika 10. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3, razlikovanih s obzirom na vinogradarske regije uzgoja.
- Slika 11. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3, razlikovanih s obzirom na ZOI.
- Slika 12. Projekcija uzoraka (n = 190) razlikovanih obzirom na regiju u ravninama definiranim standardiziranim kanoničkim funkcijama Root 1, Root 2 i Root 3. Kontinentalno područje = zona B (Središnja bregovita Hrvatska) + zona CI

(Slavonija i Hrvatsko Podunavlje), Primorsko područje = zona CII (Hrvatska Istra i Kvarner + Dalmacija).

Slika 13. Projekcija uzoraka ( $n = 141$ ) razlikovanih obzirom na ZOI u ravninama definiranim standardiziranim kanoničkim funkcijama Root 1, Root 2 i Root 3. ZOI zone B: Prigorje-Bilogora, Zagorje-Međimurje. ZOI zone CI: Slavonija, Hrvatsko Podunavlje. ZOI zone CII: Hrvatska Istra, Srednja i južna Dalmacija.



## POPIS TABLICA

- Tablica 1. Stabilni izotopi koji se najčešće koriste pri utvrđivanju autentičnosti hrane, njihova zastupljenost u prirodi, te međunarodno priznati standardi za analizu (Ghidini i sur., 2006).
- Tablica 2. Broj analiziranih uzoraka vina prema zemljopisnom podrijetlu (zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja, te zaštićene oznake izvornosti - ZOI), načinu proizvodnje (autentična - A ili konvencionalna - C), godinu berbe (2015. i 2016.) i sortimentu (autohtone sorte označene su zvjezdicom\*).
- Tablica 3. Standardne otopine elemenata analiziranih ICP-OES-om.
- Tablica 4. Koncentracije matičnih otopina (MO), standardnih kalibracijskih otopina (C1, C2, C3, C4 i C5), te kontrolne otopine (QC) korištene za analize ICP-OES-om.
- Tablica 5. Postavke spektrometra optičke emisije induktivno spregnute plazme.
- Tablica 6. Rezultati validacije metode za određivanje elemenata ICP-OES metodom (linearnost, kalibracijski raspon, granice detekcije i kvantifikacije, ponovljivost, intermedijarna prediznost i točnost).
- Tablica 7. Rezultati validacije metode za pripremu uzorka za određivanje  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (ponovljivost određivanja vode u destilatu, ponovljivost određivanja alkoholne jakosti destilata i ponovljivost iskorištenja destilacije uzorka),
- Tablica 8. Rezultati validacije IRMS metode za određivanje omjera stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (linearnost, ponovljivost, intermedijarna preciznost i točnost).
- Tablica 9. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina ( $n = 190$ ).
- Tablica 10. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na boju vina.
- Tablica 11. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na godinu berbe.
- Tablica 12. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na način proizvodnje.
- Tablica 13. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na zemljopisna područja.

- Tablica 14. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na vinogradarske zone uzgoja.
- Tablica 15. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na vinogradarske regije uzgoja.
- Tablica 16. Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na ZOI.
- Tablica 17. Pearsonovi koeficijenti korelacije među rezultatima mjerenja određivanih elemenata, te izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .
- Tablica 18. Svojstveni vektori (SV) korelacijskog matriksa za sve uzorke ( $n=190$ ) dobiveni analizom glavnih komponenata (PCA) za prvih 7 faktora (PC1-PC7 sa svojstvenim vrijednostima korelacijskog matriksa  $> 1$ ), ukupna varijabilnost (UV, %) za sve uzorke i ukupna varijabilnost (VV, %) dobivena krosvalidacijom. Značajne varijable ( $p$ -vrijednosti  $< 0,05$ ) su istaknute crveno.
- Tablica 19. PC1 – PC8 sa svojstvenim vrijednostima korelacijskog matriksa  $> 1$ , ukupnom varijancom, kumulativnim svojstvenim vrijednostima i kumulativnom varijancom za autentične uzorke ( $n = 78$ ), konvencionalne uzorke ( $n = 112$ ) i za sve uzorke ukupno ( $n = 190$ ).
- Tablica 20. Multivarijatan test značajnosti (Wilksov lambda test, crveno su označeni rezultati s  $p < 0,05$ ) efekata/utjecaja koncentracija određivanih elemenata, te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika na zemljopisno podrijetlo (zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja, te ZOI).
- Tablica 21. Klasifikacijska matrica dobivena GDA-om s udjelom ispravno klasificiranih uzoraka (%) obzirom na zemljopisno podrijetlo (područja, zone, regije i ZOI).

## POPIS KRATICA

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	omjer izotopa ugljika 13 i ugljika 12 za dani uzorak
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	omjer izotopa kisika 18 i kisika 16 za dani uzorak
GISP	certificirani referentni materijal (engl. <i>Greenland Ice Sheet Precipitation</i> )
IAEA	Međunarodna agencija za atomsku energiju (engl. <i>International Atomic Energy Agency</i> )
IRMM	Institut za referentne materijale i mjerenja (engl. <i>Institute for Reference Materials and Measurements</i> )
IRMS	spektrometar masa omjera stabilnih izotopa (engl. <i>Isotope Ratio Mass Spectrometer</i> )
Max.	maksimum
Min.	minimum
$m/z$	omjer mase i naboja
QC	uzorak za kontrolu kvalitete mjerenja (engl. <i>Quality Control</i> )
RS	radni standard
SLAP	certificirani referentni materijal (engl. <i>Standard Light Antarctic Precipitation</i> )
SNIF-NMR	frakcioniranje prirodnog izotopa na specifičnom položaju u molekuli određenog metodom nuklearne magnetne rezonancije
Sred. vr.	Srednja vrijednost, prosječna vrijednost
Stend. dev.	Standardna devijacija, standardno odstupanje
VSMOW	certificirani referentni materijal (engl. <i>Vienna Standard Mean Ocean Water</i> )
V-PBD	certificirani referentni materijal (engl. <i>Vienna Pee Dee Belemnite</i> )
$\delta^{13}\text{C}$	sadržaj izotopa ugljika 13 ( $^{13}\text{C}$ ) izražen u promilima (‰)
$\delta^{18}\text{O}$	sadržaj izotopa kisika 18 ( $^{18}\text{O}$ ) izražen u promilima (‰)

# Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	OPĆI DIO.....	4
2.1	Zemljopisna područja uzgoja vinove loze Republike Hrvatske .....	5
2.2	Autentičnost vina .....	8
2.3	Metode utvrđivanja autentičnosti vina .....	10
2.3.1	Metode „otiska prsta“ .....	10
2.3.2	Kemometrijske metode .....	13
2.3.3	Metode atomske spektroskopije.....	15
2.3.3.1	Metode određivanja udjela makro- i mikroelemenata .....	16
2.3.3.2	Metode određivanja omjera stabilnih izotopa.....	25
2.3.3.3	Zajednička primjena metoda za određivanje udjela makro- i mikroelemenata i omjera stabilnih izotopa .....	33
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	37
3.1	Materijali.....	38
3.1.1	Uzorci vina .....	38
3.1.2	Kemikalije .....	40
3.1.2.1	Kemikalije za analize makro- i mikroelemenata ICP-OES tehnikom.....	40
3.1.2.2	Kemikalije za analize omjera stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .....	41
3.1.2.3	Kemikalije za analize omjera stabilnih izotopa $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .....	42
3.1.3	Instrumenti i pribor .....	42
3.1.3.1	Instrumenti i pribor za analize makro- i mikroelemenata ICP-OES tehnikom.....	42
3.1.3.2	Instrumenti i pribor za pripremu uzorka za analize omjera stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .....	43
3.1.3.3	Instrumenti i pribor za analize omjera stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .....	44
3.1.3.4	Instrumenti i pribor za analize omjera stabilnih izotopa $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .....	44
3.2	Metode rada .....	46
3.2.1	ICP-OES metoda određivanja 22 elementa .....	46
3.2.1.1	Priprema uzorka za određivanje elemenata .....	46
3.2.1.2	Identifikacija i kvantifikacija elemenata .....	46
3.2.1.3	Postavke spektrometra optičke emisije induktivno spregnute plazme .....	47
3.2.2	IRMS metode određivanja omjera stabilnih izotopa.....	47
3.2.2.1	Priprema uzorka za određivanje omjera izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .....	48
3.2.2.2	Određivanje omjera izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .....	48
3.2.2.3	Određivanje omjera izotopa kisika $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .....	49

3.2.3	Validacija primijenjenih analitičkih metoda .....	51
3.2.4	Statistička obrada podataka .....	52
4.	REZULTATI .....	53
4.1	Rezultati validacije metoda za određivanje elemenata (ICP-OES) te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika (IRMS).....	54
4.2	Rezultati mjerenja koncentracija određivanih elemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika.....	56
4.3	Utjecaj boje vina, godine berbe, načina proizvodnje te zemljopisnoga podrijetla na koncentracije određivanih elemenata te omjere stabilnih izotopa ugljika i kisika.....	57
4.4	Koeficijenti korelacije među rezultatima mjerenja koncentracija određivanih elemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika .....	68
4.5	Analiza glavnih komponenata (PCA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranje) hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te zaštićene oznake izvornosti (ZOI). .....	69
4.6	Opća diskriminantna analiza (GDA) za razlikovanje hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te ZOI.....	75
5.	RASPRAVA .....	79
5.1	Validacija primijenjenih analitičkih metoda.....	80
5.2	Koncentracije određivanih elemenata te omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika .....	82
5.2.1	Omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika .....	82
5.2.2	Koncentracije makroelemenata .....	84
5.2.3	Koncentracije mikroelemenata .....	86
5.3.4	Koncentracije ultra mikroelemenata.....	90
5.3	Utjecaj boje vina, godine berbe, načina proizvodnje te zemljopisnoga podrijetla na određivane elemente te omjere stabilnih izotopa ugljika i kisika. ....	92
5.4	Koeficijenti korelacije među rezultatima mjerenja koncentracija određivanih elemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika .....	104
5.5	Analiza glavnih komponenata (PCA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranja) hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te ZOI.....	106
5.6	Opća diskriminantna analiza (GDA) za razlikovanje hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te ZOI.....	111
6.	ZAKLJUČCI .....	116
7.	LITERATURA .....	119
8.	ŽIVOTOPIS .....	140

## **1. UVOD**

Patvorenje hrane i pića rastući je globalni problem. Svijest potrošača o važnosti sigurnosti i zdravstvene ispravnosti hrane također je posljednjih godina u stalnom porastu kao i aktivnosti koje uključuju patvorenje prehrambenih proizvoda radi ekonomske dobiti. To je potaknulo razvoj sofisticiranih analitičkih postupaka za određivanje kvalitativnih i kvantitativnih sastojaka hrane, patogenih mikroorganizama, alergena, ostataka pesticida i toksina, te za utvrđivanje sljedivosti sukladno zemljopisnom i botaničkom podrijetlu. Razvijaju se analitičke tehnike i metode za utvrđivanje patvorenja hrane i pića, koje se vrlo često nazivaju metode otiska prsta (engl. *fingerprinting methods*).

Glavni preduvjet razvoja analitičkih postupaka za pronalaženje jedinstvenih kemijskih pokazatelja autentičnosti vina u smislu zemljopisnoga podrijetla je da se kemijski sastav vina iz različitih zemalja ili regija, odnosno zaštićenih oznaka izvornosti može sistematično razlikovati. Razlike moraju biti dovoljno velike da nadmaše varijacije u tehnološkim postupcima koji se primjenjuju u proizvodnji.

Zbog velikih mogućih različitosti botaničkog i zemljopisnoga podrijetla te primijenjenih tehnoloških postupaka proizvodnje uglavnom se analitičke tehnike kombiniraju i primjenjuju zajedno s kemometrijskim metodama da bi se razvili statistički modeli kojima se može klasificirati podrijetlo vina.

Različite tehnike temeljene na atomskoj spektroskopiji trenutačno predstavljaju neke od alata za utvrđivanje autentičnosti prehrambenih proizvoda koji najviše obećavaju. Kao najčešće ispitivani pokazatelji za autentifikaciju vina posebno se ističu anorganski elementi i stabilni izotopi uz kemometrijske metode multivarijatne statistike.

Atomska spektroskopija obuhvaća analitičke tehnike koje se uglavnom temelje na razgradnji uzorka na ione nakon čega se spektroskopski određuju njihove koncentracije. Jedna od tehnika primijenjenih u ovome radu je ICP-OES (engl. *Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy*) kod koje se uzorak podvrgava vrlo visokim temperaturama koje uzrokuju disocijaciju na atome i pojavu pobuđivanja i ionizacije atoma u uzorku. Ioni prilikom povratka u osnovno stanje emitiraju određenu količinu elektromagnetskog zračenja čiji se intenzitet pri specifičnoj valnoj duljini mjeri i koristi za određivanje koncentracije pojedinog elementa. Druga analitička tehnika koja se koristi u ovome radu je IRMS (engl. *Isotope Ratio Mass Spectroscopy*) za mjerenje omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . U oba slučaja se mjeri zastupljenost glavnih masenih izotopomera ugljičnog dioksida 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ), 45 ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  i  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ ) i 46 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ), koje rezultiraju iz mogućih kombinacija

izotopa  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{12}\text{C}$ , a određuje se iz ionskih struja mjerenih pomoću tri različita kolektora izotopnog masenog spektrometra.

Poznavanje udjela makro- i mikroelemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  može poslužiti kao osnova za utvrđivanje zemljopisnoga podrijetla vina, a njihovim se određivanjem omogućuje uspostavljanje „otiska prsta“ utemeljenog na kemijskim svojstvima i stvara veza između vina i njihovog zemljopisnoga podrijetla.

Zahvaljujući globalizaciji i brznoj dostupnosti informacija, slučajevi patvorenja hrane i pića koji se objavljuju u medijima mogu imati dalekosežne posljedice. Aktivnosti povezane s patvorenjem vina i otkrivanjem istoga moguće je pratiti na internetskom portalu Zajedničkog istraživačkog centra (EC, 2018), kao na primjer slučaj francuskog proizvođača vina Medoc koji je optužen za nedozvoljeno dodavanje šećera u mošt prije početka fermentacije. Radilo se o 397 hektolitara vina berbe 2016. godine vrijednosti 2,3 milijuna eura.

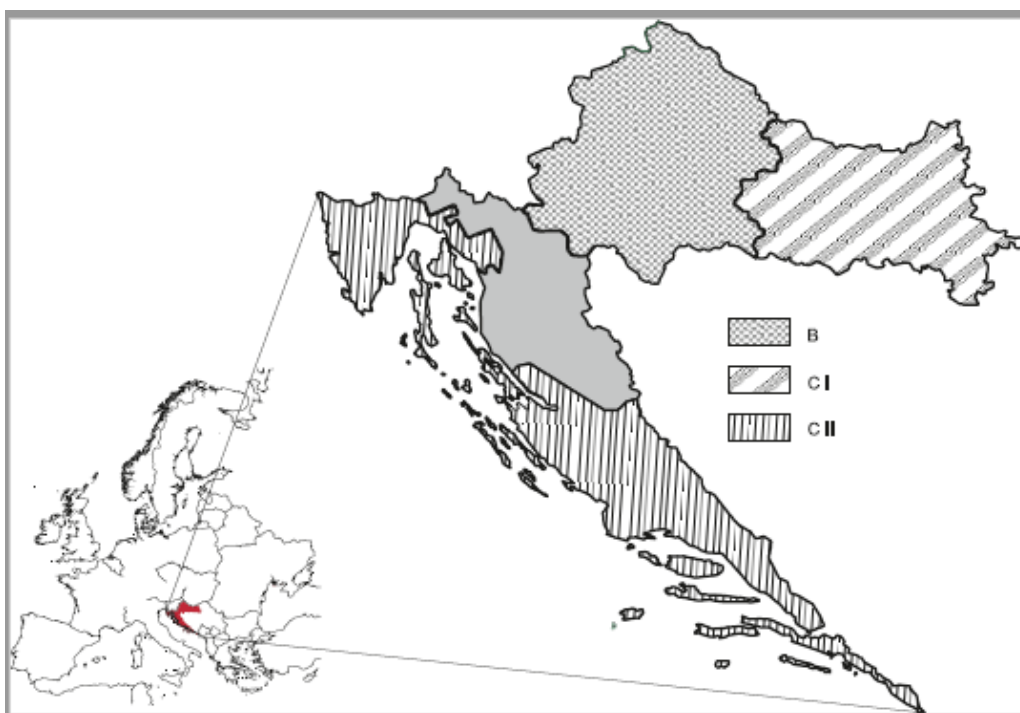
Velika raznovrsnost vinogradarskih regija i podregija Hrvatske omogućuje proizvodnju grožđa i vina posebnih, svojstvenih karakteristika. Cilj je ovoga rada utvrditi postoji li razlika između hrvatskih vina iz različitih vinorodnih područja, vinogradarskih zona, regija i podregija s pripadajućim oznakama izvornosti. U tu svrhu primjenjene su ICP-OES tehnika za određivanje udjela makro- i mikroelemenata te IRMS tehnika za analize stabilnih izotopa ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Navedenim su tehnikama analizirane dvije grupe uzoraka iz hrvatskih vinogradarskih regija, od kojih jednu čine konvencionalno proizvedena vina, a drugu tzv. autentični uzorci vina proizvedeni mikroviniifikacijom sukladno Provedbenoj uredbi (EU) 2018/274 radi popunjavanja izotopne banke podataka Europske Unije. Dobiveni podaci obrađeni su pomoću deskriptivne statističke analize te je provedena analiza varijance (GLM-ANOVA, engl. *General Linear Model – Analysis of Variance*) i post hoc Tukey test nakon čega su uslijedile dvije metode multivarijatne statističke analize: analiza glavnih komponenta (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) i opća diskriminantna analiza (GDA, engl. *General Discriminant Analysis*) kako bi se ustanovila sposobnost dobivenih podataka za razlikovanje uzoraka iz različitih vinorodnih područja, zona i regija Hrvatske te odabranih zaštićenih oznaka izvornosti.



## **2. OPĆI DIO**

## 2.1 Zemljopisna područja uzgoja vinove loze Republike Hrvatske

Prema Zakonu o vinu (NN 32/19), zemljopisna područja uzgoja vinove loze Republike Hrvatske dijele se na: vinogradarske zone, regije, podregije, vinogorja i vinogradarske položaje. Vinogradarska zona je vinorodno područje koje karakteriziraju slični klimatski uvjeti te za koju su u skladu s Uredbom Europske unije 1308/2013 utvrđeni posebni enološki postupci u granicama vinogradarskih zona A, B, C I, C II, C III (a) i C III (b). Republika Hrvatska dijeli se u tri vinogradarske zone (B, CI i CII) i četiri vinogradarske regije, od kojih su dvije u kontinentalnom (Slavonija i hrvatsko Podunavlje i Središnja bregovita Hrvatska), a dvije u primorskom području (Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija). Sukladno Uredbi (EU) 1308/2013, Dodatak I, u Republici Hrvatskoj zona B odgovara regiji Središnje bregovite Hrvatske, zona CI odnosi se na regiju Slavonije i hrvatskog Podunavlja, a zona CII obuhvaća dvije vinske regije: Hrvatska Istra i Kvarner i Dalmacija (Slika 1).



**Slika 1.** Vinogradarske zone Hrvatske. Kontinentalna Hrvatska = zona B (Središnja bregovita Hrvatska) + zona CI (Slavonija i hrvatsko Podunavlje). Primorska Hrvatska = zona CII = Hrvatska Istra i Kvarner + Dalmacija. Sivo područje nije vinogradarska regija.  
(Uredba (EU) 1308/2013 Dodatak I; (Leder i sur., 2021)

Podjelu vinogradarskih područja u navedene zone omogućila je Winklerova metoda (Winkler, 1974) kojoj je cilj utvrđivanje osnovnih podataka o mogućem uspješnom uzgoju neke sorte u određenim klimatskim uvjetima. Ova metoda se temelji na izračunu sume efektivnih temperatura uz pretpostavku da vinova loza ne raste ako je temperatura ispod 10 °C. Svakom danu tijekom vegetacijske sezone dodjeljuju se dnevni stupnjevi rasta (GDD, engl. *growing degree-days* ili winklerov indeks, WI) koji se izračunavaju prema sumi efektivnih temperatura (iznad 10 °C) u svakom od sedam mjeseci vegetacije (na sjevernoj hemisferi je to od 1. travnja do 31. listopada bez obzira na stvarni početak ili završetak vegetacije) prema izrazu:

$$WI = \Sigma \left( \frac{T_{max} + T_{min}}{2} \right) - 10^{\circ}C \quad (1)$$

gdje je:

$T_{max}$ .....maksimalna dnevna temperatura

$T_{min}$ .....minimalna dnevna temperatura

GDD ili bioklimatski Winklerov indeks daje informaciju o količini akumulirane topline za vrijeme trajanja vegetacijske sezone. Prema ovoj su metodi zemljopisna područja podijeljena u pet klimatskih Winklerovih regija u kojima su GDD sljedeći: regija I (< 1390), regija II (1391 - 1670), regija III (1671 - 1940), regija IV (1941 - 2220), regija V (> 2220).

Sukladno članku 30. Zakona o vinu (NN 32/19) u odnosu na zemljopisna područja uzgoja vinove loze u Republici Hrvatskoj mogu se utvrditi zaštićene oznake izvornosti (ZOI) na razini vinogradarske podregije, vinogorja i vinogradarskog/vinogradarskih položaja te zaštićene oznake zemljopisnoga podrijetla (ZOZP) na razini vinogradarske regije.

Baza podataka eAmbrosia obuhvaća registar oznaka izvornosti i oznaka zemljopisnoga podrijetla zaštićenih u Uniji te popise oznaka zemljopisnoga podrijetla i naziva podrijetla iz zemalja izvan Unije koje su zaštićene u Uniji u okviru bilateralnih sporazuma o trgovini vinom.

U bazi eAmbrosia navedeno je sedamnaest ZOI u Republici Hrvatskoj:

- Dalmatinska zagora
- Dingač
- Hrvatsko primorje
- Istočna kontinentalna Hrvatska
- Hrvatska Istra
- Moslavina

- Plešivica
- Ponikve
- Hrvatsko Podunavlje
- Pokuplje
- Prigorje-Bilogora
- Primorska Hrvatska
- Sjeverna Dalmacija
- Slavonija
- Srednja i Južna Dalmacija
- Zagorje-Međimurje
- Zapadna kontinentalna Hrvatska

U bazi eAmbrosia nije registrirana niti jedna zaštićena oznaka zemljopisnoga podrijetla.

Navedene ZOI podudaraju se s vinogradarskim regijama odnosno podregijama navednim u Listi zemljopisnih oznaka (NN 64/17).

## 2.2 Autentičnost vina

Prava potrošača za dobivanje istinitih informacija o hrani koju kupuju navedena su u Uredbi 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane. Ona ima za cilj sprječavanje prijevornih i obmanjujućih postupaka, krivotvorenja i svih ostalih postupaka koji mogu dovesti potrošača u zabludu. Primjer uobičajene prijevare je zamjena jednog sastojka sličnim jeftinijim koji će potrošač teško prepoznati ili kojega je teško otkriti klasičnim analitičkim tehnikama. Osim toga, takvi dodaci mogu predstavljati i rizik za zdravlje potrošača, stoga je mogućnost utvrđivanja autentičnosti i sljedivosti prehrambenih proizvoda od velike važnosti u prehrambenoj industriji, ne samo zbog ekonomskih nego i sigurnosnih razloga (Reid i sur., 2006).

Svijest potrošača o važnosti sigurnosti hrane kontinuirano se povećava posljednjih godina, kao i aktivnosti koje uključuju patvorenje prehrambenih proizvoda radi ekonomske koristi (Bong i sur., 2012; Chua i sur., 2012). Slijedeći ove trendove, analitičke metode za utvrđivanje autentičnosti prehrambenih proizvoda, uključujući vino, također se neprestano razvijaju i u skladu s tim nadograđuju (Šelih i sur., 2014; Luykx i Van Ruth, 2008). Razvijaju se i odgovarajuće kemometrijske metode analiza podataka dobivenih tim metodama, kako za vino (Kokkinofita i sur., 2017; Camin i sur., 2015; Dordevic i sur., 2013) tako i za druge vrste hrane, npr. med (Soares i sur., 2017), sir (Vargas-Bello-Pérez i sur., 2018) i meso (Miedico i sur., 2017).

U izvještaju OIV-a (franc. *Office international de la Vigne et du Vin* - OIV) o stanju vinogradarskog i vinarskog sektora iz 2021. godine (OIV, 2021a), koji obuhvaća razdoblje od 2000. do 2020. godine, prikazani su trendovi i promjene ukupnih površina vinograda, proizvodnje i potrošnje vina te međunarodne trgovine vinom. Procijenjeno je da je u svijetu 2020. godine bilo oko 7,3 milijuna hektara pod vinogradima te da je iste godine proizvedeno oko 260 milijuna hektolitara vina. Svjetska potrošnja vina je u 2020. godini procijenjena na 234 milijuna hektolitara, a međunarodna trgovina vinom na 105,8 milijuna hektolitara, što u vrijednosti iznosi oko 29,6 milijardi eura. Prikazana svjetska potrošnja i trgovina vinom u promatranom razdoblju od dvadeset godina ukazuje na ekonomsku snagu ovoga sektora i potrebu za osiguranjem autentičnosti vina kao izuzetno bitnoga poljoprivrednog i prehrambenog proizvoda.

Patvorenje vina može predstavljati veliki ekonomski problem i to posebice za zemlje koje su najveći svjetski proizvođači vina: Italija, Francuska i Španjolska zajedno su u 2020. godini proizvele 53 % svjetske proizvodnje vina (OIV, 2021a).

Zbog ekonomskog je značaja vino i u prošlosti bilo često patvoreno. Lachenmeier (2016) navodi primjerice da su u 19. stoljeću vinu bile dodavane aluminijske soli radi bistrenja ili ekstrakti bobičastog voća za poboljšanje boje crnih vina. Odležavanje vina u bačvama simulirano je dodavanjem hrastove piljevine, što je preteča suvremene metode dodatka hrastovog čipsa. Primjenjivane su i metode štetne po zdravlje, kao što je dodavanje soli olova radi bistrenja i zaslađivanja. Najzastupljeniji način patvorenja vina u Francuskoj devetnaestog stoljeća bilo je dodavanje vode i šećera (Stanziani, 2007).

Usporedno s razvojem metoda analitičke kemije kojima se omogućilo utvrđivanje ovakvih modifikacija vina, razvijali su se i načini patvorenja te su postajali sve rafiniraniji. Tako je u novije doba najpoznatiji slučaj skandala u Austriji iz 1985. godine, kada je vinu dodan dietilen glikol za povećanje slatkoće (Tagliabue, 1985), zbog čega je reputacija austrijskih vina u narednom razdoblju bila narušena.

Prema Holmbergu (2010) se prijevare u vinarskom sektoru mogu podijeliti u nekoliko glavnih kategorija:

- Pogrešno označavanje zemljopisnog podrijetla vina, kategorije kvalitete i/ili godine berbe – ovo je najčešći oblik prijevare, kod kojega se u lancu preprodaje u svakom koraku proizvod označava boljim nego što jest. Ovdje nema opasnosti po zdravlje potrošača, već se samo vino niže cijene i lošije kvalitete prodaje kao kvalitetnije i skuplje.
- Proizvodnja „umjetnog“ vina – proizvodnja vina isključivo iz aditiva i vode, što je zapravo rijetko, a povezano je s problemom alergijskih reakcija na korištene aditive.
- Pojačavanje vina – uglavnom se provodi dodatkom šećera, glicerola, dietilen glikola ili drugih zaslađivača te aroma ili miješanjem s drugim vinima. Ovaj način patvorenja predstavlja obmanjivanje i prijevaru potrošača, ali ukoliko se radi o dodatku toksične tvari, kao što je to metanol, može biti ugroženo i njihovo zdravlje.

Većina istraživanja usredotočena je na mogućnosti otkrivanja partvorenja u smislu kemijskog sastava vina, dok su općenitija istraživanja prirode i opsega prijevara vezana uz proizvodnju i trgovinu vinom ograničena. Krivotvorenje ili patvorenje kod vina odnosi se često na ilegalne tehnike kojima je cilj zamijeniti jednu vrijednu komponentu jeftinijom kako bi se

povećala dobit, što utječe na konačnu slika proizvoda promjenom kemijskog sastava i senzornih svojstava vina (Holmberg i sur., 2010).

Vino je proizvod koji se relativno jednostavno patvori dodavanjem šećera i/ili vode, kao i namjernim pogrešnim označavanjem podrijetla radi ekonomske dobiti (Geana i sur, 2016a; Dordevic i sur., 2013; Košir i sur., 2001).

Autentičnost i komercijalna vrijednost vina često su povezane sa zemljopisnim podrijetlom, a neke su zemlje ili regije poznate po proizvodnji vina visoke komercijalne vrijednosti (Luykx i Van Ruth, 2008). Stoga je uporaba analitičkih metoda za provjeru deklariranog sastava i podrijetla od velikog interesa kako za proizvođače vina, tako i za potrošače (Kokkinofita i sur., 2014; Christoph i sur., 2006). Ovo se također sve više prepoznaje u Hrvatskoj (Leder i sur., 2021., Žurga i sur., 2019; Lukić i sur., 2017; Rešetar i sur., 2016; Leder i sur., 2015; Čačić i sur., 2011; Rastija i sur., 2009), gdje vinogradarstvo i vinarstvo predstavlja značajnu gospodarsku aktivnost, posebno vezanu uz rastuću turističku industriju (Hanžek i Sušić, 2019).

Autentičnost je vina moguće utvrditi određivanjem raznih kemijskih tvari koje u vinu variraju ovisno o zemljopisnom području, sorti i berbi upravo stoga što vina istoga podrijetla, sorte i berbe imaju određeni stupanj sličnosti. Na temelju ovih karakteristika znanstvenici su kontinuirano poboljšavali i razvijali inovativne tehnike i metode kojima je omogućena učinkovita i točna identifikacija autentičnosti vina. Posljednjih su se godina podrijetlo i patvorenje vina uglavnom utvrđivali analizom elemenata, izotopa, fenolnih spojeva, komponenti arome, organskih kiselina, aminokiselina i drugih kemijskih tvari u vinu. Pri tome su primijenjivane razne tehnike identifikacije, uključujući tehnike masene spektrometrije, spektroskopske i kromatografske tehnike, upotpunjene odgovarajućim kemometrijskim metodama (Sun i sur., 2021).

## **2.3 Metode utvrđivanja autentičnosti vina**

### **2.3.1 Metode „otiska prsta“**

Iako se tradicionalne metode temeljene na tzv. mokroj kemiji još uvijek koriste, pojavljuju se novi pristupi utvrđivanju autentičnosti hrane koji omogućuju rješavanje slučajeva prijevare koje klasične metode ne uspijevaju otkriti. U takve nove pristupe ubraja se i metabolomika koja omogućuje proučavanje metabolita u stanici, tkivu ili organizmu. Istraživanja koja uključuju metabolomiku uglavnom se mogu podijeliti na dva tipa, od kojih se

kod jednog primjenjuju metode za profiliranje metabolita analizama pojedinih grupa spojeva, a kod drugog metode za utvrđivanje metaboličkog „otiska prsta“. Kod ovog drugog pristupa nije namjera identificirati svaki opaženi metabolit, već usporediti uzorke ili „otiske pristiju“ metabolita koji se mijenjaju pod utjecajem bolesti te okolišnih ili genetskih promjena (Dettmer i sur., 2007; Hall 2006).

Napredak analitičkih tehnika kao što su to UHPLC (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) i HR-MS (engl. *High-Resolution Mass Spectrometry*) uz primjenu softverskih progama kojima se obrađuju velike količine podataka, omogućio je brzi razvoj metabolomike u posljednjih desetak godina (Wolfender i sur., 2013). Raznolikost kemijskih struktura, veliki raspon koncentracija u kojima su metaboliti prisutni u matricama i mogućnosti analitičkih tehnika predstavljaju izazove na koje se pokušava odgovoriti metabolomikom i metodama otiska prsta. Metode otiska prsta uključuju razne vibracijske spektroskopske tehnike (infracrvena i Raman spektroskopija), nuklearnu magnetsku rezonanciju (engl. *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)), lepeznu tehniku temeljenih na masenoj spektroskopiji te kromatografske tehnike uključujući plameno ionizirajući i ostale detektore (Cubero-Leon i sur., 2014). Ova grupa autora u svom preglednom radu navodi i desetke istraživanja koja su provedena raznim analitičkim tehnikama s ciljem utvrđivanja pojedinih aspekata autentičnosti prehrambenih proizvoda kao što su to med, ulje, vino, jaka alkoholna pića, ocat, kava, čaj, mlijeko i mliječni proizvodi, meso, riba, plodovi mora, voće i povrće te sokovi. Kao jednu od značajnih karakteristika ovih istraživanja istaknuli su relativno mali broj ispitivanih uzoraka, a da bi primijenjene tehnike mogle biti rutinski korištene radi utvrđivanja autentičnosti potrebno je uspostaviti velike baze podataka koje uzimaju u obzir veću varijabilnost. Dakle, skupovi uzoraka moraju uključivati varijacije prisutne u stvarnom životu da bi se pojedina metoda mogla koristiti kao rutinska kontrola.

U razvoju modela zemljopisne sljedivosti potrebno je razumjeti je li vrijednost praćenih pokazatelja povezana s njihovim podrijetlom te utječu li na njih i ‘vanjski čimbenici’ kao oni koji dolaze iz njegove proizvodnje (Durante i sur., 2018). Također se razvoj robustnih klasifikacijskih kemometrijskih modela mora temeljiti na dobro osmišljenim eksperimentalnim studijama koje uključuju sve izvore varijacija (individualna varijabilnost, sorta, pasmina, hranidba, gnojidba, zemljopisni položaj, klima itd.). U tome je smislu primjena metabolomike još uvijek u začetku. Kako bi se kreirali modeli s globalnom primjenjivosti, potrebne su velike studije kod kojih se prikupljanje uzoraka i analize provode kroz dulje razdoblje na različitim lokacijama (Capuano i sur., 2013).



Pristup utvrđivanja autentičnosti vina primjenom metabolomike naročito se pokazao korisnim u istraživanjima u kojima je korištena  $^1\text{H-NMR}$  ili proton-NMR spektroskopija u kombinaciji s multivarijantnim statističkim metodama. Na ovaj je način provedena karakterizacija vina različitih sorata i zemljopisnoga podrijetla (Son i sur., 2009a; Son i sur., 2009b; Son i sur., 2008). Son i suradnici (2008) su proveli proton-NMR profiliranje vina sorata Campbell Early, Cabernet Sauvignon i Shiraz proizvedenih u Francuskoj, Kaliforniji, Australiji i Koreji. Prikladnim statističkim metodama, PCA i PLS-DA (engl. *Partial Least Squares Discriminant Analysis* – PLS-DA), ustanovljene su značajne razlike obzirom na sortu, a metaboliti koji su najviše tome doprinijeli bili su: 2,3-butandiol, mliječna kiselina, octena kiselina, prolin, sukcininska kiselina, jabučna kiselina, glicerol, vinska kiselina, glukoza i fenolni spojevi. Također su razdvojena vina sorte Cabernet Sauvignon proizvedena u Australiji, Francuskoj i Kaliforniji. Ustanovljeno je i da je udio prolina u kalifornijskom Cabernet Sauvignonu viši nego u australskom i francuskom, odnosno australskom Shirazu i korejskom Campbell Earlyu, što dovodi do zaključka da kemijski sastav bobice grožđa ovisi o sorti i regiji uzgoja. Ova studija naglašava primjenjivost metabolomike temeljene na NMR profiliranju uz multivarijantne statističke metode u određivanju kvalitete i podrijetla vina.

Louw i suradnici (2009) proveli su karakterizaciju odabranih mladih južnoafričkih vina pomoću FTMIR spektroskopije (engl. *Fourier Transform Mid-Infra Red* – FTMIR), plinske kromatografije i multivarijantne analize podataka. Analizirano je 496 monosortnih uzoraka vina berbi 2005. i 2006. Sorte su bile: Sauvignon Blanc, Chardonnay, Pinotage, Merlot, Cabernet Sauvignon i Shiraz. Analizirana su mlada sortna vina da bi se eliminirale varijacije uzrokovane tehnologijom proizvodnje (miješanje sorata, dozrijevanje u hrastovim bačvama ili bocama i slično). Cilj rada bio je istražiti sastav hlapljivih spojeva i spektroskopski profil u srednjem infracrvenom području uz primjenu kemometrijskih metoda da bi se identificirali trendovi u pogledu sadržaja mjerenih spojeva i da bi se rezlikovali pojedini kultivari. Podaci dobiveni plinskom kromatografijom i FTMIR spektroskopijom obrađeni su analizom varijance te metodama PCA i linearna diskriminantna analiza (engl. *Linear Discriminant Analysis* - LDA), a dobivene su značajne razlike u hlapljivim spojevima sortnih vina. Naročito se sorta Pinotage razlikuje od ostalih crnih sorti, jer je sličnija bijelim sortama obzirom na udjele 2-feniletanola, maslačne kiseline, etil acetata, izoamil acetata, izoamilnog alkohola i izomaslačne kiseline. Također su sastav hlapljivih spojeva i FTMIR spektri doprinijeli razlikovanju sorata. Najbolja diskriminacija postignuta je između bijelih vina na temelju FTMIR spektra (točna klasifikacija za 98,3% uzoraka), dok je za crna vina postignuta najbolja diferencijacija kombinacijom spektara i hlapljivih komponenata (točna klasifikacija za 86,8% uzoraka).

Jedno od istraživanja u kojem se za metabolomičko profiliranje koristi napredna tehnika tekućinske kromatografije HPLC-QTOFMS (engl. *High Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) u kombinaciji s kemometrijskim alatima provedeno je na uzorcima crnih vina (Cabernet Sauvignon, Merlot i Pinot Noir) iz različitih zemalja (Australija, Bugarska, Češka Republika, Francuska, Njemačka, Mađarska, Čile, Italija, Makedonija, Slovačka, Španjolska i SAD) i godina berbi (2004.–2008.). Nakon statističke obrade podataka (PCA i PLS-DA) zaključeno je da HPLC tehnika u kombinaciji s masenom spektroskopijom omogućuje analize nepoznatih spojeva s ciljem utvrđivanja autentičnosti hrane, odnosno u ovom slučaju definiranje sorte vina. Autori su naglasili da za ovu namjenu primjenom HPLC-QTOFMS tehnike nije potrebna identifikacija pojedinih molekulskih obilježivača (Vaclavik i sur., 2011).

U znanstvenoj su literaturi dostupna mnoga istraživanja kojima je cilj bio utvrđivanje specifičnih obilježivača za dokazivanje sljedivosti i autentičnosti vina i grožđa. Tu su uz analize profila hlapljivih spojeva (etil estera, izoamil estera, aldehida, acetala i dr.) prisutne i analize aminokiselina (arginina, alanina, tirozina, valina i leucina) i polifenola. Istraživanjima najzastupljeniji fenolni spojevi crnih vina su antocijanini. Oni mogu biti u slobodnom obliku, kao što su to antocijanini i antocijanidini (malvidin, delphinidin, cijanidin, peonidin i petunidin) te vezani u acilnim i kumarilnim spojevima (glukozidima) (Palade i Popa, 2014).

### 2.3.2 Kemometrijske metode

Ispitivanjem vina jednom ili više instrumentalnih tehnika dobivaju se često vrlo složeni spektri i podaci pa je stoga nužno primijeniti odgovarajuće kemometrijske metode koje omogućuju odabir i obradu podataka te ekstrakciju skrivenih informacija iz kompleksnih sustava. Tako se spektri i podaci dobiveni različitim instrumentima mogu analizirati i primijeniti za što bolju diferencijaciju vina. Kemometrijske metode unaprijedile su primjenu samih analitičkih tehnika detekcije pojedinih analita i postale su esencijalni dio identifikacije vina (Sun i sur., 2021). U svrhu utvrđivanja autentičnosti vina, odnosno otkrivanja patvorenja, u znanstvenoj su literaturi primjenjivane različite kemometrijske metode, od kojih su najčešće:

- nenadzirane metode prepoznavanja uzoraka (engl. *unsupervised pattern recognition methods*) kao što su analiza klastera (engl. *Cluster Analysis - CA*) i analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis – PCA*) itd.

- nadzirane metode prepoznavanja uzoraka (engl. *supervised pattern recognition methods*), kao što su diskriminantna analiza (engl. *Discriminant Analysis – DA*), parcijalna metoda najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square Method – PLS*), umjetna neuronska mreža (engl. *Artificial Neural Network – ANN*) i sl.

Jedan od primjera istraživanja u kojem su predložene kemometrijske metode primijenjene za poboljšanje načina otkrivanja patvorenja vina je i ono provedeno na talijanskim vinima (Dordevic i sur., 2013). Autori su predložili učinkovitiju metodu za interpretaciju EU izotopne banke podataka s ciljem utvrđivanja autentičnosti vina. Primijenili su modele univarijatne (bazirane na t-testu) i multivarijatne statističke obrade podataka (bazirane na Mahalanobisovoj udaljenosti) da bi utvrdili dodatak šećera i vode vinima. U istraživanje su bili uključeni rezultati 5220 talijanskih vina iz EU izotopne baze podataka koji su prikupljeni u razdoblju od 2000-2010. Eksperimentalni se model sastojao od jednog dijela uzoraka kojima su dodane promjenljive količine šećera i vode, dok je za sve ostale uzorke patvorenje simulirano statističkim modelom prema eksperimentalnim rezultatima. Zaključeno je da učinkovitost otkrivanja patvorenja ovisi o izotopskim vrijednostima pojedinog uzorka, Mahalanobisovom udaljenosti od središta dobivenom multivarijatnom obradom te vrsti patvorenja. Koristeći informacije dostupne u europskoj banci izotopnih podataka i simuliranjem realističnih uzoraka i falsifikata, postignuta su značajna poboljšanja u otkrivanju patvorenja korištenjem multivarijatnih metoda, koje su se pokazale učinkovitijim u odnosu na univarijatne metode, tj. njihovom se primjenom može utvrditi ukupno veći broj patvorina, a i patvorenje dodatkom manjih količina šećera i vode.

Pisano i suradnici (2015) su proveli kemometrijsko modeliranje rezultata dobivenih analizom antocijanina tekućinskom kromatografijom s masenom spektroskopijom. Antocijanini su im poslužili kao markeri za klasifikaciju argentinskih vina prema botaničkom i zemljopisnom podrijetlu. Kemometrijskim modelima, koristeći multivarijatnu rezoluciju krivulje (engl. *multivariate curve resolution*), PLS i diskriminantnu rasklopljenu PLS (engl. *Discriminant Unfolded Partial Least Squares - D-UPLS*), postignuto je razlikovanje sorata Malbec, Merlot i Cabernet Sauvignon od ostalih sorata u istraživanju, a također su se i tri regije (istočna Mendoza, južna Mendoza i San Juan) razlikovale od ostalih. Za oba tipa diskriminacije odgovorni su bili sljedeći antocijanini: malvidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-(6-*O*-acetilglukozid), malvidin-3-*O*-glukozid-4-vinilgvajakol (ili malvidin-3-(6-*O*-p-kumaroilglukozid)). Ipak su najčešće u istraživanjima antocijanini korišteni kao markeri sorte vina na temelju omjera aciliranih i neaciliranih te acetiliranih i kumariliranih antocijanina, što

je otežano jer se njihovi omjeri znatno mijenjaju primjenom različitih tehnoloških postupaka kao što su primjena enzima, temperatura i trajanje maceracije (Fischer i sur., 2006).

Geana i suradnici (2016a) predstavili su model provjere patvorenja crnih vina pomoću izotopnih i kromatografskih tehnika u kombinaciji s multivarijantnim statističkim metodama interpretacije podataka. Primijenjene su LDA i standardna hijerarhijska analiza klastera (engl. *Hierarchical Cluster Analysis* - HCA). Analizirano je 29 uzoraka nabavljenih na tržištu, pakiranih u PET ambalažu. Dodatak šećera i vode dokazan je u sumnjivim uzorcima mjerenjima stabilnih izotopa  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  te je dodatno potvrđen ostalim klasičnim parametrima, kao što su to alkoholna jakost (% vol.), prisutnost 5-(hidroksimetil)-2-furaldehida (HMF) i sintetičkih zaslađivača i bojila korištenih za korekciju manjkavosti u okusu i boji vina. Dodatno je istražen i antocijaninski profil uzoraka, kao indikator autentičnosti crne boje vina, koji je uspoređen s autentičnim vinima dobivenim mikrovinifikacijom. Razni postupci patvorenja otkriveni su u osam uzoraka kojima su dodavali šećer i/ili voda te umjetna sladila. Ustanovljeno je i da razlike u udjelu među antocijaninima, kao što su delphinidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid, kao i relativni udjeli između pojedinačnih omjera antocijanina predstavljaju važne markere za razlikovanje crnih vina po kategoriji. Rezultati ove studije pokazali su da je među ispitanim stolnim vinima bilo 28% patvorenih, a kod 17% je utvrđena sumnja na patvorenje, što ukazuje na alarmantan porast nedopuštenih postupaka u vinskoj industriji poput dodavanja prirodnih ili umjetnih šećera, vode i sredstava za bojenje.

### 2.3.3 Metode atomske spektroskopije

Kao najčešće ispitivani pokazatelji za autentifikaciju hrane i vina posebno se ističu anorganski elementi i stabilni izotopi uz primjenu različitih tehnika temeljenih na atomskoj spektroskopiji (Georgiou i Danezis, 2015; Laursen i sur., 2014). Atomska spektroskopija obuhvaća više analitičkih tehnika koje omogućuju multielementne analize sastava prehrambenih proizvoda. Ove se tehnike uglavnom temelje na razgradnji uzorka (krutina ili tekućina) na ione nakon čega se spektroskopski određuju njihove koncentracije, a dijele se prema načinu atomizacije i ionizacije (plamen, pećnica, plazma) odnosno prema vrsti spektroskopije (apsorpcijska, emisijska, fluorescentna i masena). Kombinacije navedenih tehnika omogućuju brojne analitičke metode različitih mogućnosti (Laursen i sur., 2014).

Trenutačno su najčešće korištene atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS, engl. *Atomic Absorption Spectroscopy*), ICP-OES i ICP-MS. Jednu od podvrsta spektrometrije masa

u grupi tehnika atomske spektroskopije predstavlja spektroskopija masa omjera izotopa (IRMS, engl. *Isotope Ratio Mass Spectroscopy*). Većina istraživanja autentičnosti hrane u kojima se koriste analize stabilnih izotopa temelje se na IRMS analizi elemenata malih masa (Laursen i sur., 2014).

Jedna od tehnika primijenjenih u ovome istraživanju je ICP-OES kod koje se uzorak podvrgava temperaturama koje su vrlo visoke, tako da ne uzrokuju samo disocijaciju na atome, već i pojavu pobuđivanja i ionizacije atoma u uzorku. Kada se atomi i ioni jednom nađu u pobuđenom stanju, oni prilikom povratka u osnovno stanje emitiraju određenu količinu energije. Intenzitet emitirane svjetlosti pri specifičnoj valnoj duljini se mjeri i koristi za određivanje koncentracije pojedinog elementa (Boss i Freedon, 2004).

Druga analitička tehnika koja je korištena u ovome radu je IRMS, i to sa dvije konfiguracije instrumenta, za mjerenje omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Kod konfiguracije za mjerenje  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  je na IRMS spojen analizator elemenata, a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  određuje se iz ugljičnog dioksida dobivenog potpunim sagorijevanjem uzorka etanola (OIV-MA-AS312-06:R2009, OIV, 2021b) dobivenog iz vina destilacijom (OIV-MA-AS311-05:R2011, OIV, 2021b).

Kod konfiguracije za mjerenje omjera izotopa kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  na IRMS je spojena periferna jedinica za pripremu i uvođenje plina s kontinuiranim protokom, a metoda se temelji na uspostavljanju ravnoteže između omjera izotopa kisika vode sadržanih u uzorku s izotopima kisika  $\text{CO}_2$  u standardnom plinu (OIV-MA-AS2-12:R2009, OIV, 2021b).

### 2.3.3.1 Metode određivanja udjela makro- i mikroelemenata

Makro- i mikroelemente vinova loza uzima preko korijenskog sustva iz tla i raspoređuje ih u organe gdje ih koristi prema potrebi za raznovrsne životne funkcije. Oni ulaze u sastav mnogih spojeva koji čine građu biljne stanice i tako utječu na razvoj bobice grožđa. Također ulaze i u sastav mnogih spojeva koji imaju veliki utjecaj na odvijanje biokemijskih procesa u bobici. Dio ovih tvari kasnijom preradom prelazi u mošt i vino (Mullins i sur., 2007).

Sadržaj elemenata u vinu rezultat je djelovanja brojnih čimbenika i može ih se podijeliti na primarni i sekundarni sadržaj (Eschnauer, 1986). Primarni sadržaj obuhvaća elemente u vinu koji su prirodnog porijekla i na čiji se udio u vinu ne može utjecati te čine najveći udio ukupnog

sadržaja elemenata u vinu. Sekundarni sadržaj čine oni elementi koji dospijevaju u vino prirodnom ili umjetnom kontaminacijom.

Prirodna kontaminacija vezana je uz mjesto uzgoja vinove loze i ne može se izbjeći. Na nju utječu blizina mora, slanih jezera, kao i živih i ugaslih vulkana te ulaze u vino uglavnom preko površine bobica, a manje preko korijena vinove loze. Prirodni kontaminanti mogu biti aluminij, barij, bizmut, bor, olovo, fluor, mangan, stroncij i cink, i to u obliku soli ili drugih spojeva (E Schnauer, 1982).

Umjetna kontaminacija nije vezana uz prirodne uvjete uzgoja vinove loze i moguće ju je izbjeći ili barem umanjiti. Ovaj tip kontaminacije vezan je uz uvjete zagađenosti okoline zbog blizine industrije i prometnih autocesta te uz kontaminaciju u vinogradu koja obuhvaća primjenu sredstava za gnojidbu i zaštitu, zatim postupke branja grožđa, ali i kontaminaciju tijekom proizvodnje, skladištenja i distribucije vina (E Schnauer, 1982). Primjerice, fosfatna gnojiva povećavaju sadržaj kadmija, a pesticidi bakra, arsena i cinka (Pietrzak i McPhail, 2004; Ramachandran i D`Souza, 1998). Također je ustanovljeno i da sadržaj bakra u vinu značajno raste sa starosti vinograda, budući da je glavni izvor ovoga elementa uporaba sredstava za zaštitu vinove loze (Rusjan i sur., 2006). Onečišćenja okoliša koja nisu direktno povezana s vinogradarskom praksom povezana su uglavnom sa suspendiranim sitnim česticama koje mogu biti prirodnog porijekla, a uzrokuju povećanje sadržaja litofilnih elemenata (stroncija, mangana, aluminijska i titana), ili antropogenog porijekla, što dovodi do povećanja udjela olova, vanadija, cinka, nikla i kadmija (Almeida i Vasconcelos, 2003). Na sadržaj elemenata u vinu ima utjecaja i dodatak prehrambenih aditiva, primijenjena tehnologija i drugi postupci proizvodnje vina (Frias i sur., 2001; Jakubowski i sur., 1999).

Suhaj i Koreňovská u preglednom radu 2006. godine navode brojna istraživanja u kojima je udio elemenata temelj za utvrđivanje autentičnosti vina. Autori navode da neka od navedenih istraživanja datiraju čak iz sedamdesetih godina prošlog stoljeća, kao na primjer istraživanje koje su 1977. godine proveli Siegmund i Bachmann za razlikovanje 18 njemačkih vina s obzirom na udjele devet elemenata (Na, K, Rb, Cs, Cr, Fe, Co, Zn i Ag). Naveden je i primjer istraživanja iz 1979. godine u kojem su Kwan i suradnici diferencirali francuska od američkih vina na temelju 17 elemenata.

Pregledom dostupne literature može se vidjeti da određivanje elemenata radi utvrđivanja autentičnosti s vremenom ne gubi na aktualnosti, već se naprotiv broj istraživanja u ovom području povećava, što je i razumljivo jer je sastav makro- i mikroelemenata vina odraz regionalne geokemije tla, klime i tehnoloških procesa. Dobrim pokazateljima zemljopisnoga

podrijetla mogu se smatrati oni elementi koji se ne metaboliziraju niti modificiraju za vrijeme proizvodnje vina (Geana i sur., 2014). Razlikovanje vina prema regiji kroz udjele elemenata u tragovima moguće je zbog uske veze s njihovom prijenosom iz stijena u tlo te iz tla u grožđe. Na multielementni sastav vina snažno utječe topljivost anorganskih spojeva u tlu. U načelu, multielementni sastav vina odražava geokemiju tla regije uzgoja grožđa (Almeida i Vasconcelos, 2003). Međutim, čimbenici poput onečišćenja okoliša, agrotehničkih postupaka, klimatskih promjena i postupaka vinifikacije mogu značajno promijeniti multielementni sastav vina i poremetiti odnos između sastava vina i tla. Još jedan čimbenik koji može utjecati na taj odnos je unos i translokacija elemenata unutar same biljke, što je povezano s biološkim specifičnostima sorte vinove loze. Poznavanje procesa unosa i translokacije elemenata u tragovima kod različitih sorti vinove loze važno je za predviđanje moguće kontaminacije grožđa i vina i razumijevanje tolerancije pojedinih kultivara prema okolišnim uvjetima (Vystavna i sur., 2014).

Sustav klasifikacije utemeljen na kemijskim svojstvima bio bi dobra podrška postojećim načinima utvrđivanja podrijetla vina koji se već koriste u brojnim vinorodnim zemljama čiji bi glavni cilj bio sprječavanje prijevara/patvorenja u vinskoj industriji (van der Linde i sur., 2010). Nedavno su provedena istraživanja u kojima se određivanje zemljopisnoga podrijetla temelji na sastavu elemenata uz pretpostavku da kemijski sastav vina odražava sastav tla (Coetzee i sur., 2014) i u kojima se njihovim određivanjem omogućuje uspostavljanje „otiska prsta“ za svaki element i stvara mogućnost uspostavljanja veze između vina i njihovog zemljopisnoga podrijetla (Geana i sur., 2013). Istraživanja koja su provedena u mnogim zemljama, kao npr. u Portugalu (Cabrita i sur., 2018; Pérez Trujillo i sur., 2011, Rodrigues i sur., 2011; Almeida i Vasconcelos, 2003), Italiji (di Martino i sur., 2013; Galgano i sur., 2008), Slovačkoj (Suhaj i Koreňovská 2006), Hrvatskoj (Leder i sur., 2015; Kruzlicova i sur., 2013), Španjolskoj (García-Rodríguez i sur., 2011; Paneque i sur., 2010; González i sur., 2009; Frías i sur., 2003), Rumunjskoj (Oroian, 2015; Geana i sur., 2014; Geana i sur., 2013), Cipru (Kokkinofta i sur., 2017; Kokkinofta i sur., 2014), Sloveniji (Šelih i sur., 2014), Srbiji (Đurđić i sur., 2017), Makedoniji (Ivanova-Petropulos i sur., 2013), Ukrajini (Vystavna i sur., 2014), Turskoj (Sen i Tokatli, 2013), Argentini (Fabani i sur., 2010), Južnoafričkoj Republici (Coetzee i sur., 2014; van der Linde i sur., 2010; Minnaar i sur., 2005; Coetzee i sur., 2005) i drugima, pokazala su potencijal tehnika „otiska prsta“ za identificiranje zemljopisnoga podrijetla vina.

U Portugalu su Almeida i Vasconcelos (2003) istražili utjecaj tla i postupaka vinifikacije na multielementni sastav vina. Pokus je proveden u dva različita vinograda iz vinorodne regije Douro. U prvom je, 10 godina starom vinogradu, proizvedeno crno monosortno stolno vino u

vrlo modernoj vinariji. Drugi je vinograd bio 60-70 godina star, a proizvedeno je pojačano vino, slično portu, sukladno tradicionalnim tehnološkim postupcima. Analiziran je multielementni sastav (Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hf, Li, Mn, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Sb, Sc, Sr, Ti, Th, Tl, U, V, W, Y, Zn, Zr, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, and Lu) tla, groždanog soka i uzoraka izuzetih iz svih faza proizvodnje vina. Uzorci su analizirani ICP-MS tehnikom nakon odgovarajuće pripreme (za tekuće uzorke UV zračenjem, a za tlo mikrovalna digestija pod visokim tlakom). Ustanovljeno je da su oba postupka vinifikacije imala utjecaja na multielementni sastav vina. Većina je elemenata imala slične ili niže koncentracije u vinu nego u groždanom soku, vjerojatno zbog taloženja za vrijeme fermentacije i/ili odležavanja vina. Primijećeno je onečišćenje određenim elementima u tijeku tehnološkog procesa proizvodnje (kod prešanja, fermentacije i/ili bistrenja vina), i to Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, V i Zn u pojačanom vinu te Al, Cr, Fe, Ni, Pb, i V u stolnom vinu. Dobivene su značajne korelacije između multielementnog sastava vina i grožđa ( $R = 0.997$  za pojačano i  $R = 0.979$  za stolno vino,  $n = 31$ ,  $p < 0.01$ ). Za oba proučavana vina dobivena je i visoka korelacija s tlom vinograda ( $R = 0.994$ ,  $n = 19$ ,  $p < 0.01$ ) za set elemenata koji je analiziran. Dobiveni rezultati su obećavajući u pogledu primjene multielementnog sastava tla i vina kao „otiska prsta“ odnosno pokazatelja podrijetla proučavanih vina.

Rodrigues i suradnici su 2011. godine validirali ICP-MS metodu i primijenili je za određivanje koncentracija 17 elemenata (Al, As, B, Ba, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sr, Zn) u vinima iz Portugala. Promatran je odnos između koncentracija elemenata i dviju varijabli: boja vina (crna i bijela) te oznaka podrijetla („Alentejo“, „Bairrada“, „Dão“, ili „Vinho Verde“). Analizom varijance dobivenih rezultata dobiveno je da se uzorci crnih vina značajno ( $p < 0.05$ ) razlikuju od bijelih vina. Koncentracije B, Ba, Fe, K, Mg, Mn, Ni i Sr su veće u crnim vinima, dok su u bijelim vinima veće koncentracije Al, Ca i Na. Razlikovanje crnih vina prema oznakama izvornosti omogućio je element B koji je imao najvišu koncentraciju u regijama „Alentejo“, „Dão“, i „Bairrada“. U regiji „Alentejo“ koncentracija Al je bila niža, a Mg viša nego u „Dão“, i „Bairrada“. Veće koncentracije K dobivene su u regiji „Dão“ nego u „Alentejo“ i „Bairrada“, dok su koncentracije Ba i Mn bile niže u vinima oznake „Bairrada“, nego kod „Alentejo“ i „Dão“. Diskriminantnom su analizom također postignuti visoki postotci točnog prepoznavanja uzoraka (98,2%) prilikom klasifikacije prema oznaci izvornosti.

Pérez Trujillo i suradnici su 2011. godine postigli razlikovanje vina s otočja Madeire i Azora analizirajući udjele Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li i Rb. Primjenom ANOVA-a su utvrdili da postoje elementi sa značajnim razlikama u koncentracijama za vina s oba otočja,



između stolnih i likerskih vina Madeire te između vina s otoka Pico i Terceira koji pripadaju Azorskom otočju. PCA metodom su pronašli razlike obzirom na proizvodni proces i/ili korištenu opremu, dok su LDA metodom u stupnjevitom modelu postigli dobru klasifikaciju vina obzirom na otočje podrijetla te obzirom na pojedine otoke u slučaju vina Azorskog otočja.

Cabrita i suradnici su 2018. godine proveli istraživanje na vinima proizvedenim u amforama u portugalskoj regiji Alentejo s ciljem određivanja multielementnog sastava radi utvrđivanja zdravstvene ispravnosti, ali i zemljopisnoga podrijetla. Promatrana vina bila su iz četiri susjedne podregije (Vidigueira, Vila Alva, Vila de Frades i Cuba), a analize 30 elemenata provedene su ICP-MS tehnikom. Rezultati su pokazali razlike u multielementnom sastavu između uzoraka obzirom na boju i zemljopisno podrijetlo. U smislu zdravstvene ispravnosti, samo je jedno crno vino imalo koncentraciju Zn višu od propisane od strane OIV-a. Primjenom statističke metode LDA uzorci vina iz podregije Vidigueira jasno su odvojeni od ostalih. Rezultati dobiveni kanonskom analizom pokazali su da je uprkos maloj udaljenosti promatranih podregija, moguće razlikovati vina prema boji i zemljopisnom podrijetlu na temelju njihovog multielementnog sastava. Dobiveno dobro razlikovanje prema zemljopisnom podrijetlu može se pripisati činjenici da se kod proizvodnje vina u amforama nisu koristila nikakva dodatna tehnološka sredstva ili aditivi koji bi mogli utjecati na koncentracije multielemenata te se stoga mineralni sastav može direktno povezati sa geološkim svojstvima tla.

Galgano i suradnici (2008) su karakterizirali vina iz tri regije s juga Italije (Basilicata, Calabria i Campania) s obzirom na sadržaj makro- i mikroelemenata i lantanida. Analiziran je 61 element u 120 crnih vina proizvedenih od 2000. do 2002. godine, odnosno po 40 uzoraka iz svake regije. Rezultati su pokazali da analiza elemenata pruža dobru mogućnost diskriminiranja vina po regijama, čak i neovisno o godini proizvodnje vina. Diskriminacija vina prema njihovom zemljopisnom podrijetlu temeljena je na sljedećim elementima: Ag, B, Ca, Cd, Eu, Fe, Ga, La, Lu, Mn, Nd, Pr, Sm, Th, Tm, V, Yb, i Zr za Basilicatu; Al, B, Fe, Mg, Mn, Ti, Tl, Sc i Zn za Calabriju; Ba, Eu, K, I, Rb, i Tl za Campaniju.

Mogućnost karakteriziranja i sljedivosti podrijetla grožđa, listova i vina dva kultivara (Barbera i Nebbiolo) uzevši u obzir i utjecaj različitih podloga (420A i Kober 5BB) istražili su Cugnetto i suradnici 2014. godine na uzorcima prikupljenim u sjeverozapadnoj Italiji. Zaključili su da je u tu svrhu pogodna tehnika ICP-OES uz primjenu multivarijatne statističke analize, čak i kada se radi o sličnim geološkim podlogama. Mineralni elementi lišća, bobica i vina koji su pokazali najveću diskriminirajuću snagu bili su Ba, Mn i Sr, a nešto manje Si i Ti. Udjeli Ca, Cr i Ti u listovima te Co, K, Mg, Mo, Ni, Sb, Si i Ti u bobicama grožđa uglavnom su ovisili o vrsti podloge za obje proučavane regije. Ba, K, Sb i V u listovima te Ba i Sb u bobicama su

uglavnom bili povezani s kultivarom. Mineralni sastav grožđa je uglavnom bio povezan sa sortom i podlogom i pokazao je veću moć razlikovanja uzoraka nego mineralni sastav listova. Iako su elementi Ba, Si i Ti pokazali razlike u udjelima obzirom na sortu i podlogu, oni su ipak omogućili identificiranje podrijetla uzoraka te se tako potvrdili kao dobri obilježivači zemljopisnoga podrijetla.

Suhaj i Koreňovská su 2006. godine proveli analize elemenata u tragovima (As, Ba, Ca, Co, Cr, Li, Mg, Rb, Sn, Sr, i V) koji su se pokazali kao vrijedan alat za razlikovanje regije podrijetla Slovačkih vina. Navedeni elementi su analizirani metodom AAS u 37 uzoraka tla iz šest slovačkih vinogradarskih regija (Srednja Slovačka, Nitra, Mali Karpati, Južna Slovačka, Istočna Slovačka i Tokaj), 34 uzoraka grožđa i 69 komercijalnih uzoraka vina (Müller-Thurgau, Veltlinac zeleni, Welschriesling). Analizirana je korelacija udjela As, Ba, Ca, Co, Cr, Li, Mg, Rb, Sn, Sr, i V sa tлом vinograda, grožđem i vinima. Proučavan je učinak proizvodnog procesa na distribuciju odabranih pokazatelja u svim fazama proizvodnje vina (u grožđu, moštu, mladom vinu, talogu kvasaca i komini) te je ustanovljena značajna korelacija između odabranih pokazatelja tla i pojedinih proizvoda od grožđa do vina uključujući i talog kvasaca i kominu. Dobiveni rezultati ukazivali su na minimalne promjene odabranih markera u proizvodnom procesu te omogućuju njihovu primjenu kao sredstva za određivanje zemljopisnoga podrijetla vina.

Multielementna analiza 272 slovenska vina provedena je tehnikama ICP-MS i ICP-OES (Šelih i sur., 2014). Za klasificiranje analiziranih uzoraka prema zemljopisnom podrijetlu primijenjene su razne statističke metode. Najbolji je model dao ispravna predviđanja za 82% uzoraka, što su vrlo dobri rezultati uzevši u obzir malu veličinu ukupnih slovenskih vinogradarskih područja. I za crna je i bijela vina bilo moguće provesti klasifikaciju i obzirom na podregije uzgoja, iako je ipak za točniju klasifikaciju potreban veći broj uzoraka. Za crna vina koja su uglavnom bila iz jedne regije bila je moguća i visoka preciznost klasifikacije između podregija.

U radu Fríasa i suradnika (2003) analizirano je jedanaest elemenata K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li i Rb u suhim i slatkim vinima s Kanarskih otoka El Hierro, La Palma i Lanzarote primjenom tehnika AAS i FAAS (engl. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*). Za uzorke sa sva tri otoka ustanovljene su značajne razlike u srednjim vrijednostima ispitivanih elemenata, osim za željezo i bakar. CA i PCA pokazale su razlike između vina obzirom na otok podrijetla i stanje zrelosti grožđa. Za Rb, Na, Mn i Sr je LDA pokazala 100% sposobnosti prepoznavanja i 95,6% sposobnosti predviđanja. Multivarijatnom metodom modeliranja „mekano neovisno modeliranje analogije razreda“ (engl. *Soft Independent Modelling of Class*

*Analogy* - SIMCA) dobivena je 100%-tna osjetljivost i specifičnost za otoke El Hierro i Lanzarote te 95 % za La Palmu.

ICP-OES tehniku su 2009. godine González i suradnici kombinirali s različitim kemometrijskim metodama da bi potvrdili zemljopisno podrijetlo različitih uzoraka crnih vina iz španjolskih regija zaštićenih oznaka izvornosti: Utiel-Requena, Jumilla, Yecla i Valencia. Istražena je sposobnost različitih multivarijatnih metoda analize podataka za klasifikaciju vina obzirom na njihov sadržaj elemenata. Provedeni su izračuni obzirom na 38 varijabli (udjeli Al, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Ho, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Pr, Sc, Se, Sm, Sr, Tb, Ti, Tm, V, Y, Yb i Zn). Rezultati dobiveni HCA i PCA metodama pokazali su da se crna vina iz Utiel-Requene i Jumille mogu vrlo lako razlikovati od ostalih ZOI-a u njihovoj blizini, dok se ovim metodama vina iz Valencie i Yecla nisu mogla razlikovati. Pomoću CART (engl. *classification and regression trees*) metode su se vina Utiel-Requene i Jumille također dobro razlikovala, i to na temelju koncentracija Li i Mg. Ovom metodom su se dosta dobro razlikovala i vina iz Valencie. Najbolju sposobnost razlikovanja vina iz promatranih ZOI-a pokazala je metoda DA.

Koncentracije elemenata Ca, Mg, Fe, Cu, Mn i Zn analizirane su FAAS metodom (Paneque i sur., 2010) te Na, K, Al i Sr metodom plamene atomske emisijske spektrofotometrije (engl. *flame atomic emission spectrophotometry* – FAES) u španjolskim vinima s dvije oznake podrijetla (engl. *denomination of origin* – DO) iz andaluzijske provincije Córdoba. Analizirano je 26 uzoraka bijelih vina s DO „Montilla–Moriles“ i 21 uzorak bijelih vina s DO „Vinos de la Tierra de Villaviciosa“. Univarijatnom analizom su ustanovljene značajne razlike u dobivenim srednjim vrijednostima za elemente Na, Mn, Mg, Fe i Zn. LDA je za ove varijable dala točno prepoznavanje u 97,9% slučajeva i točnog predviđanje u 95,7% slučajeva.

García-Rodríguez i suradnici (2011) su također istraživali mogućnosti razlikovanja vina iz španjolskih regija Ribera del Guadiana i Méntrida pomoću sastava elemenata i obradom podataka odgovarajućim statističkim metodama. Analizirano je 19 elemenata ICP-OES tehnikom, a dobiveno je izvrsno razlikovanje dviju regija s As, Cd, Cu, Li, Pb i Sr kao najtočnijim pokazateljima pripadnosti.

Kao koristan alat za razlikovanje vina i tálā dvije glavne vinorodne regije jugoistočne Rumunjske (Valea Călugărească i Murfatlar) te Moldavije (regije istočne Rumunjske) primijenjena je ICP-MS tehnika (Geana i sur., 2013) uz odgovarajuće metode statističke analize. Rezultati su pokazali da je diferencijacija Rumunjskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo moguća na temelju ovih elemenata: Ni, Ag, Cr, Sr, Zn, i Cu za Valea Călugărească, Rb, Zn, i Mn za Murfatlar te Pb, Co, i V za Moldaviju.

Multivarijatnom statistikom temeljenom na koncentracijama kemijskih parametara postignuto je razlikovanje vina iz dvije vinorodne regije Rumunjske: Dragasani i Recas. Korištene su razne analitičke tehnike HPLC (engl. *high-performance liquid chromatography*), ICP-MS, FAAS, a analizirana su 22 elementa i sedam fenolnih spojeva. Za diferencijaciju zemljopisnoga podrijetla i sorte vina su kao najbolji istaknuti Ba, Be, Cr, Cs, Li, Mg, Na, Ni, Sr, U, i Zn te (+)-katehin, (-)-epikatehin, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina i resveratrol. Postignuto je zadovoljavajuće razdvajanje uzoraka vina iz dvije zemljopisne regije (Recas i Dragasani), čak i za vrlo bliska područja unutar same regije Dragasani. Također je dobiveno i dobro razlikovanje ispitivanih sorta *V. Vinifera sp.* iz regije Dragasani uključenih u ovo istraživanje (Geana i sur., 2014).

Karakterizaciju srpskih vina obzirom na koncentracije raznih elemenata proveli su Đurđić i suradnici (2017). Rad je uključio 63 uzorka crnih i bijelih vina iz četiri vinogradarske regije u Srbiji (Beograd, središnja Srbija, Vojvodina i južna Srbija). Analiziran je dvadeset i jedan element primjenom ICP-Q-MS (engl. *Inductively Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometry*) i ICP-OES tehnika. Statistički alat za klasificiranje i razlikovanje vina obzirom na boju, godinu berbe i zemljopisno podrijetlo bila je metoda razlikovanja obrazaca (engl. *pattern recognition method*). Najvažniji obilježivači za razlikovanje crnih od bijelih vina bili su Be, Al, Rb, Mg, K, Cu, Mn i Na. Najveći utjecaj na razlikovanje crnih vina obzirom na godinu berbe imali su Cd, Pb, As, Sb, V, Na, K i Zn. Statistički model je otkrio tri grupe deskriptora za različite regije proizvodnje. Svi dobiveni statistički modeli potvrdili su da se podaci multielementnog sadržaja uzoraka vina mogu koristiti za točno predviđanje boje vina, godine berbe i regije podrijetla.

U istraživanju provedenom u Makedoniji (Ivanova-Petropulos i sur., 2013) primjenom ICP-MS i ICP-OES tehnika analizirana su ukupno 42 elementa (Ag, Al, Au, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Co, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ge, Ho, La, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, P, Pb, Pr, S, Sm, Tb, Ti, Tl, Tm, U, V, Yb, Zn, Zr) u 25 makedonskih bijelih, ružičastih i crnih vina iz različitih regija. Statističkom analizom dobiveno je značajno razlikovanje uzoraka obzirom na boju i zemljopisno podrijetlo i to najviše na temelju udjela B, Ba, Ca, Fe, Mg, Mn, P i S.

U turskim vinima 13 različitih sorti iz četiri godine berbi su pomoću ICP-OES i ICP-MS provedene analize elemenata te su statističkom obradom podataka proučavane razlike obzirom na godinu berbe, sortu i regiju. Rezultati su pokazali da vina iz zapadnih regija karakterizira povišeni udio olova. Crna vina dviju autohtonih sorti (Boğazkere i Öküzgözü) razdvojila su se od ostalih sorti na osnovu višeg udjela Ca te nižeg udjela B i Cu. Značajni elementi za razlikovanje vina bili su Sr, Li, Al, Ba i B, koji su prirodno prisutni u vinu te

elementi koji u vino dopijevaju primjenom agrotehničkih mjera, u tijeku proizvodnje ili zagađenjem (Ca, Cu, Mg, Co, Pb i Ni). Postignuto je razdvajanje istočnih od zapadnih vinorodnih regija na temelju Sr, Li, Ni, Ba, B, Pb, Ca i Al, a primjećeno je i da je za vina iz zapadne Turske, gdje je razvijena industrija, karakterističan povišeni udio olova, iako još uvijek ispod maksimalno dopuštenih koncentracija (Sen i Tokatli, 2013).

Fabani i suradnici (2010) također su primijenili profil multielemenata zajedno s kemometrijskim metodama za utvrđivanje zemljopisnoga podrijetla argentinskih vina iz tri proizvodne regije. Istražili su i utjecaj tla regije podrijetla na sastav elemenata vina. Provedene su analize jedanaest elemenata u trideset i jednom uzorku vina i 137 uzoraka tla iz promatranih regija (Cordoba, La Rioja i San Juan) tehnikom FAAS. Primijenjene su različite multivarijatne statističke metode LDA i kanonska korelacija (engl. *Canonical Correlation* - CC) za razlikovanje između kategorija (podrijetlo vina ili tla). LDA metodom je postignuto 100% točno razlikovanje analiziranih vina iz tri regije primjenom samo sedam parametara (K, Fe, Ca, Cr, Mg, Zn i Mn) te točno razlikovanje tla regije podrijetla za 92% uzoraka primjenom sedam varijabli (Ca, Cr, K, Fe, Cu, Zn i Mg). Primjenom CC je skoro 85% varijabilnosti primijećenih između uzoraka vina bilo moguće pripisati tlu na kojem je loza bila uzgojena.

U Južnoafričkoj je Republici provedeno nekoliko istraživanja s ciljem razlikovanja zemljopisnoga podrijetla vina proizvedenih u provinciji Western Cape na temelju sadržaja elemenata. U jednome je analizirano ukupno 96 crnih i bijelih vina različitih sorata ICP-OES tehnikom. Multivarijatna analiza dobivenih rezultata omogućila je uočavanje sličnosti između vina i regije podrijetla te sorte i to najviše na temelju Mg, K, Fe, Zn, Ba, Sn, B, Al, Se, Cu, P, Na and Sr (Minnaar i sur., 2005).

U drugome istraživanju vina provincije Western Cape su van der Linde i suradnici 2010. godine koristili ICP-MS tehniku da bi odredili koncentracije 26 elemenata (Li, B, Al, Sc, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Zr, Nb, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, Ce, Nd, W, Tl, Pb i U) u 67 uzoraka vina i tala iz 22 vinograda iz regija Robertson, Stellenbosch, Swartland i Walker Bay. Primjenom statističke metode PCA su se kao najbolji indikatori za razlikovanje vina i tala različitog zemljopisnoga podrijetla pokazali elementi Li, B, Sc, Mn, Co, Ni, Cu i Rb. Osim toga, potvrđena je korelacija između sadržaja elemenata vina i tla regije iz koje vino potječe, što je osnovni preduvjet za primjenu metodologije „otiska prsta“.

U još jednom istraživanju na području Južnoafričke Republike (Coetzee i sur., 2014) također je istražena mogućnost primjene sadržaja elemenata kao metode „otiska prsta“ za utvrđivanje podrijetla vina na relativno malom zemljopisnom području vinogradarskog okruga Stellenbosch koje se nalazi u regiji Western Cape, a zauzima površinu nešto manju od 1000 km<sup>2</sup>.

Prikupljeni podaci o 120 vina iz 23 vinograda uputili su na zaključak da je klasifikacija vina primjenom sadržaja elemenata i multivarijatne statistike zaista moguća. Kao prikladni indikatori identificirani su B, Ba, Cs, Cu, Mg, Rb, Sr, Tl i Zn. Bijela i crna vina odvojeno su razmatrana da bi se dobila točna kalsifikacija. Primijećena je korelacija između klasificiranja vina i tipa tla za ovu regiju.

U istraživanju provedenom na 140 hrvatskih vina (Leder i sur., 2015) je pomoću određivanja sadržaja 16 elemenata ICP-OES tehnikom i primjenom multivarijatnih statističkih metoda (analiza klastera i analiza glavnih komponenata) postignuta diferencijacija hrvatskih bijelih i crnih vina iz kontinentalne i primorske regije. Kao najbolji obilježivači zemljopisnoga podrijetla pokazali su se sljedeći elementi: Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, Ni, Pb, Sn i Zn.

### 2.3.3.2 Metode određivanja omjera stabilnih izotopa

Izotop (grč. *isos*: isti, *topos*: mjesto) je atom istoga kemijskog elementa (isti atomski broj  $Z$ ) koji se međusobno razlikuje po broju neutrona u atomskoj jezgri, pa prema tome i po masenome broju, odnosno masi. Pojedini izotopi označuju se pripadajućim masenim brojem, koji se kao eksponent stavlja uz simbol elementa (kao npr.  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ili  $^{18}\text{O}$ ). Većina kemijskih elemenata u prirodi smjese su prirodnih izotopa, koji su bilo stabilni bilo radioaktivni (nestabilni). Mnogi elementi imaju više stabilnih izotopa, a to je razlogom što njihove relativne atomske mase nisu cijeli brojevi. Vodik je, na primjer, smjesa stabilnih izotopa  $^1\text{H}$  (protij) i  $^2\text{H}$  (deuterija), ugljik sadrži stabilne izotope  $^{12}\text{C}$  i  $^{13}\text{C}$ , kisik izotope  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  i  $^{18}\text{O}$  i tako dalje (LZMK, 2018).

Kako bi se olakšalo korištenje inače vrlo malih brojeva, uvedena je „delta“ notacija. Ona u sebi sadržava uz omjer stabilnih izotopa težeg prema lakšem, i normalizaciju prema međunarodnom standardu definirano izrazom 1 (IAEA/UNESCO, 2001; Lide, 2002).

$$\delta\text{‰} = \left( \frac{R_{uzorak}}{R_{standard}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

$R_{uzorak}$  je omjer broja atoma težeg izotopa prema broju atoma lakšeg izotopa u uzorku kao na primjer u izrazu 2:

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \text{ ili } {}^2\text{H}/{}^1\text{H} \text{ ili } {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O} \quad (2)$$

$R_{standard}$  predstavlja omjer broja atoma težeg izotopa prema broju atoma lakšeg izotopa u međunarodnom standardu.

Jedan od tri međunarodna standarda za analizu  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$  je VSMOW (engl. *Vienna Standard Mean Ocean Water*), standardizirani uzorak morske vode čija je vrijednost 0‰ za  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$ . Osim njega koriste se SLAP (engl. *Standard Light Antarctic Precipitation*) i GISP (engl. *Greenland Ice Sheet Precipitation*). Sva tri standarda koriste se za analizu  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$  iz tekuće vode te za umjeravanje laboratorijskih radnih standarda, a dostupni su u Međunarodnoj agenciji za atomsku energiju (engl. *International Atomic Energy Agency - IAEA*) u Beču (Austrija).

Glavna referenca za mjerenje prirodnih varijacija sadržaja izotopa ugljika  $\delta^{13}\text{C}$  je Vienna Pee Dee Belemnite, ili V-PDB. To je kalcij karbonat koji potječe iz krednog fosiliziranog belemnita (*Belemnitella Americana*) iz Pee Dee formacije u Južnoj Carolini (SAD). Uobičajeno se prirodni sadržaj izotopa ugljika 13 izražava preko V-PDB. Izvor PDB-a je odavno iscrpljen, ali poznat je njegov prirodni sadržaj ugljika  $^{13}\text{C}$ . Njegov omjer izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ili  $R_{\text{PDB}}$  je  $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$ . Certificirani referentni materijali kalibrirani su na osnovu ovog sadržaja i također su dostupni u IAEA i u Institutu za referentne materijale i mjerenja (engl. *Institute for Reference Materials and Measurements - IRMM*) u Geelu (Belgija).

U Tablici 1. navedeni su stabilni izotopi koji se najčešće koriste pri utvrđivanju autentičnosti hrane, njihova zastupljenost u prirodi te međunarodni standardi koji se koriste za njihovu analizu (Ghidini i sur., 2006).

Određivanje omjera stabilnih izotopa deuterija i procija (D/H) na specifičnom mjestu u molekuli etanola, odnosno  $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$  za deuterij u metilnoj skupini ( $\text{CH}_2\text{D CH}_2\text{ OH}$ ) i  $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$  za deuterij u metilenskoj skupini ( $\text{CH}_3\text{ CHD OH}$ ), te omjera  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) etanola i  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  ( $\delta^{18}\text{O}$ ) vode provodi se u vinima od 1987. godine (Martin i Brun, 1987) radi utvrđivanja prijevara, odnosno patvorenja dodatkom šećera, vode ili pogrešnog deklariranja podrijetla. Varijabilnost ovih izotopnih omjera zaista je povezana s botaničkim podrijetlom šećera (grožđe, šećerna trska ili šećerna repa) i s klimatskim i geografskim karakteristikama područja uzgoja biljke (Christoph i sur., 2015).

**Tablica 1.** Stabilni izotopi koji se najčešće koriste pri utvrđivanju autentičnosti hrane, njihova zastupljenost u prirodi te međunarodno priznati standardi za analizu (Ghidini i sur., 2006).

Element	Izotop	Zastupljenost (%)	Standard
Vodik	<sup>1</sup> H	99,985	VSMOW, SLAP, GISP
	<sup>2</sup> H	0,015	
Ugljik	<sup>12</sup> C	98,89	V-PDB
	<sup>13</sup> C	1,11	
Dušik	<sup>14</sup> N	99,63	Atmosferski zrak
	<sup>15</sup> N	0,37	
Kisik	<sup>16</sup> O	99,759	VSMOW, SLAP, GISP
	<sup>17</sup> O	0,037	
	<sup>18</sup> O	0,20	

VSMOW...engl. *Vienna Standard Mean Ocean Water*

SLAP...engl. *Standard Light Antarctic Precipitation*

GISP...engl. *Greenland Ice Sheet Precipitation*

V-PDB... *Vienna Pee Dee Belemnite*

Odnos između izotopnih podataka vina i fizikalnih varijabli vezanih uz klimu i geografiju proizvodnog područja vrlo je zanimljiva tema, kao što je vidljivo u brojnim objavljenim radovima u posljednjih dvadesetak godina (Camin i sur., 2015). U tim je istraživanjima ustanovljena pozitivna korelacija  $(D/H)_I$ ,  $(D/H)_{II}$ , i  $\delta^{13}C$  etanola vina sa srednjom temperaturom, a negativna korelacija s količinom oborine u vrijeme akumulacije šećera i dozrijevanja grožđa u vinima iz 34 regije širom svijeta.  $\delta^{18}O$  vode vina je također pokazao linearnu korelaciju s temperaturom i količinom oborine, ali je također primijećen i utjecaj ostalih klimatskih parametara (Martin i Martin, 2003). Isti je obrazac raspodjele omjera stabilnih izotopa utvrđen i u manjim razmjerima, u istraživanju izotopnih i meteoroloških parametara provedenom u Italiji (Aghemo i sur., 2011).

Utvrđivanje autentičnosti vina i drugih prehrambenih proizvoda analizama omjera stabilnih izotopa temelji se na inter- i intra-molekularnoj distribuciji stabilnih izotopa ugljika ( $^{13}C/^{12}C$ ), vodika ( $^2H/^1H$ ) i kisika ( $^{18}O/^{16}O$ ). Distribucija izotopa u biomolekulama šećera, organskim kiselinama, vodi te produktima fermentacije kao što su etanol i glicerol, ovisi o tzv. biotičkim i abiotičkim procesima frakcionacije (Christoph i sur., 2015).

Frakcionacija ili izotopna frakcionacija promjena je relativne proporcije različitih izotopa istog elementa u spojevima. Frakcionacija se uočava kao promjena u izotopnom sastavu pri prijelazu iz jednog agregatnog stanja u drugo (npr. tekućina – para/plin). Posljedica razlike u



masi je da izotopno teže molekule imaju manju mobilnost, posljedično i manju difuzivnost. Također, tekućine koje sadrže molekule s težim izotopima imaju niži tlak pare od onih s lakim izotopima.

Poznata su tri frakcionacijska procesa ovisna o masi, a to su termodinamička, kinetička i transportna frakcionacija. Kod termodinamičke frakcionacije događa se uravnotežena reakcija izmjene, a događa se u zatvorenim sustavima u ravnoteži (IAEA/UNESCO, 2001). Na ovom se procesu temelje mjerenja  $\delta^{18}\text{O}$  provedena u ovom istraživanju. Kinetička i transportna frakcionacija odvijaju se pod utjecajima parametara vezanih uz regiju, kao što su vlažnost, temperatura, tlak, vjetrovi, nadmorska visina i drugi (Kolesnov i sur., 2017). Samo je poznavanjem mehanizama odgovornih za uspostavljanje tih karakterističnih uzoraka raspodjele moguće interpretirati izotopne podatke u pogledu autentičnosti odnosno patvorenja (Christoph i sur., 2015). Abiotički procesi frakcioniranja uglavnom su inducirani termodinamičkim i/ili kinetičkim izotopnim čimbenicima. Važni procesi frakcionacije su evaporacija i kondenzacija vode i uravnoteženje  $^{18}\text{O}$  izotopa između vode i  $\text{CO}_2$ . Sljedeća glavna pravila se moraju uzeti u obzir kod obogaćivanja odnosno osiromašivanja težih izotopa  $^2\text{H}$  i  $^{18}\text{O}$  u oborinskim vodama (Schmidt, 2003; Dunbar, 1982; Craig, 1961):

- utjecaj zemljopisne širine – osiromašenje s povećanjem širine zbog gubitka težih izotopa kišom
- kontinentalni utjecaj – osiromašenje od obale prema unutrašnjosti
- utjecaj temperature – obogaćenje s porastom prosječne temperature
- utjecaj količine oborine – osiromašenje s povećanjem oborine
- utjecaj nadmorske visine – osiromašenje s porastom nadmorske visine

Opći fenomen povezanosti izotopnih omjera i okolišnih uvjeta istražili su Martin i Martin (2003) te su potvrdili da atomi vodika i kisika ugrađeni u organske molekule lista prenose klimatski profil vode koju biljka koristi. Sadržaj izotopa u vodi lista ne ocrta direktno klimatski profil vode koju je biljka crpila iz okoliša, već je dodatno obogaćen težim izotopima zbog pojave evapotranspiracije koja ovisi o okolišnim uvjetima. Obogaćivanje evaporacijom teorijski se modelira obzirom na parametre frakcionacije povezane s difuzijom kroz stomatu i uvjete u graničnom sloju lista (Roden i sur., 2000; Flanagan, 1993). Posljedično, fotosinteza ugljikohidrata i biotransformacije kojima nastaje npr. celuloza, također su odgovorni za biokemijske izotopne frakcionacije.

Abiotički procesi frakcionacije odvijaju se u vodi grožđa i listovima vinove loze. Evapotranspiracijom kroz puči ili kroz pokožicu bobice obogaćuju se i  $^2\text{H}$  i  $^{18}\text{O}$  u vodi bobice ili lista. Opseg obogaćivanja ovisi o mikroklimatskim uvjetima kao što su relativna vlažnost i njezin izotopni sastav, ali i izloženost vinograda suncu, zadržavanje vode u tlu, navodnjavanje, doba zriobe i datum berbe (Christoph i sur., 2015).

Prethodno navedeni utjecaji istraženi su i na velikom broju uzoraka vina iz Italije. U istraživanju objavljenom 2015. godine su Camin i suradnici uzeli u obzir odnose između  $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ ,  $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$  i  $\delta^{13}\text{C}$  etanola te  $\delta^{18}\text{O}$  vode vina i varijabli koje opisuju klimu i geografiju proizvodne regije, koristeći razne alate statističke obrade podataka. U ovome je istraživanju po prvi puta obrađen tako veliki broj uzoraka (čak oko 4000) vina prikupljenih kroz razdoblje od 11 godina na području cijele Italije. Uz sve je službene izotopne parametre razmatran i veliki broj klimatskih i geografskih deskriptora (datum berbe, zemljopisna širina, duljina, nadmorska visina, udaljenost od mora, količina oborina, maksimalna, minimalna i srednja dnevna temperatura,  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^2\text{H}$ ). Pokazalo se da  $\delta^{18}\text{O}$  i potom  $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$  imaju najjaču povezanost s klimom i zemljopisnim podrijetlom. Dominantnu negativnu korelaciju je pokazala zemljopisna širina, dok su pozitivno korelirane bile vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$  u oborinama te temperatura. Ovim se istraživanjem otvorila mogućnost da se pomoću identificiranih korelacija i modela predvidi izotopni sastav autentičnih vina, čime se povećavaju mogućnosti otkrivanja prijevara i pogrešnog označavanja (Camin i sur., 2015).

Najpoznatiji i najvažniji biotički proces frakcionacije je razlika u procesima vezanja  $\text{CO}_2$  fotosintezom u tzv.  $\text{C}_3$  i  $\text{C}_4$  biljkama.  $\text{C}_3$  biljke se tako nazivaju prema broju atoma ugljika fosfoglicerinske kiseline, koja je prvi produkt fotosinteze, a ima veliki izotopni utjecaj na reakciju ribuloza-bifosfat-karboksilaze, što rezultira jakim osiromašenjem  $^{13}\text{C}$  izotopima (Schmidt, 2003; Bender, 1971).  $\text{C}_3$  biljke predstavljaju najrasprostranjeniju skupinu biljaka kojoj pripadaju gotovo sve voćne vrste koje se uzgajaju u Europi, uključujući i vinovu lozu, grožđe i šećernu repu.

Pojam  $\text{C}_4$  biljke izveden je iz četiri ugljikova atoma oksalacetata, proizvoda fotosinteze iz reakcije fosfoenolpiruvat-karboksilaze. Zbog manje izraženog izotopnog efekta,  $^{13}\text{C}$  je manje osiromašen nego u  $\text{C}_3$  biljkama. Najpoznatije  $\text{C}_4$  biljke su šećerna trska, kukuruz i proso.

Paralelno s različitim procesima vezanja  $\text{CO}_2$ , tu je i odgovarajući izotopni utjecaj za  $^2\text{H}$  sa osiromašenjem za  $\text{C}_3$  biljke i obogaćenjem za šećere iz  $\text{C}_4$  biljaka. Deuterij iz molekule šećera i iz molekule vode se za vrijeme alkoholne fermentacije prenosi na različite načine do metilne ( $-\text{CH}_3$ ), odnosno metilenske ( $-\text{CH}_2-$ ) skupine etanola. Približno se 85% deuterija iz molekule šećera prenosi u metilnu skupinu, a oko 75% deuterija iz vode grožđa se prenosi u metilensku

skupinu. Prema tome, izotopni omjer metilne skupine (D/H)<sub>I</sub> predstavlja botaničko podrijetlo fermentiranog šećera, dok izotopni omjer metilenske skupine (D/H)<sub>II</sub> predstavlja vodu grožđa, koja odražava klimatske uvijete povezane sa zemljopisnim podrijetlom i godinom berbe.

Spoznaja ovih činjenica omogućila je razvoj SNIF-NMR<sup>®</sup> metode (Martin i sur., 1982; Martin i Martin, 1981) za otkrivanje dodavanja šećera iz šećerne repe prije fermentacije. Ovom se metodom s velikom preciznošću kvantificiraju razlike izotopnih sadržaja na svakom mjestu molekule i na taj način mjeri specifično prirodno frakcioniranje izotopa za svako mjesto molekule etanola. SNIF-NMR<sup>®</sup> metodu je, zajedno s IRMS metodama za određivanje  $\delta^{13}\text{C}$  šećera, etanola, glicerola i ugljičnog dioksida te metodom za određivanje  $\delta^{18}\text{O}$  vode vina prihvatio OIV i objavio kao službene metode analize omjera stabilnih izotopa sastojaka vina u Kompendiju međunarodnih metoda za analize mošta i vina (OIV, 2021b; Christoph i sur., 2015).

U cilju omogućavanja učinkovitih sredstava državama članicama Europske Unije za rješavanje rizika od prijevarne manipulacije vinom uspostavljena je analitička banka izotopnih podataka, kojom upravlja Europski referentni centar za kontrolu u sektoru vina u okviru Zajedničkog istraživačkog centra u Geelu u Belgiji. Namjena izotopne banke podataka je da se osiguraju učinkovite kontrole povezane s obogaćivanjem vina ili dodavanjem vode vinima i vinskim proizvodima. Ti se podaci dobivaju iz usklađene izotopne analize komponenti etanola i vode u vinskim proizvodima te omogućavaju odgovarajuće kontrole tijekom cijelog trženja, u skladu s metodama analize utvrđenima u skladu s Člankom 80. stavkom 5. Uredbe (EU) 1308/2013, Delegiranom uredbom (EU) 2018/273 te pravilima i postupcima utvrđenima u Člancima 27., 28. i 29. Provedbene uredbe (EU) 2018/274.

Christoph i suradnici su 2003. godine objavili istraživanje o mogućnostima i ograničenjima utvrđivanja autentičnosti vina primjenom stabilnih izotopa, meteoroloških podataka, banki podataka i statističkih testova. Autori su istaknuli da metode određivanja omjera stabilnih izotopa D/H,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  koje su postale službene metode analize Europske Komisije imaju ključnu ulogu u otkrivanju patvorenja nedozvoljenim dodatkom šećera dobivenog od šećerne repe ili šećerne trske. Prikazali su podatke prikupljene na autentičnim uzorcima iz dvije vinorodne regije Njemačke (Frankonija i Bodensko jezero) u razdoblju od 1992. do 2001. godine, na kojima se mogu vidjeti utjecaji zemljopisnoga podrijetla, godine berbe, kultivara grožđa i specifičnih meteoroloških uvijeta. Oborine tijekom rasta i dozrijevanja te neposredno prije i za vrijeme berbe utječu na obogaćenje odnosno osiromašenje izotopa  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{18}\text{O}$  u etanolu i vodi vina. Na odabranim su primjerima razmatrani osnovni preduvjeti i mogućnosti te ograničenja sigurnog dokaza patvorenja

primjenom EU banke podataka autentičnih vina u kombinaciji sa prikladnim statističkim alatima. Zaključili su da je pri utvrđivanju autentičnosti vina općenito važno koristiti sve izotopne omjere te da je važno uzeti u obzir i sve bitne meteorološke i vinogradarske parametre kao što su to oborine, datum berbe, sorta grožđa te koristiti reprezentativni broj referentnih uzoraka što bližih uzorku kojem se utvrđuje autentičnost. Također je zaključeno da ima smisla nastaviti godišnje prikupljanje grožđa u svakoj vinorodnoj regiji EU uzevši u obzir statistički zadovoljavajuću distribuciju prema zemljopisnom podrijetlu, sorti i datumu berbe.

Ovo istraživanje je nastavljeno na vinima iz Mađarske, Hrvatske i drugih Europskih zemalja (Christoph i sur., 2004). Također su provedene analize stabilnih izotopa i to u mađarskim vinima za berbe 1997. do 2001., a u hrvatskim vinima za berbe od 1999. do 2001. Srednje vrijednosti omjera  $(D/H)_I$  etanola mađarskih vina kretale su se između 100,0 i 101,3 ppm, dok su značajnije razlike uočene za omjere  $(D/H)_{II}$  (od 124,9 do 128,4 ppm) i  $\delta^{13}C$  vrijednosti (od -26 do -27,9 ‰ V-PDB) etanola, a  $\delta^{18}O$  vode vina su bile između -2,4 i +2,8 ‰ V-SMOW). Kod hrvatskih su vina najznačajnije razlike izotopnih omjera uočene između kontinentalne i primorske regije. Ekstremno vruća i suha 2000. godina vjerojatno je kod vina iz južnih dijelova Jadranske obale uzrokovala i ekstremne vrijednosti  $\delta^{18}O$  od čak +9 ‰ VSMOW u vodi vina te -23.1 ‰ V-PDB za  $\delta^{13}C$ , 107.8 ppm za  $(D/H)_I$ , i 134 ppm za  $(D/H)_{II}$  etanola vina. Nasuprot je tome 2001. godina bila vrlo kišna, s čak 190 mm oborine unutar četiri tjedna prije berbe, što se očitovalo relativno niskim vrijednostima  $(D/H)_{II}$  i  $\delta^{18}O$  u pojedinim vinima iz Hrvatske.

Austrija je kao i ostale zemlje članice EU u obvezi svake godine analizirati izotopni sastav određenog broja uzoraka vina. Philipp i suradnici objavili su 2018. godine rezultate za austrijska vina berbi od 1997. do 2004. Prikazane su prosječne vrijednosti za  $(D/H)_I$ ,  $(D/H)_{II}$ ,  $\delta^{18}O$  i  $\delta^{13}C$  za područje Beča, Donje Austrije, Štajerske i Gradišća. Zaključeno je da su topografske i klimatske karakteristike austrijskih vinorodnih regija uzrok trendovima u dobivenim podacima. Primijećen je gradijent u smjeru sjever-jug za omjere  $(D/H)_I$  i  $(D/H)_{II}$ , s višim vrijednostima u toplijim područjima Austrije (Gradišće) i nižim u hladnijim područjima (Donja Austrija i Štajerska). Za diferencijaciju austrijskih vina prema zemljopisnom podrijetlu izotopskim metodama potrebno je uzeti u obzir i godinu berbe.

Magdas i suradnici (2012) proveli su istraživanja o izotopskom otisku prsta (za  $^{18}O$  i  $^{13}C$ ) vina pripremljenih od autohtonih rumunjskih sorti grožđa (Feteasca Alba i Feteasca Regala) te Cabernet Sauvignona dobivenih u različitim berbama (2002, 2003, 2004, 2007 i 2008). Ova su vina dobivena iz različitih vinograda koji imaju značajnu ulogu na rumunjskom tržištu, a proizvedena su mikroviniifikacijom sukladno EC Uredbi 2729/2000. Dobivena su zapažanja

vezana uz ovisnost omjera izotopa o zemljopisnom podrijetlu i klimatskim uvjetima. Autentična vina dobivena od sorte grožđa Feteasca Alba iz šest različitih vinograda pokazala su vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  u rasponu od +3,28 (regija Cotesti) do -2,60 ‰ (regija Aiud).  $\delta^{13}\text{C}$  vrijednosti su bile vrlo slične za sve uzorke s prosjekom od oko -26 ‰. Zaključeno je da su razlike između vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  nastale zbog toga što su uzorci podrijetlom iz različitih klimatskih zona, a one imaju utjecaj na vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  vode vina. Za sortu Cabernet Sauvignon podrijetlom iz vinograda Dealu Mare – Tohani, berbi 2003. i 2004., opažena je veća razlika u vrijednostima  $\delta^{18}\text{O}$ , i to u rasponu od + 1,89 (u 2004.) do + 5,35 ‰ (u 2003.). Ova je razlika objašnjena različitim srednjim godišnjim temperaturama u 2003. i 2004. godini.

Omjere stabilnih izotopa kao „otiska prsta“ regije podrijetla primijenili su Raco i suradnici (2015) na 41 uzorku vina komercijalno dostupnih u Italiji, ali i na uzorcima površinskih voda i vode grožđa. U svome istraživanju povezali globalnu i lokalnu liniju meteorske vode s linijama vode vina i grožđa primijenivši opažanja Craiga (1961) koji je uočio da su vrijednosti  $\delta^2\text{H}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  iz oborine linearno povezane jednadžbom (3).

$$\delta^2\text{H} = 8 \times \delta^{18}\text{O} + 10 \quad (3)$$

Taj izraz poznat je pod nazivom globalna linija meteorske vode, (engl. *Global Meteoric Water Line*, GMWL).  $\delta^2\text{H}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  često se mjere i razmatraju zajedno, čime se dobivaju dodatne informacije. Kada se gleda linearna povezanost  $\delta^2\text{H}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  iz oborine na nekoj pojedinačnoj lokaciji, dobiva se lokalna linija meteorske vode, što su Raco i sur. (2015) primijenili u svom istraživanju. Bez obzira na izotopne vrijednosti pojedine godine, linija za  $\delta^2\text{H}\text{‰} = 4,19 \times \delta^{18}\text{O}\text{‰} + 11,46$  koja predstavlja vina istraživane regije, ista je za dvije proučavane godine, neovisno o temperaturi ili vlazi i tako pokazuje da je ta linija bolji „otisak prsta“ ovih vina, neosporno dokazujući zemljopisno podrijetlo. Evaporacijska linija vode iz bobica grožđa imala je nagib 2,8 što je indikacija maksimalne kinetičke frakcionacije. Ova transpiracijska linija presjeca lokalnu liniju meteorske vode unutar izotopnog raspona lokalnih izvorskih voda, potvrđujući zemljopisno podrijetlo ovih talijanskih vina. Također su uočili da sorte koje ranije dozrijevaju (npr. Cabernet i Merlot) imaju više  $\delta^{18}\text{O}$  vrijednosti od sorti kasnijeg doba dozrijevanja (npr. Sangiovese). Skromni raspon  $\delta^{13}\text{C}$  vrijednosti nije omogućio razlikovanje između sorti ili zemljopisnoga podrijetla, ali zato kombinacija sva tri omjera izotopa (C, O i H) predstavlja snažan alat za otkrivanje patvorenja.

### 2.3.3.3 Zajednička primjena metoda za određivanje udjela makro- i mikroelemenata i omjera stabilnih izotopa

Da bi se poboljšale mjere kontrole autentičnosti, 2002. godine pokrenut je projekt naslova „Uspostava banke podataka vina za analitičke parametre vina iz trećih zemalja“ (WINE-DB project, G6RD-CT-2001-00646-WINE-DB). Projekt je financirala Europska Komisija u sklopu petog okvira „Konkurentski i održivi rast“, a prikupljeni su uzorci komercijalnih i autentičnih vina iz tada novih zemalja članica EU (Češka Republika, Mađarska i Rumunjska) i prekomorskih zemalja (Južna Afrika i Australija). Analizirano je više od 1800 uzoraka iz tri godine berbi (Schlesier i sur., 2009). Najprije je za svaku zemlju osmišljen plan za proizvodnju autentičnih uzoraka, uzevši u obzir sorte i vinogradarske površine te su sukladno tome prikupljeni i komercijalni uzorci za tri godine berbi. Svaka je zemlja osigurala po 50 autentičnih i komercijalnih uzoraka za svaku godinu berbe. Autentični su uzorci uključeni da bi se eliminirali svi antropogeni utjecaji te bi trebali odražavati podrijetlo bez obzira na uvjete vinifikacije, dok komercijalni uzorci uključuju sve antropogene utjecaje. U svim su uzorcima inicijalno analizirana 104 parametra, uključujući četiri omjera stabilnih izotopa, 34 anorganska parametra, 19 rijetkih zemnih elemenata, 9 biogenih amina i 38 klasičnih parametara kvalitete vina. Nakon prve godine istraživanja, broj parametara je statističkom obradom smanjen na 58 najznačajnijih. Elementi su analizirani ICP-MS tehnikom, a izotopi IRMS i NMR tehnikama. Za ostale su parametre korištene tehnike plinske i tekućinske kromatografije te enzimatske metode i ostale uobičajene analitičke metode.

Drugi dio ovoga istraživanja (Smeyers-Verbeke i sur., 2009) obuhvatio je deskriptivnu i istraživačku analizu podataka i dao prikaz univarijatnih statističkih rezultata. Za svaku su zemlju najvažniji izvor varijacija razlike između komercijalnih i autentičnih uzoraka, nakon čega slijedi razlika između crnih i bijelih vina. Pokazalo se da je južnoafrička vina lako razlikovati od vina iz ostalih zemalja na temelju pojedinog izotopskog omjera bilo da je to  $(D/H)_I$ ,  $(D/H)_{II}$  etanola ili  $\delta^{18}O$  vode vina, dok je razlikovanje EU vina, a posebno uzoraka iz Mađarske i Češke, malo složenije jer su prisutna brojna preklapanja rezultata. Zaključeno je da je za diferencijaciju vina iz europskih zemalja potrebno primijeniti multivarijatne statističke metode. Ipak, ovdje je bilo moguće identificirati varijable koje bi mogle biti važne za diskriminaciju, kao što su to uranij, vanadij i rijetki zemni elementi, koji su najvažniji za razlikovanje mađarskih od rumunjskih te čeških od rumunjskih autentičnih bijelih i crnih vina. Ove varijable nisu omogućile diferencijaciju komercijalnih uzoraka.

U trećem dijelu ovoga istraživanja (Römisch i sur., 2009) dani su rezultati odabranih multivarijatnih metoda diskriminacije i klasifikacije uz poseban naglasak na razvijanje modela koji su učinkoviti i u smislu mogućnosti predviđanja i broja potrebnih varijabli. Također je i primjena CART (engl. *Classification And Regression Trees*) metode pokazala da je južnoafrička vina vrlo lako razdvojiti od istočnoeuropskih pomoću samo jednog izotopnog parametra, ali su dobiveni slabiji rezultati za razlikovanje vina istočne Europe. Za ova su vina dobiveni modeli koji su omogućili točnu klasifikaciju u 88 do 100% slučajeva primjenom metoda RDA (engl. *Regularized Discriminant Analysis*), PLS-DA i PLS-UVE (engl. *Partial Least Squares-Uninformative Variable Elimination*). U svim je slučajevima za razlikovanje komercijalnih vina iz Mađarske, Češke i Rumunjske bilo potrebno više parametara od autentičnih vina, a također i za razlikovanje bijelih vina od crnih. Ovi rezultati se mogu uzeti kao temelj za analizu daljnjih problema utvrđivanja sljedivosti vina iz različitih zemalja.

Brojni su istraživači primijenili izotopne i multielementne metode za određivanje zemljopisnoga podrijetla vina. Jedno od najstarijih takvih istraživanja provedeno je na francuskim vinima (Martin i sur., 1999) s područja Bordeauxa. Uzorci su prikupljeni u sklopu posebnog programa koji od 1982. godine provodi tvrtka Eurofins Scientific sukladno standardiziranim postupcima. Rezultati izotopnih ispitivanja su okupljeni u specifičnoj banci podataka te kasnije korišteni kao referenca. Na sličan način su se prikupljali podaci od 1991. godine u Europskoj izotopnoj banci podataka kojom je tada upravljao Zajednički istraživački centar Europske Unije u Ispri (Italija), i to za rezultate analize etanola vina SNIF-NMR<sup>®</sup> tehnikom, a pristup kojima je ograničen samo na službene eksperte zemalja članica. U ovome su istraživanju analizirana 162 uzorka iz 10 regija (Bergerac, Bordeaux, Côte de Blaye, Côte de Bourg, Entre deux Mers, Graves, Médoc, Première Côte de Bordeaux, Sauternes i St. Emilion) te su uzete u obzir četiri godine berbi (1990., 1991., 1992. i 1993.). Osim toga, dodatno je uzorkovano 97 uzoraka iz regije Pauillac. Omjeri vodika D/H na metilnoj (I) i metilenskoj (II) skupini etanola mjereni su SNIF-NMR<sup>®</sup> tehnikom, a  $\delta^{13}\text{C}$  etanola te  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$  vode vina IRMS tehnikom, dok su elementi u tragovima mjereni ICP-MS tehnikom. Kombinacija analiza elemenata u tragovima i izotopa pružila je korisne kriterije za karakterizaciju i vinograda i godina berbi, čak i u razmjerima relativno malih područja. Zaključeno je da bi za razlikovanje godine berbe bilo dovoljno iz jedne regije prikupiti svake godine samo desetak uzoraka za banku podataka te da ovaj pristup omogućuje otkrivanje proizvoda koji odstupaju od zahtjeva kvalitete pojedinih oznaka izvornosti (franc. *appellation contrôlée*).

Karakterizacija švicarskih vinograda provedena primjenom izotopnih podataka u kombinaciji s elementima u tragovima i klasičnim parametrima pokazala je također i mogućnosti multidimenzionalne statističke obrade podataka (Gremaud i sur., 2004). Najbolja diskriminacija je postignuta pomoću varijabli  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  vode vina, stroncija, rubidija i % etanola u slučaju monovarijatne obrade, dok je primjenom multivarijatnih statističkih metoda postignuta podjela vina Švicarske u četiri glavne proizvodne zone (Tessin, Valais, Romandie i Alemanique) sa separacijskom snagom koja nikada prije nije postignuta. Peta je zona, Graubünden, definirana samo za 2001. godinu. Međutim, zaključili su da tako veliki broj varijabli nije u praksi moguće jednostavno primijeniti i iz ekonomskih i iz statističkih razloga te da bi se buduća istraživanja trebala usredotočiti na najperspektivnije varijable, kao što je to element stroncij.

Na Cipru je provedeno nekoliko istraživanja u kojima su promatrane varijacije u izotopima i elementima u odnosu na sortu grožđa, okolišne uvjete i geografsko podrijetlo. Korištene su tehnike IRMS, ICP-OES i NMR za analizu autentičnih vina koja su dio ciparske banke autentičnih vina te ciparskih komercijalnih vina. Analizirana su vina iz različitih regija (Lemosos, Larnaca and Pafos) i više godina berbi (2006-2010) te nekoliko autohtonih (Xynisteri, Maratheftiko, Oftalmo, Mavro, Giannoudi) i ostalih sorti (Cabernet Sauvignon, Shiraz). Dobiveni su vrijedni podaci koji mogu upotpuniti banku podataka ciparskih vina i omogućiti bolje definiranje svojstava vina određenih oznaka izvornosti čime se pruža podrška promociji ciparskih vina i vinara i unapređuje status ciparskih vina na svjetskom tržištu. Ovim su istraživanjima ciparska znanstvena zajednica i lokalna uprava dobili nove alate za zaštitu potrošača od patvorenja, a proizvođači mogu dobiti priznanje na tržištu i potencijalno veće cijene svojih proizvoda (Kokkinofta i sur., 2014; Kokkinofta i sur., 2017).

Mogućnosti izotopnih i multielementnih tehnika kao „otiska prsta“ pri regionalnom razlikovanju rumunjskih vina istražena su za dvije godine berbe i različite autohtone i introducirane svjetske sorte (Dinca i sur., 2016). Elementi Mn, Ni, Cu, Zn, Pb, V i  $\delta^{18}\text{O}$  su identificirani kao prikladni pokazatelji sa sposobnošću diskriminacije vina prema njihovoj regiji proizvodnje. Pokazalo se da  $\delta^{18}\text{O}$  ima najjaču povezanost s klimatskim uvjetima i zemljopisnim podrijetlom, dok je  $\delta^{13}\text{C}$  manje značajan za zemljopisnu diskriminaciju na razini zemlje. Najvažniji je zaključak da je kombiniranom primjenom izotopnih i multielementnih metoda s multivarijatnim statističkim metodama dobiven obećavajući statistički model za klasifikaciju vina obzirom na zemljopisno podrijetlo.

Razlikovanje uzoraka vina iz pograničnih područja Austrije, Češke, Slovačke i Srbije, istraženo je primjenom različitih tehnika (npr. IRMS, NMR, ICP-MS, ICP-OES, EPR, HPLC,



UV-VIS), a dobivene su obećavajuće mogućnosti za utvrđivanje geografskog podrijetla (Roca i sur., 2019).

Multielementne i izotopne tehnike su također primijenjene u istraživanju hrvatskih vina iz kontinentalnih i primorskih vinogorja, odnosno iz tri vinogradarske zone (B, CI i CII). Dobiveni rezultati su potvrdili da su stabilni izotopi kisika i ugljika najvažniji pokazatelji geografskog podrijetla vina iz hrvatskih vinorodnih područja i zona, a posebno u kombinaciji s multielementnim sastavom (Leder i sur., 2021).

Nisu se samo u Europi provodila istraživanja s ciljem utvrđivanja geografskog podrijetla vina. U znanstvenoj su literaturi dostupni i radovi koje su objavili brazilski (Dutra i sur., 2013), argentinski (Di Paola-Naranjo i sur., 2011), pa čak i kineski autori (Fan i sur., 2018).

Dutra i sur. (2013) istražili su razlike između brazilskih vina proizvedenih mikroviniifikacijom iz grožđa dvije sorte (Cabernet Sauvignon i Merlot), godina berbi 2007. i 2008. te iz tri regije uzgoja (Serra Gaúcha, Campanha i Serra do Sudeste) s ciljem njihovog razlikovanja. Također je istražen utjecaj godine berbe na izotopni sastav. Analize izotopa  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  provedene su IRMS tehnikom, a određivanje mineralnog sastava (Mg, Mn, Ca, Rb i Li) plamenom atomskom apsorpcijom. Najbolji parametri za klasifikaciju vina berbe 2008. bili su Rb i Li. Rezultati za  $\delta^{13}\text{C}$  etanola vina, Rb i Li pokazali su značajne razlike između sorti, bez obzira na regiju podrijetla. Vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  vode vina i  $\delta^{13}\text{C}$  etanola vina pokazali su značajne razlike bez obzira na sortu. Diskriminantna analiza izotopa i minerala omogućila je točno klasificiranje oko 80 % vina obzirom na regiju podrijetla.

Kod argentinskih je vina (Di Paola-Naranjo i sur., 2011) postignuto dobro razlikovanje između regija podrijetla na temelju geokemijskih omjera K/Rb i Ca/Sr. Najbolji pokazatelji podrijetla bili su koncentracija magnezija i omjer  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ .

U istraživanju provedenom na kineskim vinima zaključeno je da je za potvrđivanje pripadnosti pojedinoj od tri promatrane regije najbolja kombinacija  $\delta^{18}\text{O}$  i profila elemenata s multivarijantnim metodama statističke analize (Fan i sur., 2018).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1 Materijali

#### 3.1.1 Uzorci vina

U ovome su radu prikazani rezultati analize makro- i mikroelemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika u ukupno 190 uzoraka vina, i to za 2015. i 2016. godinu berbe.

Dio je uzoraka proizveden mikrovinifikacijom sukladno Uredbi EU (2018/274) i pripada hrvatskoj bazi izotopnih podataka autentičnih vina. Za pripremu svakoga uzorka ubrano je 25 kg grožđa, koje je muljano i prešano. Nakon prešanja dobiveni mošt je sumporen, a alkoholna fermentacija je pokrenuta dodatkom selekcioniranih kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*, Uvaferm™, Danstar Ferment AG, Fredericia, Danska). Niti za bijele niti za crne sorte nije provedena maceracija. Po završetku fermentacije, vino je odtočeno od taloga, filtrirano, sulfirano i punjeno u boce zapremnine 0,75 L te označeno na odgovarajući način.

Dio uzoraka je konvencionalno proizveden i prikupljen od raznih proizvođača u sklopu postupka za stavljanje vina na tržište u Centru za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo, Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH-CVVU). Budući se radi o komercijalnim proizvođačima, detaljni postupci proizvodnje pojedinog uzorka nisu poznati.

Radom su obuhvaćeni uzorci vina iz kontinentalnog i primorskog područja Hrvatske, iz tri vinogradarske zone (B, CI i CII), četiri regije uzgoja (Središnja bregovita Hrvatska, Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija) (NN 32/19) i dvanaest zaštićenih oznaka izvornosti (ZOI) koje su registrirane u EU (*eAmbrosia – the EU geographical indications register*). Broj analiziranih uzoraka vina obzirom na zemljopisno podrijetlo, način proizvodnje (autentična ili konvencionalna), godinu berbe i sortiment naveden je u Tablici 2.

U analizu su bila uključena vina autohtonih i međunarodnih sorti vinove loze:

- *Autohtone sorte bijelog grožđa*: Bogdanuša, Cetinka, Kraljevina, Malvazija istarska, Maraština, Pošip bijeli, Škrlet, Vugava i Žlahtina.
- *Autohtone sorte crnog grožđa*: Babić, Plavac mali crni i Plavina.
- *Međunarodne sorte bijelog grožđa*: Chardonnay, Graševina, Muškat žuti, Pinot bijeli, Pinot sivi, Rajnski rizling, Rizvanac, Sauvignon, Silvanac zeleni i Traminac.
- *Međunarodne sorte crnog grožđa*: Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Frankovka, Merlot i Zweigelt.

**Tablica 2.** Broj analiziranih uzoraka vina prema zemljopisnom podrijetlu (zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te zaštićene oznake izvornosti - ZOI), načinu proizvodnje (autentična - A ili konvencionalna - C), godini berbe (2015. i 2016.) i sortimentu (autohtone sorte označene su zvjezdicom\*).

Zemljopisno područje	Kontinentalna Hrvatska							Primorska Hrvatska					Σn
<b>n (područje)</b>	120							70					<b>190</b>
<b>n (A)</b>	42							36					<b>78</b>
<b>n (C)</b>	78							34					<b>112</b>
<b>n (2015.)</b>	53							38					<b>91</b>
<b>n (2016.)</b>	67							32					<b>99</b>
<b>Zona</b>	<b>B</b>			<b>CI</b>				<b>CII</b>					
<b>Regija</b>	<b>Središnja bregovita Hrvatska</b>				<b>Slavonija i hrvatsko Podunavlje</b>			<b>Hrvatska Istra i Kvarner</b>		<b>Dalmacija</b>			
<b>n (regija)</b>	78				42			29		41			<b>190</b>
<b>n (A)</b>	25				17			13		23			<b>78</b>
<b>n (C)</b>	53				25			16		18			<b>112</b>
<b>n (2015.)</b>	31				22			16		22			<b>91</b>
<b>n (2016.)</b>	47				20			13		19			<b>99</b>
<b>ZOI</b>	<b>Moslavina</b>	<b>Plešivica</b>	<b>Pokuplje</b>	<b>Prigorje-Bilogora</b>	<b>Zagorje-Medimurje</b>	<b>Hrvatsko Podunavlje</b>	<b>Slavonija</b>	<b>Hrvatska Istra</b>	<b>Hrvatsko primorje</b>	<b>Dalmatinska zagora</b>	<b>Sjeverna Dalmacija</b>	<b>Srednja i južna Dalmacija</b>	
<b>n (ZOI)</b>	10	21	2	20	25	13	29	24	5	7	4	30	<b>190</b>
<b>n (A)</b>	2	3	2	9	9	5	12	8	5	5	4	14	<b>78</b>
<b>n (C)</b>	8	18	0	11	16	8	17	16	0	2	0	16	<b>112</b>
<b>Sorte bijelog grožđa (n)</b> *autohtone sorte	Chardonnay (9), Graševina (47), Kraljevina* (1), Muškat žuti (1), Pinot bijeli (4), Pinot sivi (5), Rajnski rizling (7), Rizvanac (1), Sauvignon (8), Silvanac zeleni (5), Škrlet* (2), Traminac (3), mješavina bijelih sorti (1).							Bogdanuša* (1), Cetinka* (1), Chardonnay (6), Malvazija istarska* (8), Maraština* (1), Muškat žuti (1), Pošip bijeli* (6), Vugava* (1), Žlahtina* (1).					<b>120</b>
<b>Sorte crnog grožđa (n)</b> *autohtone sorte	Cabernet Sauvignon (8), Frankovka (5), Merlot (9), Pinot crni (1), Zweigelt (2), mješavina crnih sorti (1).							Babić* (1), Cabernet Franc (1), Cabernet Sauvignon (2), Plavac mali crni* (22), Plavina* (1), mješavina crnih sorti (2).					<b>70</b>

### 3.1.2 Kemikalije

#### 3.1.2.1 Kemikalije za analize makro- i mikroelemenata ICP-OES tehnikom

Za analize makro- i mikro elemenata korišteni su plinovi argon, CAS 7440-37-1 i dušik, CAS 7727-37-9 (99,999 vol %, Messer Croatia plin d.o.o., Zaprešić, Hrvatska) te standardne otopine elemenata koje su navedene u Tablici 3.

**Tablica 3.** Standardne otopine elemenata analiziranih ICP-OES-om.

Element	$\gamma$ (g/L)	kat. br.	CAS	Proizvođač
<b>Al</b>	1,0	PAL2A2	7429-90-5	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>As</b>	1,0	N9300180	7440-38-2	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>B</b>	1,0	195861000	7440-42-8	Acros Organics, New Jersey, SAD
<b>Ba</b>	1,0	PBA2A2	7440-39-3	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Ca</b>	1,0	N9303763	7440-70-2	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Cd</b>	1,0	N9300176	7440-43-9	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Co</b>	1,0	PCO2A2	7440-48-4	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Cr</b>	1,0	195911000	7440-47-3	Acros Organics, New Jersey, SAD
<b>Cu</b>	1,0	PCU2A2	7440-50-8	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Fe</b>	1,0	PFE2A2	7439-89-6	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>K</b>	10,0	N9304120	7440-09-7	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Li</b>	1,0	PLI2A2	7439-93-2	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Mg</b>	1,0	N9300179	7439-95-4	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Mn</b>	1,0	PMN2A2	7439-96-5	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Mo</b>	1,0	N9303784	7439-98-7	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Na</b>	1,0	N9303785	7440-23-5	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Pb</b>	1,0	N9300175	7439-92-1	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
<b>Rb</b>	1,0	PRB2A2	7440-17-7	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Sn</b>	1,0	PSN2A13	7440-31-5	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Sr</b>	1,0	PSR2A2	7440-24-6	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>V</b>	1,0	PV2A19	7440-62-2	Reagecon, Shannon, County Clare, Irska
<b>Zn</b>	1,0	N9300178	7440-66-6	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD

Iz 60 % HNO<sub>3</sub> (kat. br. UN 2031, CAS 7697-37-2, Merck, Darmstadt, Njemačka) razrjeđivanjem s ultračistom vodom (18 M $\Omega$ /cm) pripremljena je 2% HNO<sub>3</sub> koja je korištena kao slijepa proba te za pripremu matičnih i standardnih kalibracijskih otopina, a i za razrjeđivanje uzorka. Iz standardne otopine itrija koncentracije 1,0 g/L (kat.br. N9303810, CAS 7440-65-5, Perkin Elemer, Waltham, Massachusetts, SAD) je s 2% HNO<sub>3</sub> pripremljena matična

otopina koncentracije 5 mg/L te je kao interni standard dodana u svaku standardnu otopinu za kalibraciju i uzorak u konačnoj koncentraciji od 100 µg/L.

Iz originalnih standardnih otopina pripremljene su matične otopine (MO) svakog elementa iz kojih su nadalje pripremljene multielementne standardne otopine za kalibraciju C1, C2, C3, C4 i C5 te jedna kontrolna otopina (QC) kojom se za vrijeme provođenja analiza pomoću kontrolne karte pratila kvaliteta rezultata (Tablica 4).

**Tablica 4.** Koncentracije matičnih otopina (MO), standardnih kalibracijskih otopina (C1, C2, C3, C4 i C5) te kontrolne otopine (QC) korištene za analize ICP-OES-om.

Element (γ)	MO	C1	C2	C3	C4	C5	QC
Al (mg/L)	100	0,1	0,5	1	1,5	2	1
As (µg/L)	15000	15	75	150	225	300	150
B (mg/L)	250	0,25	1,25	2,5	3,75	5	2,5
Ba (mg/L)	50	0,05	0,25	0,5	0,75	1	0,5
Ca (mg/L)	1000	5	25	50	75	100	50
Cd (µg/L)	1000	1	5	10	15	20	10
Co (µg/L)	500	0,5	2,5	5	7,5	10	5
Cr (µg/L)	500	0,5	2,5	5	7,5	10	5
Cu (mg/L)	50	0,05	0,25	0,5	0,75	1	0,5
Fe (mg/L)	500	0,5	2,5	5	7,5	10	5
K (mg/L)	10000	100	500	1000	1500	2000	1000
Li (µg/L)	1000	1	5	10	15	20	10
Mg (mg/L)	1000	5	25	50	75	100	50
Mn (mg/L)	250	0,25	1,25	2,5	3,75	5	2,5
Mo (µg/L)	500	0,5	2,5	5	7,5	10	5
Na (mg/L)	1000	1	5	10	15	20	10
Pb (µg/L)	15000	15	75	150	225	300	150
Rb (mg/L)	250	0,25	1,25	2,5	3,75	5	2,5
Sn (mg/L)	50	0,05	0,25	0,5	0,75	1	0,5
Sr (mg/L)	50	0,05	0,25	0,5	0,75	1	0,5
V (µg/L)	5000	5	25	50	75	100	50
Zn (mg/L)	250	0,25	1,25	2,5	3,75	5	2,5

### 3.1.2.2 Kemikalije za analize omjera stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Za analize omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  korišten je certificirani referentni materijal BCR-656 (etanol 96 vol%, Institut za referentne materijale i mjerenja, Geel, Belgija) i plinovi: helij (CAS 07440-59-7), kisik (CAS 07782-44-7) te ugljični dioksid kao sekundarni referentni

plin za mjerenje (CAS 00124-38-9), 99,999 vol %, Messer Croatia plin d.o.o., Zaprešić, Hrvatska.

Oksidacijski reagensi za reaktor i sustav za izgaranje uzorka: bakrov (II) oksid (CAS 7440-50-8), kromov (III) oksid granulirani, 25-60 mash (CAS 1308-38-9), srebro kobaltov (II,III) oksid (CAS 1308-38-9), Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka. Kao reagens za sušenje odnosno eliminiranje vode nastale u procesu izgaranja korišten je magnezij perklorat – anhidron (CAS 10034-81-8), Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka.

Reagensi za određivanje vode po Karl Fischer-ovoj metodi: Titrant 5 (kat. br. 1.88010 Merck, Darmstadt, Njemačka), Solvent (kat. br. 1.880515, Merck, Darmstadt, Njemačka), standard vode 1%, 1 g = 10 mg H<sub>2</sub>O za volumetrijsku Karl Fischer titraciju (kat.br. 188052, Merck, Darmstadt, Njemačka).

Uzorci su na IRMS-u mjereni prema certificiranom referentnom materijalu BCR-656 (Institut za referentne materijale i mjerenja, Geel, Belgija).

### 3.1.2.3 Kemikalije za analize omjera stabilnih izotopa <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O

Za analize omjera stabilnih izotopa <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O korišteni su:

- certificirani referentni materijali: VSMOW (engl. *Vienna-Standard Mean Ocean Water*) i SLAP (engl. *Standard Light Antarctic Precipitation*), Međunarodna agencija za atomsku energiju, Beč, Austrija;
- plinovi: helij (CAS 07440-59-7), ugljični dioksid kao sekundarni referentni plin za mjerenje (CAS 00124-38-9) i ugljični dioksid za izotopno uravnoteženje (mješavina 0.3 % CO<sub>2</sub> u heliju), 99,999 %, Messer Croatia plin d.o.o., Zaprešić, Hrvatska.

## 3.2.3 Instrumenti i pribor

### 3.1.3.1 Instrumenti i pribor za analize makro- i mikroelemenata ICP-OES tehnikom

Spektrometar optičke emisije induktivno spregnute plazme, Optima 2000 DV (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA) opremljen peristaltičkom pumpom za unos uzoraka i staklenom komorom po Meinhardt u za prevođenje uzorka u oblik aerosola (Slika 2.). Spektrometrom se upravlja putem softwera WinLab32 (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA).

Uređaj za proizvodnju ultračiste vode Simplicity (Millipore, Molsheim, Francuska).



Slika 2. Spektrometar optičke emisije induktivno spregnute plazme u laboratoriju HAPIH-CVVU. Vlastita fotografija.

### 3.1.3.2 Instrumenti i pribor za pripremu uzorka za analize omjera stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Automatizirani sustav za destilaciju (engl. *Automated Distillation Control System* – ADCS) za pripremu uzorka za analize omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (Eurofins, Nantes, Francuska) opremljen računalom sa softverom (ADSC V1.1.9.0) koji podržava ADCS sustav, elektroničkim sučeljem koje omogućuje automatizirano kontroliranje procesa destilacije pomoću softvera i četiri destilacijska mjesta (Slika 3).

Automatski volumetrijski titrator po Karl Fischer-u DL31 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) korišten je za određivanje udjela vode u dobivenom destilatu (Slika 3). Za upravljanje titratorom koristi se softver LabX light. Softver Eurokarl Windows v.1.0.0.0 je primijenjen za prijenos rezultata alkoholne jakosti destilata u ADCE softver u kojem se izračunava iskorištenje destilacije. Anton Paar Alcoalyzer (Anton Paar, Graz, Austrija) i denzimetar su primijenjeni za određivanje alkoholne jakosti uzoraka vina (Benes i sur., 2008) prije destilacije.





Slika 3. Automatizirani sustav za destilaciju (lijevo) i automatski volumetrijski titrator po Karl Fischeru (desno) u laboratoriju HAPIH-CVVU. Vlastita fotografija.

### 3.1.3.3 Instrumenti i pribor za analize omjera stabilnih izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Spektrometar masa omjera stabilnih izotopa Delta V Plus (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka) koji omogućuje određivanje relativnih udjela izotopa ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  u  $\text{CO}_2$ , opremljen analizatorom elemenata FlashEA 1112 Series (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka) u kojem uzorak etanola sagorijeva do ugljičnog dioksida te izmjenjivačem uzoraka AI 1310 (Thermo Scientific, Bremen, Njemačka), (Slika 4).

### 3.1.3.4 Instrumenti i pribor za analize omjera stabilnih izotopa $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

Spektrometar masa omjera stabilnih izotopa Delta V Plus (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka) koji omogućuje određivanje relativnih udjela izotopa kisika  $^{18}\text{O}$  u  $\text{CO}_2$ , opremljen sustavom za provedbu izotopnog uravnoteženja između  $\text{CO}_2$  i vode u vinu koji se sastoji od držača uzoraka sa kontroliranom temperaturom ( $\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ) i periferne jedinice za pripremu i uvođenje plina (GasBench II, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka). Sustav ima kontinuirani protok kojim se pomoću automatskog izmjenjivača uzoraka kvantitativno prenosi  $\text{CO}_2$  iz bočica s uzorcima u kojima se odvijalo uravnoteženje, ali i referentni  $\text{CO}_2$  u spektrometar masa (Slika 5).



Slika 4. Analizator elemenata u laboratoriju HAPIH-CVVU. Vlastita fotografija.



Slika 5. Spektrometar masa IRMS u laboratoriju HAPIH-CVVU. Detektor Delta V Plus (lijevo dolje) i periferna jedinica za pripremu i uvođenje plina (desno gore). Vlastita fotografija.

Uređaj za proizvodnju demineralizirane vode Elix Advantage 15 UV (Millipore, Molsheim, Francuska).

## 3.2 Metode rada

### 3.2.1 ICP-OES metoda određivanja 22 elementa

Tehnikom ICP-OES određen je sadržaj Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Rb, Sn, Sr, V i Zn u vinima na uređaju Optima DV, Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, SAD.

#### 3.2.1.1 Priprema uzorka za određivanje elemenata

Budući da prisustvo organskih tvari onemogućuje gorenje plazme, uzorcima je potrebno ukloniti etanol. Stoga je za analizu korišten ostatak nakon destilacije (dakle vino iz kojeg je uklonjen etanol) prilikom pripreme uzorka za određivanje omjera izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  kako je opisano u radu Miloš i suradnika (2018).

U destilacijsku tikvicu se unese 200 mL vina i destilira dok se etanol u potpunosti ne prebaci u prihvatnu tikvicu. Ostatak nakon destilacije se iz destilacijske tikvice kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu te se volumen ponovno podesi na 200 mL s 2%  $\text{HNO}_3$ . Uzorak se razrijedi s 2%  $\text{HNO}_3$  u omjeru 1:1 uz dodatak 100  $\mu\text{g/L}$  itrija kao internog standarda i potom mjeri na ICP-OES-u.

#### 3.2.1.2 Identifikacija i kvantifikacija elemenata

Za identifikaciju pojedinih elemenata primijenjene su valne duljine koje su karakteristične za svaki element (Larcher i Nicolini, 2001), a za kvantifikaciju je provedena integracija površine ispod pika s određenim brojem točaka integracije po piku. Za većinu elemenata je za integraciju korišteno sedam točaka, osim za As, Co, Mo i V (5 točaka) te jedna točka za Pb.

Za eliminaciju utjecaja pozadinskog zračenja i spektralnih interferencija primijenjena je metoda BGC (engl. *background correction*) koju omogućuje software u odgovarajućem broju točaka za pojedini element. Za Cr i Pb je primijenjena BGC u jednoj, a za sve ostale elemente u dvije točke. Ovisno o koncentraciji pojedinih elemenata u uzorku, primijenjen je radijalni (plazma se promatra bočno, okomito na smjer plazme, što je pogodno za visoke koncentracije) ili aksijalni način rada optike instrumenta (plazma se promatra kroz rep, vodoravno, a to je pogodno za niske koncentracije). Tako su radijalnim načinom promatrani makroelementi Ca, K, Mg i Na, a svi ostali aksijalnim načinom.

### 3.2.1.3 Postavke spektrometra optičke emisije induktivno spregnute plazme

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 5. zajedno sa snagom generatora radiofrekvencije, frekvencijom elektromagnetskog polja te brzinom unosa uzorka u instrument pomoću peristaltičke pumpe.

**Tablica 5.** Postavke spektrometra optičke emisije induktivno spregnute plazme.

	<b>Parametar</b>	<b>Vrijednost</b>
protok argona	glavni	15 L min <sup>-1</sup>
	pomoćni	0,2 L min <sup>-1</sup>
	za raspršivanje uzorka	0,8 L min <sup>-1</sup>
	snaga generatora	1300 W
	frekvencija	40 MHz
	brzina unosa uzorka	1,5 mL min <sup>-1</sup>

### 3.2.2 IRMS metode određivanja omjera stabilnih izotopa

Tehnikom IRMS određeni su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika na spektrometru masa omjera stabilnih izotopa Delta V Plus opremljenim analizatorom elemenata FlashEA 1112 Series i ConFlo IV (za <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) i perifernom jedinicom za pripremu i uvođenje plina (Gasbench II) (za <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O), Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka. IRMS-om se zajedno s perifernim instrumentima upravlja pomoću softvera Isodat 3.0 (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Njemačka). Izotopni omjeri <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C i <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O izraženi su delta notacijom: δ<sup>13</sup>C i δ<sup>18</sup>O, kao dijelovi na tisuću (‰).

Svi aspekti spektrometra masa kontroliraju se softverom Isodat 3.0, uključujući stvaranje iona, razdvajanje masa i detektiranje iona. Upravljanje ionskim izvorom omogućuje podešavanje snopa i koraka magneta sa ciljem postizanja optimalnog signala.

Plinoviti uzorak koji se analizira uvodi se u ionski izvor putem ulaznog sustava igličastih ventila. U ionskom izvoru, ioni se stvaraju u visokom vakuumu zbog sudaranja s elektronima. Ioni se tada akceleriraju do energija 3 keV i fokusiraju pomoću elektrostatičkih leća u snop. Ionski snop napušta izvor i ulazi u magnetno polje pod kutom od 26,5° i zakreće

pod kutom od  $90^\circ$  unutar magnetnog polja ovisno o omjeru  $m/z$ . Dio ionskog snopa postoji i dalje pod istim kutom od  $26,5^\circ$ .

Magnetno polje se generira pomoću elektromagneta sa maksimalnom jačinom od 0,75 T, što pokriva raspon masa od  $m/z$  10 do  $m/z$  96 za najveći napon akceleracije.

Odabir mase postiže se podešavanjem jačine magnetskog polja i/ili napona akceleracije, čime se omogućuje analiziranje različitih plinova.

Zastupljenost glavnih masenih izotopomera ugljičnog dioksida 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ), 45 ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  i  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ ) i 46 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ), koje rezultiraju iz mogućih kombinacija izotopa  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{12}\text{C}$ , određuje se iz ionskih struja mjerenih pomoću trostrukog detektora s tri Faradayeva kolektora izotopnog masenog spektrometra.

### 3.2.2.1 Priprema uzorka za određivanje omjera izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Ekstrakcija etanola iz vina provedena je pomoću ADCS sustava za destilaciju opremljenog s četiri Cadiotove destilacijske kolone (Eurofins, Nantes, Francuska) sukladno OIV metodi (OIV-MA-AS311-05:R2011, OIV, 2021b) kojom se iz uzorka može ekstrahirati između 96,0 – 98,5% etanola vina bez dodatne izotopne frakcionacije 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<sup>®</sup> kao i za određivanje omjera izotopa ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  tehnikom IRMS. ADCS sustav automatizira cijeli proces, potpuno kontrolira destilaciju i preko softvera omogućuje pohranjivanje i obradu rezultata.

Za svaki je uzorak izračunato iskorištenje destilacije iz podataka za alkoholnu jakost vina i alkoholne jakosti destilata koja je dobivena posredno, određivanjem vode u destilatu titracijom po Karl Fischer-u (ASTM E203-16). To je kemijska metoda (Fischer, 1935.) 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,  $\text{SO}_2$ , piridina i metanola (stehiometrijska reakcija između jednog mola vode i jednog mola joda).

### 3.2.2.2 Određivanje omjera izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Određivanja omjera izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  u dobivenom etanolu provedeno je kako je opisano u OIV metodi (OIV-MA-AS312-06:R2001, OIV, 2021b). Pripremljeni uzorci spremljeni su u odgovarajuće bočice i injektirani u analizator elemenata pomoću izmjenjivača uzoraka.

Obzirom na osjetljivost spektrometra masa i potrebnu količinu ugljika, bilo je potrebno injektirati 0,05  $\mu\text{L}$  destilata za svaku analizu (3,84 mg apsolutnog etanola ili 4,17 mg destilata s 92 % m/m alkohola potrebno je da bi se dobilo 2 mg ugljika).

U seriju uzoraka sistematično su umetnuti radni referentni materijali i kontrolni uzorci radi osiguravanja kvalitete rezultata ispitivanja.

Izotopni omjer ugljika 13 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) izračunava se na delta skali na tisuću usporedbom rezultata dobivenih za uzorak u odnosu na prethodno kalibrirani radni referentni materijal temeljem primarnog referentnog materijala (V-PDB).

Vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  izražavaju se najprije u odnosu na radni referentni materijal:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{uz/ref}} \text{‰} = 1000 \times (\text{R}_{\text{uz}} - \text{R}_{\text{ref}}) / \text{R}_{\text{ref}} \quad (4)$$

$\text{R}_{\text{uz}}$  omjer izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  uzorka

$\text{R}_{\text{ref}}$  omjer izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  radnog referentnog materijala

Vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  se izražavaju zatim preko primarnog referentnog materijala V-PDB:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{uz/V-PDB}} \text{‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{uz/ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{uz/ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}) / 1000 \quad (5)$$

$\delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}$  odstupanje izotopa prethodno određeno za radni referentni materijal u odnosu na V-PDB

### 3.2.2.3 Određivanje omjera izotopa kisika $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

Određivanje omjera izotopa kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  u uzorcima vina provedeno je sukladno OIV metodi (OIV-MA-AS2-12:R2009, OIV, 2021b). Određivanje omjera izotopa kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  (izražen kao  $\delta^{18}\text{O}$  u ‰ prema IAEA-VSMOW) u vinima, moštovima, voćnim sokovima i uzorcima vode, temelji se na uspostavljanju ravnoteže između omjera izotopa kisika vode sadržanih u uzorku sa izotopima kisika  $\text{CO}_2$  u standardnom plinu, primjenom periferne jedinice za pripremu i uvođenje plina (GasBench II, Thermo Scientific, Bremen, Njemačka).

Nakon uspostavljenе ravnoteže između tekuće i plinovite faze analizira se  $\text{CO}_2$  iz plinovite faze pomoću IRMS-a. Mjere se struje iona m/z 46 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ) i m/z 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ) iz ugljikovog dioksida dobivenog nakon izotopnog uravnoteženja sa vodom iz vina prema reakciji:



Certificirani referentni materijali (CRM) ili radni standardi (RS) sa sljedivošću do CRM-a primjenjuju se za kalibraciju instrumenta i za korekciju rezultata mjerenja.

Pripremljena su dva RS i imaju vrijednost  $\delta^{18}\text{O}$  sljedivu do CRM-a SLAP i VSMOW. RS-i se čuvaju u spremnicima od nehrđajućeg čelika u atmosferi dušika kako bi se spriječila frakcionacija izotopa. Jedan RS je demineralizirana voda pripremljena u uređaju Elix<sup>®</sup> Advantage 15 UV (Millipore, Molsheim, Francuska). Drugi je RS pripremljen uparavanjem demineralizirane vode s ciljem dobivanja vode višeg relativnog udjela izotopa kisika  $^{18}\text{O}$ . Za provjeru točnosti analize i točnosti primijenjene korekcije rezultata u istom intervalu s uzorcima analizira se i kontrolni uzorak poznate vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  (iz međulaboratorijske usporedbe koju organizira Eurofins, Nantes, Francuska).

Uzorci vina i referentnih materijala analizirani su bez pripreme. Borosilikatne bočice se napune s 500  $\mu\text{L}$  uzorka i odmah zatvore čepom sa septumom. Bočice se poredaju u držač uzoraka prema zadanom rasporedu te se sukladno softverskoj metodi pomoću izmjenjivača uzoraka i igle za punjenje u bočice unosi mješavina helija i ugljičnog dioksida (3 % v/v  $\text{CO}_2$  u He).  $\text{CO}_2$  ostaje u prostoru iznad površine uzorka da bi se postigla ravnoteža između izotopa  $^{18}\text{O}$  vode uzorka i  $^{18}\text{O}$  ugljičnog dioksida u mješavini He i  $\text{CO}_2$  iznad uzorka. Ravnoteža se postiže nakon 24 sata pri  $24^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Nakon procesa uspostavljanja ravnoteže, dobiveni izotopomeri ugljičnog dioksida prenose se pomoću periferne jedinice za pripremu i uvođenje plina s kontinuiranim protokom (Gasbench II) u ionski izvor spektrometra masa.

Intenziteti za  $m/z = 44, 45, 46$  mjere se za svaki uzorak i referentni materijal koji se analiziraju u zadanoj seriji. Zatim se pomoću softvera IRMS-a izračunavaju izotopni omjeri  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  u odnosu na referentni plin  $\text{CO}_2$  koji je prethodno kalibriran prema VSMOW. Tako dobiveni rezultati se dodatno preračunavaju u odnosu na radni standard koji je mjeran u istoj sekvenci s uzorcima, a koji je također prethodno kalibriran prema VSMOW. Krajnji rezultat izražava se kao relativna vrijednost  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  u ‰.

Za izračun  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  vrijednosti koristi se jednačba:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = \left[ \frac{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{uzorak}} - \left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{VSMOW}}}{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{VSMOW}}} \right] \times 1000 \text{ [‰]} \quad (7)$$

$\delta^{18}\text{O}$  vrijednost normalizirana prema VSMOW/SLAP skali izračunava se prema jednadžbi:

$$\delta^{18}\text{O}_{V-SMOW/SLAP} = \left[ \frac{\delta^{18}\text{O}_{\text{uzorak}} - \delta^{18}\text{O}_{V-SMOW}}{\delta^{18}\text{O}_{V-SMOW} - \delta^{18}\text{O}_{SLAP}} \right] \times 55,5 [\text{‰}] \quad (8)$$

### 3.2.3 Validacija primijenjenih analitičkih metoda

Kako bi se utvrdilo da su primijenjene analitičke metode pogodne za namijenjenu svrhu, a to je određivanje elemenata ICP-OES metodom i određivanje omjera omjera stabilnih izotopa IRMS metodom, provedena je njihova validacija.

Validacija metode za određivanje 22 elementa ICP-OES tehnikom provedena je pomoću sljedećih validacijskih parametara sa svaki element: linearnost, kalibracijski raspon, granica detekcije i kvantifikacije, ponovljivost, intermedijarna preciznost te točnost (Leder i sur., 2021).

Validacija pripreme uzorka za određivanje omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  pomoću ADCS automatiziranog sustava za destilacije provedena je utvrđivanjem ponovljivosti određivanja vode u destilatu, ponovljivosti određivanja alkoholne jakosti destilata i ponovljivosti iskorištenja destilacije uzorka. Ova metoda ujedno predstavlja i pripremu uzorka za određivanje elemenata ICP-OES tehnikom, budući da se elementi određuju u ostatku nakon destilacije, odnosno vinu kojem je ekstrahirano etanol, a postupak validacije je objavljen u radu Miloš i suradnika (2018).

Validacija IRMS metoda za određivanje omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  provedena je pomoću parametara linearnosti, ponovljivosti, intermedijarne preciznosti i točnosti. Nakon uspješnog sudjelovanja u međulaboratorijskim usporedbama obje metode za određivanje omjera stabilnih izotopa su prije početka provedbe analize uzoraka i akreditirane sukladno HRN EN ISO/IEC 17025 u laboratoriju HAPIH-CVVU-a (Prilog potvrdi o akreditaciji br. 1022).



### 3.2.4 Statistička obrada podataka

Rezultati mjerenja izotopnih omjera i elemenata učitani su u softverski paket Statistica 10.0 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA) i obrađeni pomoću deskriptivne statističke analize (određene su prosječne vrijednosti i standardne devijacije) te je provedena analiza varijance (General Linear Model – Analysis of Variance, GLM-ANOVA i post hoc Tukey test, nakon čega su uslijedile dvije metode multivarijatne statističke analize, PCA i GDA, kako bi se ustanovila sposobnost dobivenih podataka za razlikovanje uzoraka iz različitih vinorodnih područja, zona i regija Hrvatske te odabranih zaštićenih oznaka izvornosti. PCA je provedena primjenom Unscrambler<sup>®</sup> softverskog paketa (verzija 11.0, CAMO AS, Norveška), a GDA pomoću Statistica 10.0 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Za statističku obradu, rezultati elemenata s vrijednostima ispod granice detekcije (GD) postavljeni su na  $GD / 2$  (EPA, 2006). Za vizualnu prezentaciju rezultata korišten je MS Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office Professional Plus 2019, Microsoft Excel 2019 MSO (16.0.10354.20022)).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1 Rezultati validacije metoda za određivanje elemenata (ICP-OES) te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika (IRMS)

**Tablica 6.** Rezultati validacije metode za određivanje elemenata ICP-OES metodom (linearnost, kalibracijski raspon, granice detekcije i kvantifikacije, ponovljivost, intermedijarna prediznost i točnost).

Element ( $\gamma$ )	Linearnost (r)	Kalibracijski raspon	Granica detekcije	Granica kvantifikacije	Ponovljivost (RSD, %)	Intermedijarna preciznost (RSD, %)	Točnost (%)
Al (mg/L)	0,996	0,1 - 2,0	0,0004	0,0015	0,7	2,4	93,2
As ( $\mu\text{g/L}$ )	0,997	15 - 300	9	28	2,1	5,4	97,1
B (mg/L)	0,997	0,25 - 5,0	0,001	0,002	0,9	6,2	94,3
Ba (mg/L)	0,998	0,05 - 1,00	0,00001	0,00005	0,2	2,5	98,9
Ca (mg/L)	0,995	5,0 - 100,0	0,004	0,014	1,1	7,4	100,8
Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	0,999	1 - 20	0,3	0,9	0,9	2,2	100,5
Co ( $\mu\text{g/L}$ )	0,997	0,5 - 10,0	0,4	1,2	4,7	5,4	105,8
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	0,996	0,5 - 10,0	0,3	1,2	4,4	8,1	106,5
Cu (mg/L)	0,997	0,05 - 1,00	0,0004	0,0013	0,3	2,3	97,6
Fe (mg/L)	0,999	0,5 - 10,0	0,003	0,009	0,1	3,6	101,3
K (mg/L)	0,999	100 - 2000	0,05	0,16	0,4	4,0	105,6
Li ( $\mu\text{g/L}$ )	0,993	1 - 20	0,004	0,014	0,3	3,3	93,1
Mg (mg/L)	0,999	5 - 100	0,002	0,005	0,4	3,3	99,5
Mn (mg/L)	0,999	0,25 - 5,00	0,00004	0,00014	0,6	2,9	100,9
Mo ( $\mu\text{g/L}$ )	0,991	0,5 - 10	0,1	0,2	6,5	16,7	107,3
Na (mg/L)	0,996	1,0 - 20,0	0,003	0,01	0,4	3,3	98,4
Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	0,999	15 - 300	5	16	0,6	2,6	101,0
Rb (mg/L)	0,996	0,25 - 5,00	0,0003	0,0009	0,2	4,3	95,8
Sn (mg/L)	0,998	0,05 - 1,00	0,004	0,012	0,7	2,6	98,5
Sr (mg/L)	0,999	0,05 - 1,00	0,000004	0,000014	0,6	3,4	100,2
V ( $\mu\text{g/L}$ )	0,995	5 - 100	0,3	1,1	0,2	3,8	107,5
Zn (mg/L)	1,000	0,25 - 5,00	0,0005	0,0018	0,8	3,3	101,3

**Tablica 7.** Rezultati validacije metode za pripremu uzorka za određivanje  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (ponovljivost određivanja vode u destilatu, ponovljivost određivanja alkoholne jakosti destilata i ponovljivost iskorištenja destilacije uzorka),

<b>Validacija pripreme uzorka za određivanje <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math></b>	
Ponovljivost određivanja vode u destilatu (RSD, %)	0,3
Ponovljivost određivanja alkoholne jakosti destilata (RSD, %)	0,2
Ponovljivost iskorištenja destilacije uzorka (RSD, %)	0,4

**Tablica 8.** Rezultati validacije IRMS metode za određivanje omjera stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (linearnost, ponovljivost, intermedijarna preciznost i točnost).

<b>Validacija IRMS metode za određivanje omjera stabilnih izotopa <math>^{18}\text{O}/^{16}\text{O}</math> i <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math></b>		
<b>Omjeri izotopa (‰)</b>	<b><math>^{18}\text{O}/^{16}\text{O}</math></b>	<b><math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math></b>
Linearnost (r)	0,9999	0,9989
Ponovljivost (RSD, %)	2,5	0,3
Intermedijarna preciznost (RSD, %)	5,5	0,4
Točnost (%)	98,2	100,0

## 4.2 Rezultati mjerenja koncentracija određivanih elemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika

**Tablica 9.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina (n = 190).

Mjerna veličina	Sred. Vr.	Min.	Max.	Varijanca	Stand. Dev.	Koef. varijance
$\delta^{18}\text{O}$ (‰ VSMOW)	1,37	-7,28	7,79	6,54	2,56	186,67
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	-27,57	-30,28	-23,55	2,17	1,47	-5,34
<b>Al (mg/L)</b>	0,59	0,11	3,59	0,27	0,52	87,81
<b>As (µg/L)</b>	7,5	4,5	27,9	29,1	5,4	71,5
<b>B (mg/L)</b>	2,98	0,66	7,35	1,31	1,14	38,41
<b>Ba (mg/L)</b>	0,11	0,03	0,36	0,00	0,05	43,58
<b>Ca (mg/L)</b>	85,0	44,7	149,0	517,3	22,7	26,8
<b>Cd (µg/L)</b>	0,7	0,2	5,0	1,0	1,0	135,2
<b>Co (µg/L)</b>	5,9	1,0	34,5	19,3	4,4	74,5
<b>Cr (µg/L)</b>	19,0	4,7	161,0	290,2	17,0	89,6
<b>Cu (mg/L)</b>	0,18	0,05	1,50	0,02	0,14	79,24
<b>Fe (mg/L)</b>	1,91	0,25	8,55	1,94	1,39	72,85
<b>K (mg/L)</b>	788	392	1475	51046	226	29
<b>Li (µg/L)</b>	4,6	1,3	25,9	10,0	3,2	68,7
<b>Mg (mg/L)</b>	81,3	47,1	140,0	320,2	17,9	22,0
<b>Mn (mg/L)</b>	0,96	0,19	3,32	0,27	0,52	54,47
<b>Mo (µg/L)</b>	4,3	0,1	11,0	4,5	2,1	49,1
<b>Na (mg/L)</b>	14,3	2,7	196,5	327,5	18,1	126,3
<b>Pb (µg/L)</b>	30,2	2,5	111,0	348,1	18,7	61,8
<b>Rb (mg/L)</b>	1,08	0,37	2,79	0,17	0,41	38,16
<b>Sn (µg /L)</b>	55,0	2,0	129,0	918,4	30,3	55,1
<b>Sr (mg/L)</b>	0,46	0,10	1,92	0,05	0,21	46,61
<b>V (µg/L)</b>	83,6	49,0	133,0	281,8	16,8	20,1
<b>Zn (mg/L)</b>	0,69	0,13	2,84	0,13	0,37	52,77

### 4.3 Utjecaj boje vina, godine berbe, načina proizvodnje te zemljopisnoga podrijetla na koncentracije određivanih elemenata te omjere stabilnih izotopa ugljika i kisika

**Tablica 10.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na boju vina.

Mjerna veličina	Bijela vina (n = 120)				Crna vina (n = 70)					
	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.		
$\delta^{18}\text{O}$ (‰ VSMOW)	0,71	B	-5,30	7,79	2,24	<u>2,50</u>	A	-7,28	7,34	2,69
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	-28,09	B	-30,28	-24,45	1,19	<u>-26,67</u>	A	-29,33	-23,55	1,48
Al (mg/L)	0,55	A	0,12	2,89	0,42	0,66	A	0,11	3,59	0,65
As ( $\mu\text{g/L}$ )	7,6	A	4,5	27,2	5,3	7,5	A	4,5	27,9	5,6
B (mg/L)	2,73	B	0,66	5,05	0,99	<u>3,42</u>	A	1,27	7,35	1,26
Ba (mg/L)	0,11	A	0,03	0,36	0,05	0,11	A	0,05	0,24	0,04
Ca (mg/L)	<u>89,2</u>	A	45,3	149,0	22,3	77,8	B	44,7	148,0	21,8
Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	0,6	A	0,2	5,0	1,0	0,9	A	0,2	5,0	1,0
Co ( $\mu\text{g/L}$ )	5,6	A	1,0	28,5	4,0	6,5	A	1,0	34,5	4,9
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	18,0	A	4,7	161,0	17,1	20,8	A	6,7	91,5	16,9
Cu (mg/L)	0,18	A	0,05	1,50	0,15	0,17	A	0,06	0,75	0,11
Fe (mg/L)	1,70	B	0,25	8,55	1,43	<u>2,28</u>	A	0,41	6,07	1,25
K (mg/L)	720	B	392	1475	187	<u>906</u>	A	436	1465	239
Li ( $\mu\text{g/L}$ )	4,9	A	1,5	25,9	3,4	4,1	A	1,3	15,3	2,5
Mg (mg/L)	78,6	B	47,1	139,0	16,1	<u>86,1</u>	A	53,4	140,0	19,9
Mn (mg/L)	0,96	A	0,19	3,32	0,56	0,96	A	0,25	2,08	0,46
Mo ( $\mu\text{g/L}$ )	4,5	A	1,0	11,0	2,2	4,1	A	0,1	8,5	2,0
Na (mg/L)	12,3	B	3,4	70,4	9,0	<u>17,8</u>	A	2,7	196,5	27,2
Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	26,9	B	2,5	67,7	16,3	<u>35,8</u>	A	4,1	111,0	21,0
Rb (mg/L)	1,00	B	0,37	2,04	0,35	<u>1,21</u>	A	0,43	2,79	0,47
Sn ( $\mu\text{g/L}$ )	51,1	B	2,0	119,0	30,6	<u>61,9</u>	A	2,0	129,0	28,8
Sr (mg/L)	0,44	A	0,10	1,16	0,16	0,49	A	0,22	1,92	0,28
V ( $\mu\text{g/L}$ )	81,1	B	49,0	133,0	15,4	<u>87,8</u>	A	58,0	132,0	18,4
Zn (mg/L)	0,71	A	0,20	2,84	0,38	0,67	A	0,13	1,98	0,34

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu. Više srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 11.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  te koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na godinu berbe.

Mjerna veličina	2015. (n=91)				2016. (n=99)					
	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.		
$\delta^{18}\text{O}$ (‰ VSMOW)	<u>1,90</u>	A	-7,28	7,34	2,58	0,89	B	-4,30	7,79	2,45
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	<u>-27,33</u>	A	-30,19	-24,22	1,44	-27,79	B	-30,28	-23,55	1,47
Al (mg/L)	0,63	A	0,11	3,59	0,64	0,56	A	0,12	2,89	0,38
As ( $\mu\text{g/L}$ )	8,0	A	4,5	27,9	5,7	7,1	A	4,5	27,2	5,1
B (mg/L)	2,96	A	0,66	7,35	1,30	3,00	A	1,13	5,72	0,99
Ba (mg/L)	0,11	A	0,03	0,36	0,05	0,11	A	0,05	0,27	0,04
Ca (mg/L)	77,8	B	44,7	136,0	19,0	<u>91,5</u>	A	45,3	149,0	24,0
Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	<u>0,9</u>	A	0,2	2,7	0,8	0,6	B	0,2	5,0	1,1
Co ( $\mu\text{g/L}$ )	<u>7,7</u>	A	1,0	34,5	5,1	4,2	B	1,0	14,0	2,7
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	<u>25,0</u>	A	7,7	91,5	16,6	13,5	B	4,7	161,0	15,6
Cu (mg/L)	0,16	A	0,05	1,50	0,17	0,19	A	0,10	0,71	0,10
Fe (mg/L)	2,08	A	0,25	8,55	1,55	1,76	A	0,27	6,15	1,22
K (mg/L)	815	A	392	1475	264	764	A	414	1460	183
Li ( $\mu\text{g/L}$ )	5,0	A	1,3	25,9	4,2	4,2	A	1,9	10,8	1,5
Mg (mg/L)	81,8	A	47,1	131,0	19,1	80,9	A	49,7	140,0	16,8
Mn (mg/L)	0,99	A	0,19	3,19	0,55	0,94	A	0,28	3,32	0,50
Mo ( $\mu\text{g/L}$ )	<u>4,7</u>	A	0,1	10,1	2,2	4,0	B	1,0	11,0	2,0
Na (mg/L)	14,0	A	2,7	196,5	22,8	14,7	A	5,8	86,8	12,5
Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	<u>36,6</u>	A	4,1	111,0	19,2	24,3	B	2,5	67,7	16,1
Rb (mg/L)	1,06	A	0,37	2,79	0,46	1,09	A	0,50	2,79	0,36
Sn ( $\mu\text{g/L}$ )	39,9	B	2,0	106,0	27,7	<u>69,0</u>	A	15,0	129,0	25,6
Sr (mg/L)	0,45	A	0,10	1,92	0,26	0,47	A	0,20	1,16	0,16
V ( $\mu\text{g/L}$ )	83,9	A	49,0	128,0	18,5	83,2	A	54,0	133,0	15,2
Zn (mg/L)	0,65	A	0,13	1,71	0,32	0,74	A	0,30	2,84	0,40

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu. Više srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 12.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na način proizvodnje.

Mjerna veličina	Autentični uzorci (n=78)				Konvencionalni uzorci (n=112)					
	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.		
$\delta^{18}\text{O}$ (‰ VSMOW)	<u>2,05</u>	A	-1,35	7,79	2,44	0,89	B	-7,28	7,20	2,54
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	-27,54	A	-30,28	-23,55	1,72	-27,59	A	-29,56	-23,69	1,28
Al (mg/L)	<u>0,77</u>	A	0,29	3,59	0,54	0,47	B	0,11	3,50	0,47
As ( $\mu\text{g/L}$ )	7,5	A	4,5	25,8	4,7	7,6	A	4,5	27,9	5,8
B (mg/L)	2,66	B	0,83	4,41	0,95	<u>3,20</u>	A	0,66	7,35	1,22
Ba (mg/L)	0,11	A	0,05	0,23	0,04	0,10	A	0,03	0,36	0,05
Ca (mg/L)	69,7	B	44,7	148,0	16,9	<u>95,6</u>	A	48,6	149,0	20,1
Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	0,8	A	0,2	2,6	0,8	0,7	A	0,2	5,0	1,1
Co ( $\mu\text{g/L}$ )	6,5	A	1,0	34,5	5,0	5,5	A	1,0	28,5	3,9
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	18,5	A	4,7	91,5	15,6	19,4	A	5,6	161,0	18,0
Cu (mg/L)	0,18	A	0,10	0,75	0,11	0,17	A	0,05	1,50	0,15
Fe (mg/L)	<u>2,65</u>	A	0,48	8,55	1,50	1,40	B	0,25	6,15	1,05
K (mg/L)	779	A	491	1460	205	795	A	392	1475	240
Li ( $\mu\text{g/L}$ )	5,0	A	2,3	15,3	2,5	4,4	A	1,3	25,9	3,5
Mg (mg/L)	76,3	B	49,7	122,0	14,5	<u>84,8</u>	A	47,1	140,0	19,2
Mn (mg/L)	0,94	A	0,25	2,49	0,49	0,98	A	0,19	3,32	0,55
Mo ( $\mu\text{g/L}$ )	4,3	A	1,0	11,0	2,0	4,4	A	0,1	10,1	2,2
Na (mg/L)	<u>18,3</u>	A	5,5	196,5	26,7	11,6	B	2,7	37,7	6,6
Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	<u>40,8</u>	A	5,2	111,0	19,5	22,8	B	2,5	67,7	14,0
Rb (mg/L)	1,06	A	0,41	2,79	0,45	1,09	A	0,37	2,79	0,38
Sn ( $\mu\text{g/L}$ )	55,6	A	22,0	129,0	24,4	54,6	A	2,0	119,0	33,9
Sr (mg/L)	0,40	B	0,20	1,45	0,19	<u>0,50</u>	A	0,10	1,92	0,22
V ( $\mu\text{g/L}$ )	78,0	B	54,0	117,0	13,0	<u>87,4</u>	A	49,0	133,0	18,1
Zn (mg/L)	0,69	A	0,30	1,98	0,34	0,70	A	0,13	2,84	0,38

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu. Više srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.



**Tablica 13.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na zemljopisna područja.

Mjerna veličina	Kontinentalna Hrvatska (n = 120)				Primorska Hrvatska (n = 70)					
	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.		
$\delta^{18}\text{O}$ (‰VSMOW)	-0,22	B	-7,28	2,98	1,47	<u>4,09</u>	A	0,76	7,79	1,52
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	-28,31	B	-30,28	-23,69	1,01	<u>-26,29</u>	A	-29,20	-23,55	1,24
Al (mg/L)	0,51	B	0,11	2,89	0,42	<u>0,74</u>	A	0,11	3,59	0,64
As ( $\mu\text{g/L}$ )	7,2	A	4,5	27,2	5,1	8,2	A	4,5	27,9	5,9
B (mg/L)	2,62	B	0,66	5,72	1,03	<u>3,60</u>	A	1,44	7,35	1,07
Ba (mg/L)	0,11	A	0,03	0,36	0,05	0,10	A	0,05	0,27	0,04
Ca (mg/L)	<u>89,3</u>	A	44,7	149,0	21,2	77,5	B	45,3	148,0	23,6
Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	0,7	A	0,2	5,0	1,0	0,8	A	0,2	2,7	0,8
Co ( $\mu\text{g/L}$ )	5,5	A	1,0	28,5	3,9	6,6	A	1,0	34,5	5,1
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	17,4	A	5,6	74,0	12,0	21,8	A	4,7	161,0	23,1
Cu (mg/L)	0,17	A	0,05	1,50	0,15	0,18	A	0,08	0,75	0,12
Fe (mg/L)	1,86	A	0,25	8,55	1,43	2,01	A	0,41	6,07	1,34
K (mg/L)	730	B	392	1285	180	<u>889</u>	A	507	1475	260
Li ( $\mu\text{g/L}$ )	<u>5,2</u>	A	1,3	25,9	3,5	3,6	B	1,5	15,3	2,3
Mg (mg/L)	79,8	A	47,1	140,0	16,6	83,9	A	49,7	139,0	19,8
Mn (mg/L)	1,01	A	0,19	3,32	0,58	0,87	A	0,25	2,08	0,39
Mo ( $\mu\text{g/L}$ )	4,4	A	0,1	11,0	2,2	4,1	A	1,0	8,5	2,0
Na (mg/L)	10,6	B	2,7	55,3	7,0	<u>20,8</u>	A	5,3	196,5	27,3
Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	28,0	B	2,5	67,7	17,2	<u>33,8</u>	A	5,2	111,0	20,5
Rb (mg/L)	0,99	B	0,37	2,79	0,42	<u>1,22</u>	A	0,43	2,55	0,35
Sn ( $\mu\text{g/L}$ )	48,4	B	2,0	119,0	31,1	<u>66,3</u>	A	20,0	129,0	25,3
Sr (mg/L)	0,46	A	0,10	1,16	0,17	0,46	A	0,20	1,92	0,28
V ( $\mu\text{g/L}$ )	82,4	A	49,0	132,0	15,8	85,6	A	54,0	133,0	18,3
Zn (mg/L)	0,67	A	0,17	1,98	0,32	0,73	A	0,13	2,84	0,44

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu. Više srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 14.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na vinogradarske zone uzgoja.

Područje Zona	Kontinentalna Hrvatska (n = 120)								Primorska Hrvatska (n = 70)						
	B (n = 78)				CI (n = 42)				CII (n = 70)						
Mjerna veličina	Sred. vr.		Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.		
$\delta^{18}\text{O}$ (‰VSMOW)	-0,61	C	-7,28	1,71	1,44	0,51	B	-1,93	2,98	1,23	<u>4,09</u>	A	0,76	7,79	1,52
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	-28,38	B	-30,19	-23,69	0,99	-28,20	B	-30,28	-25,66	1,06	<u>-26,29</u>	A	-29,20	-23,55	1,24
Al (mg/L)	0,48	B	0,12	2,46	0,39	0,56	AB	0,11	2,89	0,48	<u>0,74</u>	A	0,11	3,59	0,64
As ( $\mu\text{g/L}$ )	7,2	A	4,5	25,1	5,0	7,2	A	4,5	27,2	5,2	8,20	A	4,50	27,94	5,89
B (mg/L)	2,76	B	0,91	5,72	0,97	2,36	B	0,66	4,88	1,10	<u>3,60</u>	A	1,44	7,35	1,07
Ba (mg/L)	0,11	AB	0,03	0,36	0,05	<u>0,12</u>	A	0,06	0,24	0,04	0,10	B	0,05	0,27	0,04
Ca (mg/L)	<u>92,1</u>	A	44,7	149,0	20,9	84,1	AB	51,5	145,0	20,9	77,54	B	45,3	148,0	23,6
Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	0,7	A	0,2	5,0	1,2	0,5	A	0,2	2,5	0,7	0,81	A	0,15	2,71	0,84
Co ( $\mu\text{g/L}$ )	5,8	A	1,0	28,5	4,4	4,9	A	1,0	10,5	2,6	6,64	A	1,00	34,50	5,10
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	17,4	A	5,6	74,0	11,8	17,4	A	6,8	71,5	12,6	21,82	A	4,7	161,0	23,1
Cu (mg/L)	0,18	A	0,05	1,50	0,17	0,16	A	0,06	0,63	0,09	0,18	A	0,08	0,75	0,12
Fe (mg/L)	1,78	A	0,25	6,25	1,32	2,00	A	0,25	8,55	1,61	2,01	A	0,41	6,07	1,34
K (mg/L)	730	B	392	1285	179	730	B	419	1260	185	<u>889</u>	A	507	1475	260
Li ( $\mu\text{g/L}$ )	4,7	AB	1,5	25,9	3,3	<u>6,0</u>	A	1,3	20,2	3,6	3,6	B	1,5	15,3	2,3
Mg (mg/L)	76,8	B	47,1	140,0	15,9	<u>85,4</u>	A	56,9	126,0	16,5	<u>83,9</u>	A	49,7	139,0	19,8
Mn (mg/L)	0,92	B	0,19	3,32	0,63	<u>1,19</u>	A	0,45	2,15	0,45	0,87	B	0,25	2,08	0,39
Mo ( $\mu\text{g/L}$ )	4,7	A	1,0	11,0	2,3	4,0	A	0,1	8,5	2,0	4,11	A	1,00	8,50	2,01
Na (mg/L)	10,7	B	3,4	55,3	7,9	10,2	B	2,7	27,9	5,0	<u>20,8</u>	A	5,3	196,5	27,3
Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	29,1	A	2,5	67,7	16,5	26,1	A	3,7	64,5	18,6	33,84	A	5,17	111,00	20,51
Rb (mg/L)	1,05	B	0,41	2,79	0,43	0,88	B	0,37	2,02	0,37	<u>1,22</u>	A	0,43	2,55	0,35
Sn ( $\mu\text{g/L}$ )	46,8	B	2,0	98,0	29,2	51,6	B	2,0	119,0	34,6	<u>66,3</u>	A	20,0	129,0	25,3
Sr (mg/L)	0,46	A	0,10	1,16	0,18	0,45	A	0,23	0,99	0,15	0,46	A	0,20	1,92	0,28
V ( $\mu\text{g/L}$ )	80,0	A	49,0	132,0	15,1	86,7	A	57,5	125,0	16,2	85,62	A	54,00	133,00	18,34
Zn (mg/L)	0,69	A	0,20	1,98	0,34	0,64	A	0,17	1,57	0,27	0,73	A	0,13	2,84	0,44

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu. Najviše srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 15.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na vinogradarske regije uzgoja.

Regija	Središnja bregovita Hrvatska (n = 78)				Slavonija i hrvatsko Podunavlje (n = 42)				Hrvatska Istra i Kvarner (n = 29)				Dalmacija (n = 41)							
	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.	Sred. vr.	Min.	Max.	Stand. dev.				
$\delta^{18}\text{O}$ (‰ VSMOW)	-0,61	D	-7,28	1,71	1,44	0,51	C	-1,93	2,98	1,23	3,55	B	1,20	5,95	1,12	<u>4,47</u>	A	0,76	7,79	1,66
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	-28,38	C	-30,19	-23,69	0,99	-28,20	C	-30,28	-25,66	1,06	-26,85	B	-29,20	-24,22	1,02	<u>-25,90</u>	A	-28,82	-23,55	1,24
<b>Al (mg/L)</b>	0,48	A	0,12	2,46	0,39	0,56	A	0,11	2,89	0,48	0,77	A	0,16	3,50	0,64	0,71	A	0,11	3,59	0,64
<b>As (µg/L)</b>	7,2	A	4,5	25,1	5,0	7,2	A	4,5	27,2	5,2	8,3	A	4,5	27,9	7,0	8,2	A	4,5	25,8	5,1
<b>B (mg/L)</b>	2,76	B	0,91	5,72	0,97	2,36	B	0,66	4,88	1,10	<u>3,85</u>	A	1,44	7,35	1,23	3,42	A	1,54	5,43	0,92
<b>Ba (mg/L)</b>	0,11	AB	0,03	0,36	0,05	<u>0,12</u>	A	0,06	0,24	0,04	0,11	AB	0,05	0,27	0,05	0,09	B	0,05	0,18	0,03
<b>Ca (mg/L)</b>	<u>92,1</u>	A	44,7	149,0	20,9	84,1	AB	51,5	145,0	20,9	78,1	B	53,1	148,0	21,5	77,1	B	45,3	135,0	25,2
<b>Cd (µg/L)</b>	0,7	A	0,2	5,0	1,2	0,5	A	0,2	2,5	0,7	0,8	A	0,2	2,6	0,9	0,8	A	0,2	2,7	0,8
<b>Co (µg/L)</b>	5,8	B	1,0	28,5	4,4	4,9	B	1,0	10,5	2,6	<u>8,3</u>	A	2,0	34,5	6,4	5,5	B	1,0	22,0	3,6
<b>Cr (µg/L)</b>	17,4	A	5,6	74,0	11,8	17,4	A	6,8	71,5	12,6	22,7	A	7,3	74,5	17,5	21,2	A	4,7	161,0	26,5
<b>Cu (mg/L)</b>	0,18	A	0,05	1,50	0,17	0,16	A	0,06	0,63	0,09	0,19	A	0,09	0,75	0,14	0,17	A	0,08	0,71	0,11
<b>Fe (mg/L)</b>	1,78	A	0,25	6,25	1,32	2,00	A	0,25	8,55	1,61	2,07	A	0,44	4,90	1,43	1,96	A	0,41	6,07	1,29
<b>K (mg/L)</b>	730	B	392	1285	179	730	B	419	1260	185	<u>918</u>	A	507	1475	310	869	A	539	1310	220
<b>Li (µg/L)</b>	4,7	AB	1,5	25,9	3,3	<u>6,0</u>	A	1,3	20,2	3,6	3,6	B	1,5	11,7	2,2	3,6	B	1,7	15,3	2,3
<b>Mg (mg/L)</b>	76,8	B	47,1	140,0	15,9	85,4	AB	56,9	126,0	16,5	79,4	AB	49,7	139,0	19,6	<u>87,1</u>	A	54,7	131,0	19,5
<b>Mn (mg/L)</b>	0,92	BC	0,19	3,32	0,63	<u>1,19</u>	A	0,45	2,15	0,45	1,09	AB	0,57	2,08	0,41	0,71	C	0,25	1,46	0,29
<b>Mo (µg/L)</b>	4,7	A	1,0	11,0	2,3	4,0	A	0,1	8,5	2,0	4,7	A	1,0	8,5	2,0	3,7	A	1,0	8,5	1,9
<b>Na (mg/L)</b>	10,7	B	3,4	55,3	7,9	10,2	B	2,7	27,9	5,0	<u>22,9</u>	A	5,3	90,5	22,4	19,3	AB	5,8	196,5	30,5
<b>Pb (µg/L)</b>	29,1	A	2,5	67,7	16,5	26,1	A	3,7	64,5	18,6	33,4	A	5,2	84,0	20,6	34,2	A	5,9	111,0	20,7
<b>Rb (mg/L)</b>	1,05	AB	0,41	2,79	0,43	0,88	B	0,37	2,02	0,37	1,22	A	0,43	2,04	0,37	<u>1,23</u>	A	0,62	2,55	0,35
<b>Sn (µg /L)</b>	46,8	B	2,0	98,0	29,2	51,6	B	2,0	119,0	34,6	58,9	AB	20,0	125,0	27,6	<u>71,6</u>	A	24,0	129,0	22,4
<b>Sr (mg/L)</b>	0,46	A	0,10	1,16	0,18	0,45	A	0,23	0,99	0,15	0,41	A	0,22	0,74	0,16	0,50	A	0,20	1,92	0,33
<b>V (µg/L)</b>	80,0	B	49,0	132,0	15,1	86,7	AB	57,5	125,0	16,2	81,4	AB	54,0	133,0	18,3	<u>88,6</u>	A	58,0	128,0	18,0
<b>Zn (mg/L)</b>	0,69	A	0,20	1,98	0,34	0,64	A	0,17	1,57	0,27	0,60	A	0,13	1,19	0,24	0,82	A	0,30	2,84	0,52

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu. Najviše srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 16.** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određenih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na ZOI.

Zona		B					CI		CII				
Mjerna veličina		Moslavina (n = 10)	Plešivica (n = 21)	Pokuplje (n = 2)	Prigorje- Bilogora (n = 20)	Zagorje- Međimurje (n = 25)	Hrvatsko Podunavlje (n = 13)	Slavonija (n = 29)	Hrvatska Istra (n = 24)	Hrvatsko primorje (n = 5)	Dalmatinska zagora (n = 7)	Sjeverna Dalmacija (n = 4)	Srednja i južna Dalmacija
$\delta^{18}\text{O}$ (‰ VSMOW)	Sred. vr.	-0,43	-0,45	0,59	-0,23	-1,22	0,60	0,47	3,29	4,80	5,27	3,76	<u>4,38</u>
		BC	BC		BC	C	B	B	A				A
	Min.	-1,94	-3,54	0,10	-2,62	-7,28	-0,30	-1,93	1,20	3,68	2,91	1,80	0,76
	Max.	0,42	1,34	1,08	1,71	1,56	2,22	2,98	5,13	5,95	7,79	5,56	7,34
	Stand. dev.	0,65	1,10	0,69	1,09	1,96	0,93	1,36	0,98	0,93	1,71	1,54	1,65
$\delta^{13}\text{C}$ (‰ V-PDB)	Sred. vr.	-28,05	-28,34	-28,73	-28,17	-28,67	-28,43	-28,10	-27,06	-25,82	-25,70	-25,45	<u>-26,00</u>
		BC	C		C	C	C	C	B				A
	Min.	-29,33	-29,20	-28,94	-30,19	-29,66	-30,28	-29,90	-29,20	-27,70	-28,28	-26,25	-28,82
	Max.	-27,20	-25,76	-28,51	-23,69	-26,70	-26,47	-25,66	-25,70	-24,22	-24,45	-24,56	-23,55
	Stand. dev.	0,68	0,93	0,31	1,37	0,78	1,10	1,04	0,84	1,29	1,33	0,78	1,28
Al (mg/L)	Sred. vr.	0,47	0,38	0,80	0,52	0,52	0,75	0,47	<u>0,80</u>	0,62	1,13	0,60	0,63
		AB	B		AB	AB	AB	AB	A				AB
	Min.	0,16	0,13	0,68	0,14	0,12	0,22	0,11	0,16	0,43	0,11	0,35	0,18
	Max.	1,20	1,39	0,93	2,46	1,55	2,89	1,45	3,50	1,02	3,59	0,90	2,17
	Stand. dev.	0,35	0,29	0,18	0,52	0,34	0,68	0,33	0,70	0,24	1,29	0,24	0,41
As (µg/L)	Sred. vr.	7,5	6,6	6,0	6,0	8,5	6,8	7,3	9,0	4,5	8,0	6,1	8,5
		A	A		A	A	A	A	A				A
	Min.	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Max.	23,4	25,1	7,4	17,4	19,7	27,2	19,0	27,9	4,5	13,9	8,9	25,8
	Stand. dev.	6,2	5,5	2,1	3,6	5,3	6,4	4,7	7,4	0,0	3,7	2,1	5,6
B (mg/L)	Sred. vr.	3,37	3,12	1,60	2,21	2,74	3,52	1,84	<u>3,99</u>	3,22	3,57	2,85	3,46
		AB	B		CD	BC	AB	D	A				AB
	Min.	1,40	1,74	0,96	0,91	1,65	0,83	0,66	1,44	2,11	2,17	2,35	1,54
	Max.	5,72	5,00	2,24	4,19	4,15	4,88	3,20	7,35	3,84	4,35	3,52	5,43
	Stand. dev.	1,40	0,88	0,91	0,80	0,67	1,03	0,64	1,29	0,67	0,90	0,53	0,96

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu (za ZOI sa  $n \geq 10$ ). Najviše srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 16. (1. nastavak)** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na ZOI.

Zona		B					CI		CII				
Mjerna veličina		Moslavina (n = 10)	Plešivica (n = 21)	Pokuplje (n = 2)	Prigorje- Bilogora (n = 20)	Zagorje- Međimurje (n = 25)	Hrvatsko Podunavlje (n = 13)	Slavonija (n = 29)	Hrvatska Istra (n = 24)	Hrvatsko primorje (n = 5)	Dalmatinska zagora (n = 7)	Sjeverna Dalmacija (n = 4)	Srednja i južna Dalmacija (n = 30)
Ba (mg/L)	Sred. vr.	0,12 AB	0,10 AB	0,15	0,10 AB	0,10 AB	0,10 AB	<u>0,14</u> A	0,12 AB	0,07	0,08	0,08	0,09 B
	Min.	0,08	0,03	0,11	0,03	0,06	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,07	0,05
	Max.	0,18	0,36	0,19	0,19	0,24	0,15	0,24	0,27	0,08	0,10	0,09	0,18
	Stand. dev.	0,04	0,07	0,05	0,05	0,05	0,02	0,05	0,05	0,01	0,02	0,01	0,03
Ca (mg/L)	Sred. vr.	<u>102,0</u> A	96,6 A	67,8	90,5 AB	87,5 AB	98,1 AB	77,9 B	77,8 AB	79,6	68,9	63,3	80,9 AB
	Min.	60,0	48,6	61,5	53,5	44,7	60,5	51,5	55,0	53,1	52,3	55,4	45,3
	Max.	122,0	149,0	74,0	122,0	115,0	145,0	129,0	127,0	148,0	86,5	69,0	135,0
	Stand. dev.	17,4	25,1	8,8	19,7	17,9	19,9	18,5	17,4	38,8	11,4	6,2	28,1
Cd (µg/L)	Sred. vr.	0,6 A	0,5 A	1,4	1,1 A	0,6 A	0,5 A	0,6 A	0,7 A	1,5	0,7	1,3	0,8 A
	Min.	0,2	0,2	1,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
	Max.	5,0	2,7	1,6	5,0	2,4	2,5	2,3	2,0	2,6	1,8	2,3	2,7
	Stand. dev.	1,5	0,7	0,2	1,7	0,7	0,8	0,7	0,8	1,0	0,7	0,8	0,9
Co (µg/L)	Sred. vr.	4,2 AB	5,9 AB	10,8	6,5 AB	5,3 AB	4,3 AB	5,1 AB	<u>8,5</u> A	7,3	9,1	6,0	4,6 B
	Min.	1,0	2,0	10,5	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0	4,0	2,0	3,0	1,0
	Max.	14,0	28,5	11,0	19,5	10,0	10,0	10,5	34,5	9,0	22,0	8,0	8,5
	Stand. dev.	4,0	5,7	0,4	4,6	2,9	2,6	2,6	6,9	2,2	6,9	2,2	1,9
Cr (µg/L)	Sred. vr.	14,9 A	18,8 A	27,3	14,6 A	18,5 A	14,1 A	18,9 A	24,4 A	14,5	31,5	13,4	19,8 A
	Min.	7,6	5,6	16,8	6,9	5,8	7,1	6,8	7,3	8,4	6,8	9,2	4,7
	Max.	26,7	74,0	37,8	34,3	44,1	22,2	71,5	74,5	21,1	91,5	17,9	161,0
	Stand. dev.	6,3	15,4	14,9	6,2	13,1	4,5	14,8	18,8	4,5	30,2	3,6	27,3

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu (za ZOI sa  $n \geq 10$ ). Najviše srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 16. (2. nastavak)** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na ZOI.

Zona		B					CI		CII				
Mjerna veličina		Moslavina (n = 10)	Plešivica (n = 21)	Pokuplje (n = 2)	Prigorje- Bilogora (n = 20)	Zagorje- Medimurje (n = 25)	Hrvatsko Podunavlje (n = 13)	Slavonija (n = 29)	Hrvatska Istra (n = 24)	Hrvatsko primorje (n = 5)	Dalmatinska zagora (n = 7)	Sjeverna Dalmacija (n = 4)	Srednja i južna Dalmacija (n = 30)
Cu (mg/L)	Sred. vr.	0,22 A	0,14 A	0,12	0,16 A	0,21 A	0,19 A	0,15 A	0,20 A	0,12	0,18	0,14	0,18 A
	Min.	0,10	0,05	0,11	0,07	0,11	0,10	0,06	0,09	0,11	0,08	0,11	0,08
	Max.	0,55	0,27	0,12	0,39	1,50	0,63	0,33	0,75	0,13	0,34	0,16	0,71
	Stand. dev.	0,15	0,05	0,00	0,07	0,27	0,14	0,06	0,16	0,01	0,09	0,02	0,12
Fe (mg/L)	Sred. vr.	1,90 A	1,44 A	2,88	2,31 A	1,50 A	1,63 A	2,17 A	1,96 A	2,59	2,60	2,51	1,74 A
	Min.	0,62	0,35	2,60	0,25	0,32	0,27	0,25	0,44	1,86	0,91	1,71	0,41
	Max.	4,11	6,15	3,16	6,25	5,16	3,72	8,55	4,90	3,68	5,70	3,27	6,07
	Stand. dev.	1,05	1,37	0,40	1,57	1,08	1,07	1,79	1,53	0,72	1,55	0,68	1,24
K (mg/L)	Sred. vr.	737 ABC	719 BC	545	658 C	807 ABC	730 ABC	730 BC	857 AB	1209	656	793	<u>928</u> A
	Min.	414	451	535	392	555	466	419	507	830	539	609	565
	Max.	1010	1285	555	805	1280	1260	1090	1475	1460	784	1070	1310
	Stand. dev.	176	186	14	112	198	229	165	290	248	81	211	213
Li (µg/L)	Sred. vr.	4,4 AB	4,7 AB	5,2	5,5 AB	4,1 AB	5,8 AB	<u>6,2</u> A	3,6 B	3,5	5,6	3,3	3,2 B
	Min.	2,2	1,5	2,6	2,4	1,5	3,9	1,3	1,5	2,4	1,7	2,8	1,7
	Max.	7,8	25,9	7,8	12,9	11,6	8,4	20,2	11,7	4,5	15,3	3,9	5,4
	Stand. dev.	1,7	5,2	3,7	2,6	2,1	1,4	4,3	2,4	0,8	5,0	0,5	1,0
Mg (mg/L)	Sred. vr.	82,9 ABC	72,1 C	77,3	73,3 C	81,1 BC	<u>98,8</u> A	79,4 BC	79,9 BC	77,1	82,1	78,6	89,5 AB
	Min.	71,5	47,7	76,5	47,1	56,0	89,7	56,9	56,3	49,7	54,7	71,6	59,1
	Max.	96,4	111,5	78,0	91,4	140,0	126,0	104,0	139,0	102,0	129,0	93,7	131,0
	Stand. dev.	8,6	15,9	1,1	12,6	19,7	9,6	15,5	20,1	18,9	24,7	10,3	19,1

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu (za ZOI sa  $n \geq 10$ ). Najviše srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 16. (3. nastavak)** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na ZOI.

Zona		B					CI		CII				
Mjerna veličina		Moslavina (n = 10)	Plešivica (n = 21)	Pokuplje (n = 2)	Prigorje- Bilogora (n = 20)	Zagorje- Medimurje (n = 25)	Hrvatsko Podunavlje (n = 13)	Slavonija (n = 29)	Hrvatska Istra (n = 24)	Hrvatsko primorje (n = 5)	Dalmatinska zagora (n = 7)	Sjeverna Dalmacija (n = 4)	Srednja i južna Dalmacija (n = 30)
Mn (mg/L)	Sred. vr.	<b>1,30</b>	0,82	1,31	0,91	0,83	1,16	1,20	1,14	0,88	0,81	0,56	0,71
		A	AB		AB	AB	AB	A	AB				B
	Min.	0,55	0,19	1,19	0,24	0,34	0,60	0,45	0,57	0,66	0,25	0,38	0,27
	Max.	1,99	3,19	1,43	1,81	3,32	2,01	2,15	2,08	1,21	1,46	0,85	1,30
	Stand. dev.	0,49	0,71	0,17	0,49	0,68	0,43	0,47	0,42	0,28	0,42	0,20	0,26
Mo (µg/L)	Sred. vr.	4,3	3,9	5,3	4,6	<b>5,6</b>	3,5	4,2	4,6	5,5	4,7	2,8	3,6
		AB	AB		AB	A	AB	AB	AB				B
	Min.	2,0	1,0	3,5	1,0	2,0	0,1	1,7	1,0	4,5	2,0	1,0	1,0
	Max.	7,0	6,0	7,0	8,1	11,0	8,0	8,5	8,5	7,0	8,5	4,0	6,5
	Stand. dev.	1,9	1,4	2,5	2,3	2,7	2,3	1,8	2,2	1,0	2,9	1,5	1,6
Na (mg/L)	Sred. vr.	12,6	10,3	12,2	9,8	11,0	13,8	8,6	<b>18,7</b>	42,9	40,8	13,3	15,1
		AB	AB		AB	AB	AB	B	A				AB
	Min.	7,4	3,7	9,7	3,4	5,4	7,3	2,7	5,3	14,2	6,8	6,8	5,8
	Max.	19,7	49,1	14,8	20,4	55,3	27,9	15,6	90,5	86,8	196,5	26,6	70,4
	Stand. dev.	4,1	9,8	3,6	4,3	9,9	5,8	3,7	18,0	32,2	69,5	9,0	11,8
Pb (µg/L)	Sred. vr.	27,4	24,6	53,8	33,9	27,8	21,9	28,0	29,9	50,1	41,0	41,4	31,6
		A	A		A	A	A	A	A				A
	Min.	5,6	9,4	52,5	9,3	2,5	5,1	3,7	5,2	14,4	10,3	18,7	5,9
	Max.	67,7	49,2	55,0	61,6	54,5	59,0	64,5	67,0	84,0	67,0	53,7	111,0
	Stand. dev.	17,2	11,6	1,8	18,4	16,9	18,2	18,8	18,2	25,7	20,3	16,0	21,3
Rb (mg/L)	Sred. vr.	1,21	0,95	0,61	1,01	1,12	0,95	0,85	<b>1,31</b>	0,80	1,13	1,14	1,26
		AB	AB		AB	AB	AB	B	A				A
	Min.	0,65	0,43	0,41	0,56	0,48	0,55	0,37	0,77	0,43	0,85	0,97	0,62
	Max.	2,79	1,88	0,80	1,43	2,79	1,48	2,02	2,04	1,26	1,36	1,30	2,55
	Stand. dev.	0,67	0,31	0,27	0,25	0,51	0,32	0,39	0,32	0,30	0,17	0,18	0,39

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu (za ZOI sa  $n \geq 10$ ). Najviše srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.

**Tablica 16. (4. nastavak)** Omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi obzirom na ZOI.

Zona		B					CI		CII				
Mjerna veličina	Moslavina (n = 10)	Plešivica (n = 21)	Pokuplje (n = 2)	Prigorje- Bilogora (n = 20)	Zagorje- Medimurje (n = 25)	Hrvatsko Podunavlje (n = 13)	Slavonija (n = 29)	Hrvatska Istra (n = 24)	Hrvatsko primorje (n = 5)	Dalmatinska zagora (n = 7)	Sjeverna Dalmacija (n = 4)	Srednja i južna Dalmacija (n = 30)	
Sn ( $\mu\text{g/L}$ )	Sred. vr.	70,9	35,4	35,0	43,9	49,9	72,0	42,4	55,7	74,4	53,1	73,0	<u>75,7</u>
		ABC	D		BCD	BCD	AB	CD	ABCD				A
	Min.	30,0	2,0	34,0	2,5	2,0	31,0	2,0	20,0	35,0	24,0	36,0	36,0
	Max.	98,0	83,0	36,0	82,0	97,0	119,0	118,0	95,0	125,0	86,0	111,0	129,0
Stand. dev.	18,4	29,3	1,4	25,5	31,5	30,9	32,6	24,3	39,5	23,9	30,6	19,4	
Sr (mg/L)	Sred. vr.	0,52	0,48	0,36	0,43	0,46	0,46	0,44	0,43	0,29	0,58	0,30	0,51
		A	A		A	A	A	A	A				A
	Min.	0,22	0,10	0,28	0,14	0,25	0,35	0,23	0,24	0,22	0,25	0,27	0,20
	Max.	0,82	1,16	0,44	0,69	0,82	0,62	0,99	0,74	0,42	1,45	0,34	1,92
Stand. dev.	0,15	0,25	0,11	0,15	0,15	0,11	0,17	0,17	0,07	0,42	0,03	0,32	
V ( $\mu\text{g/L}$ )	Sred. vr.	86,1	76,5	80,0	76,5	83,3	<u>98,9</u>	81,2	81,8	79,2	81,8	80,0	91,4
		ABC	C		C	ABC	A	BC	BC				AB
	Min.	77,0	49,0	78,5	49,0	53,5	90,0	57,5	58,0	54,0	58,0	70,0	59,0
	Max.	100,0	118,5	81,5	98,0	132,0	125,0	103,0	133,0	98,0	117,0	92,0	128,0
Stand. dev.	7,2	16,9	2,1	12,9	17,2	9,8	15,6	19,0	16,2	19,9	9,1	18,1	
Zn (mg/L)	Sred. vr.	0,84	0,68	1,02	0,71	0,60	0,82	0,56	0,62	0,49	0,95	0,53	0,83
		A	A		A	A	A	A	A				A
	Min.	0,51	0,20	0,51	0,24	0,31	0,34	0,17	0,13	0,39	0,40	0,30	0,34
	Max.	1,40	1,58	1,52	1,98	1,71	1,57	0,92	1,19	0,65	1,59	0,69	2,84
Stand. dev.	0,25	0,31	0,71	0,39	0,32	0,34	0,18	0,26	0,10	0,49	0,18	0,55	

Rezultati su obrađeni ANOVA-om. Različita slova u istom retku označavaju statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti prema post hoc Tukey testu (za ZOI sa  $n \geq 10$ ). Najviše srednje vrijednosti mjernih veličina istaknute su crveno.



#### 4.4 Koeficijenti korelacije među rezultatima mjerenja koncentracija određivanih elemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika

Tablica 17. Pearsonovi koeficijenti korelacije među rezultatima mjerenja određivanih elemenata te izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .

	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Al	As	B	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Mo	Na	Pb	Rb	Sn	Sr	V	Zn	
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	1,00																								
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0,70	1,00																							
Al	0,17	0,03	1,00																						
As	0,03	-0,03	0,35	1,00																					
B	0,26	0,23	0,01	0,11	1,00																				
Ba	-0,12	-0,07	0,16	0,01	-0,19	1,00																			
Ca	-0,37	-0,22	-0,09	0,02	0,16	0,10	1,00																		
Cd	0,03	0,20	-0,06	-0,01	-0,02	-0,10	-0,03	1,00																	
Co	0,07	0,07	0,34	0,08	-0,01	0,24	-0,04	0,41	1,00																
Cr	0,15	0,09	0,20	-0,03	0,06	0,02	-0,06	0,07	0,46	1,00															
Cu	-0,01	-0,04	-0,02	-0,09	0,04	0,00	0,08	-0,07	0,01	0,05	1,00														
Fe	0,08	0,05	0,28	0,09	-0,19	0,14	-0,24	0,12	0,26	0,12	-0,02	1,00													
K	0,17	0,25	-0,01	0,17	0,46	0,09	0,05	0,08	0,01	0,04	-0,05	-0,05	1,00												
Li	-0,17	-0,22	0,23	-0,06	-0,25	0,38	0,07	-0,06	0,41	0,08	-0,03	0,09	-0,10	1,00											
Mg	0,08	0,16	0,08	-0,01	0,15	0,21	0,32	-0,02	0,05	-0,01	-0,04	-0,07	0,18	0,08	1,00										
Mn	-0,08	-0,11	0,16	0,00	-0,06	0,63	0,18	-0,05	0,36	0,14	-0,06	0,15	0,03	0,37	0,29	1,00									
Mo	-0,13	-0,12	0,12	0,02	-0,02	0,07	0,14	0,40	0,51	0,34	0,16	0,07	-0,01	0,11	0,05	0,16	1,00								
Na	0,22	0,10	0,53	0,07	0,04	0,02	0,01	-0,04	0,41	0,27	0,02	0,11	0,05	0,24	0,12	0,11	0,18	1,00							
Pb	0,15	0,17	0,30	0,06	-0,11	0,05	-0,22	0,59	0,59	0,30	-0,01	0,47	0,06	0,13	-0,04	0,03	0,43	0,19	1,00						
Rb	0,12	0,09	0,09	0,05	0,37	0,08	0,01	-0,17	-0,09	0,01	0,01	-0,04	0,23	0,00	0,06	-0,07	-0,11	0,06	-0,16	1,00					
Sn	0,21	0,21	0,12	-0,07	0,20	0,00	0,17	-0,21	-0,25	-0,16	0,00	-0,14	0,10	-0,11	0,50	0,05	-0,13	0,27	-0,20	0,13	1,00				
Sr	-0,06	0,04	0,25	0,13	0,07	0,25	0,31	-0,05	0,16	0,11	0,06	-0,04	0,12	0,19	0,42	0,17	0,16	0,33	0,03	0,09	0,24	1,00			
V	0,05	0,15	0,06	-0,03	0,16	0,23	0,37	0,03	0,08	0,02	-0,02	-0,08	0,23	0,07	0,97	0,28	0,08	0,11	-0,02	0,07	0,44	0,48	1,00		
Zn	0,09	0,05	0,12	0,08	0,07	0,04	0,26	-0,14	0,07	0,14	0,03	0,01	0,00	0,04	0,12	0,14	0,06	0,17	0,03	0,04	0,19	0,25	0,15	1,00	

Crvenom bojom označeni su statistički značajni koeficijenti korelacije ( $p < 0,05$ )

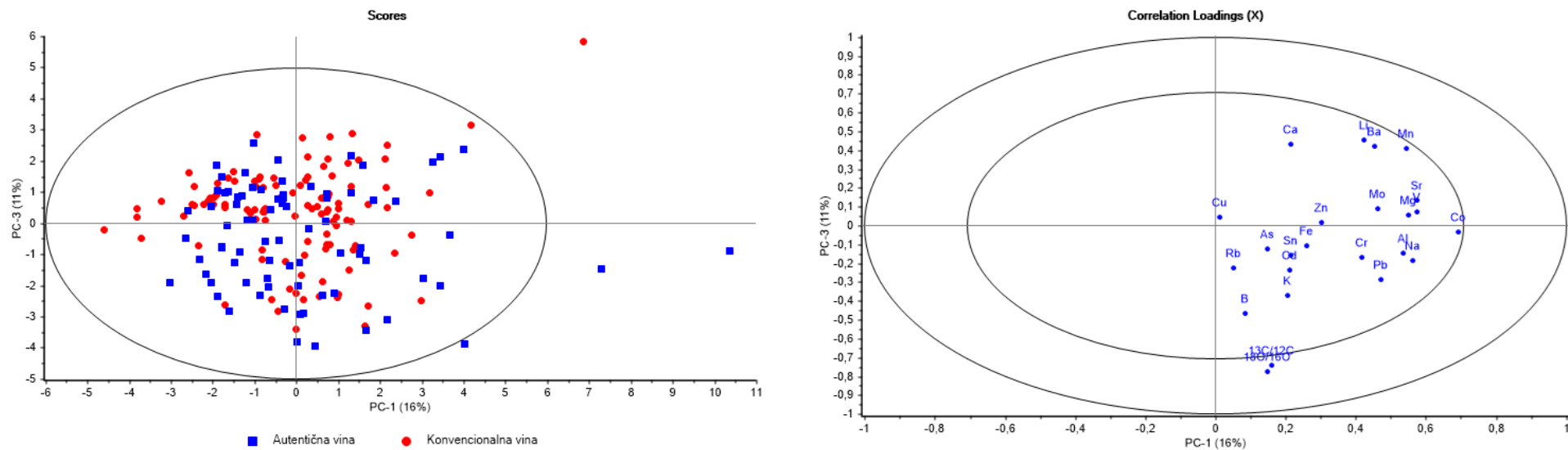
#### 4.5 Analiza glavnih komponenta (PCA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranje) hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te zaštićene oznake izvornosti (ZOI).

**Tablica 18.** Svojstveni vektori (SV) korelacijskog matriksa za sve uzorke (n=190) dobiveni analizom glavnih komponenta (PCA) za prvih 7 faktora (PC1-PC7 sa svojstvenim vrijednostima korelacijskog matriksa > 1), ukupna varijabilnost (UV, %) za sve uzorke i ukupna varijabilnost (VV, %) dobivena krosvalidacijom. Značajne varijable (*p*-vrijednosti < 0,05) su istaknute crveno.

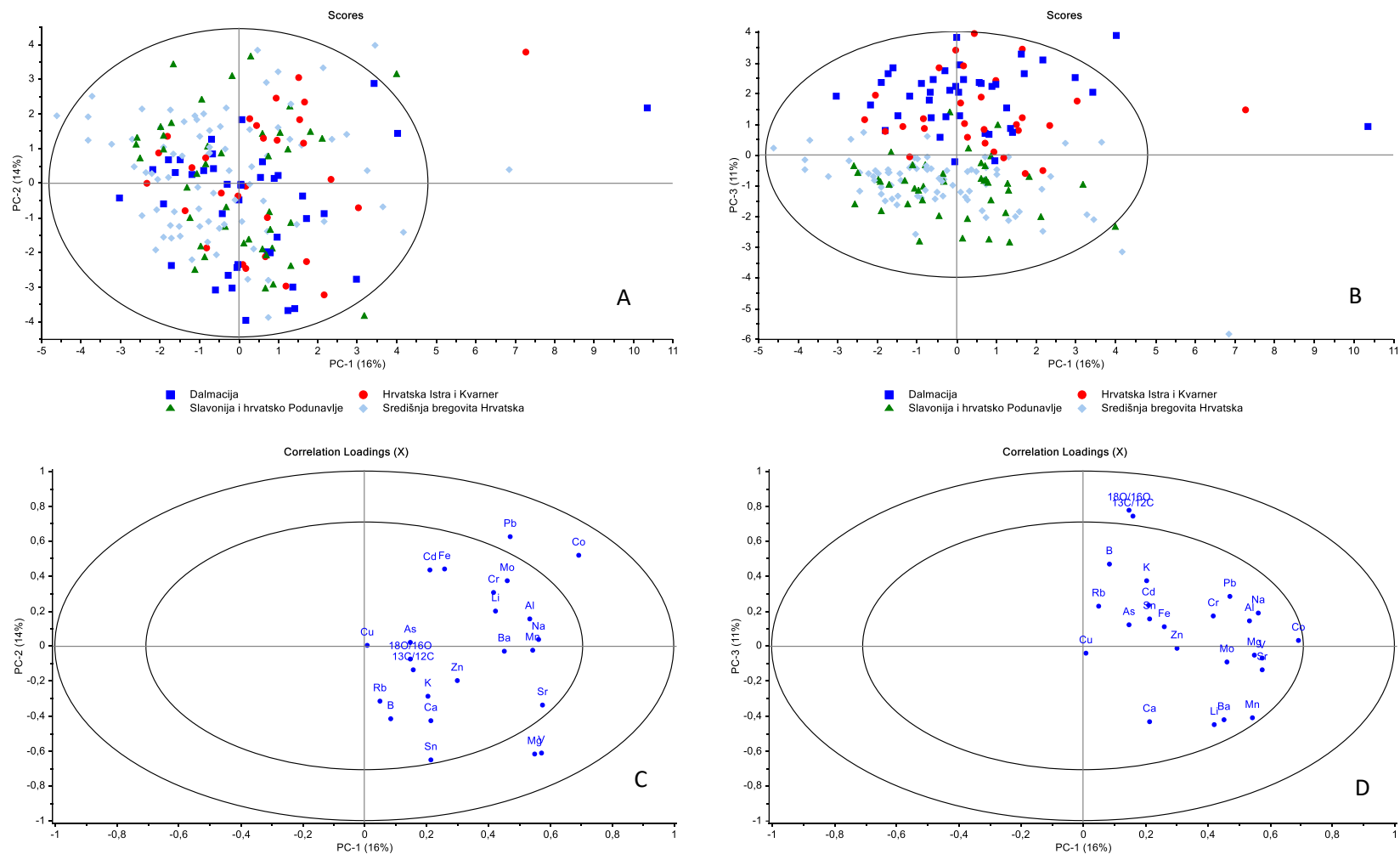
	PC1		PC2		PC3		PC4		PC5		PC6		PC7	
UV (%)	15,64		13,52		10,87		7,43		6,41		5,82		5,15	
VV (%)	7,90		10,19		7,61		3,59		1,62		3,09		4,63	
Mjerna veličina	EV	p	EV	p	EV	p	EV	p	EV	p	EV	p	EV	p
<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O	0,08	0,03	0,04	0,06	-0,48	0,00	-0,15	0,00	0,20	0,00	0,09	0,23	-0,18	0,06
<sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C	0,08	0,04	0,08	0,01	-0,46	0,00	0,04	0,44	0,27	0,00	0,06	0,46	-0,12	0,22
Al	0,28	0,00	-0,09	0,01	-0,09	0,02	-0,40	0,00	-0,14	0,11	0,07	0,44	0,26	0,08
As	0,08	0,09	-0,01	0,71	-0,08	0,02	-0,18	0,02	-0,26	0,00	-0,26	0,02	0,58	0,00
B	0,04	0,03	0,23	0,00	-0,29	0,00	0,10	0,00	-0,31	0,00	-0,31	0,00	-0,12	0,05
Ba	0,23	0,00	0,02	0,54	0,26	0,00	-0,15	0,06	0,28	0,00	-0,33	0,00	-0,17	0,04
Ca	0,11	0,01	0,24	0,00	0,27	0,00	0,24	0,00	-0,28	0,00	0,02	0,82	0,07	0,38
Cd	0,11	0,00	-0,24	0,00	-0,15	0,00	0,48	0,00	0,09	0,06	-0,04	0,42	0,18	0,01
Co	0,36	0,00	-0,29	0,00	-0,02	0,62	0,08	0,12	-0,05	0,21	-0,07	0,32	-0,12	0,26
Cr	0,22	0,00	-0,17	0,00	-0,10	0,29	0,02	0,82	-0,21	0,01	0,05	0,68	-0,35	0,06
Cu	0,01	0,92	0,00	0,98	0,03	0,65	0,07	0,64	-0,25	0,31	0,19	0,25	-0,36	0,40
Fe	0,13	0,05	-0,25	0,00	-0,07	0,30	-0,17	0,17	0,21	0,12	-0,03	0,86	0,18	0,49
K	0,11	0,01	0,16	0,00	-0,23	0,00	0,12	0,09	-0,07	0,21	-0,49	0,00	0,02	0,80
Li	0,22	0,00	-0,11	0,00	0,28	0,00	-0,20	0,03	0,08	0,42	-0,07	0,67	-0,15	0,23
Mg	0,28	0,00	0,34	0,00	0,03	0,13	0,19	0,00	0,24	0,00	0,09	0,04	0,11	0,16
Mn	0,28	0,00	0,01	0,49	0,25	0,00	-0,09	0,15	0,23	0,02	-0,23	0,08	-0,19	0,07
Mo	0,24	0,00	-0,21	0,00	0,06	0,15	0,33	0,00	-0,26	0,00	0,06	0,23	-0,07	0,45
Na	0,29	0,03	-0,02	0,59	-0,11	0,04	-0,27	0,12	-0,20	0,30	0,28	0,22	-0,02	0,88
Pb	0,24	0,00	-0,34	0,00	-0,18	0,00	0,17	0,00	0,08	0,11	0,03	0,64	0,14	0,17
Rb	0,03	0,53	0,18	0,00	-0,14	0,01	-0,19	0,04	-0,19	0,10	-0,36	0,01	-0,22	0,14
Sn	0,11	0,01	0,36	0,00	-0,10	0,02	-0,08	0,14	0,10	0,19	0,30	0,00	0,06	0,52
Sr	0,30	0,00	0,19	0,00	0,09	0,18	-0,01	0,92	-0,15	0,14	0,10	0,27	0,12	0,23
V	0,30	0,00	0,34	0,00	0,04	0,04	0,23	0,00	0,20	0,00	0,06	0,16	0,09	0,19
Zn	0,16	0,08	0,11	0,05	0,01	0,86	-0,11	0,47	-0,22	0,36	0,22	0,32	-0,03	0,92

**Tablica 19.** PC1 – PC8 sa svojstvenim vrijednostima korelacijskog matriksa  $> 1$ , ukupnom varijancom, kumulativnim svojstvenim vrijednostima i kumulativnom varijancom za autentične uzorke ( $n = 78$ ), konvencionalne uzorke ( $n = 112$ ) i za sve uzorke ukupno ( $n = 190$ ).

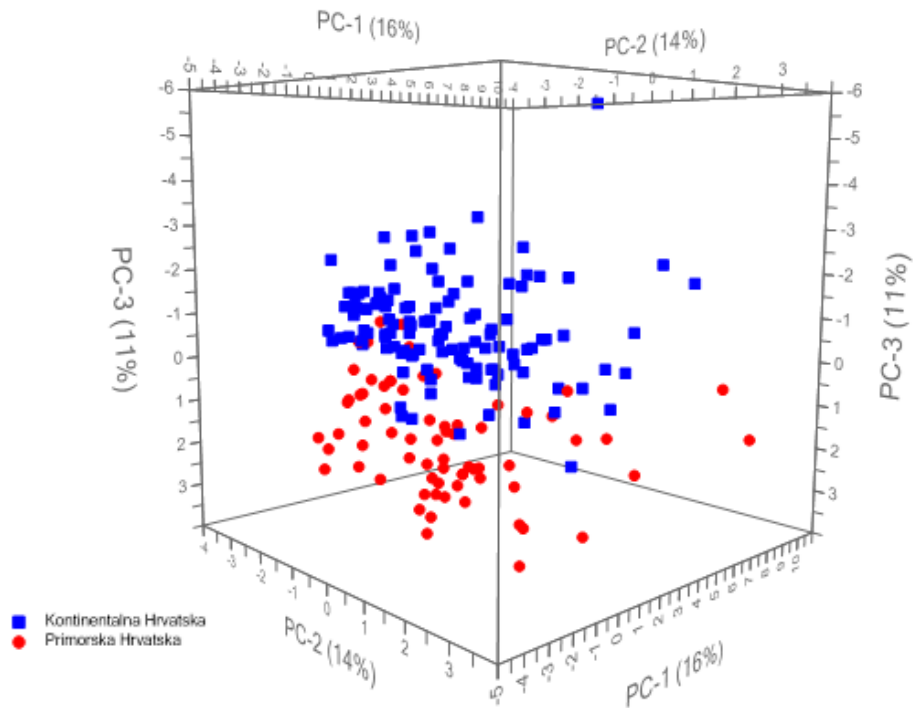
	Svojstvena vrijednost	Ukupna varijanca %	Kumulativna svojstvena vrijednost	Kumulativna varijanca %
<b>Autentični uzorci, n = 78</b>				
PC1	5,45	22,69	5,45	22,69
PC2	3,37	14,02	8,81	36,72
PC3	2,54	10,58	11,35	47,30
PC4	1,82	7,57	13,17	54,87
PC5	1,52	6,34	14,69	61,20
PC6	1,41	5,86	16,10	67,07
PC7	1,14	4,76	17,24	71,82
PC8	1,02	4,25	18,26	76,07
<b>Konvencionalni uzorci, n = 112</b>				
PC1	4,19	17,46	4,19	17,46
PC2	3,31	13,78	7,50	31,25
PC3	2,50	10,41	10,00	41,66
PC4	1,86	7,74	11,86	49,40
PC5	1,56	6,50	13,42	55,90
PC6	1,30	5,40	14,71	61,30
PC7	1,21	5,03	15,92	66,33
PC8	1,07	4,47	16,99	70,80
<b>Svi uzorci, n = 190</b>				
PC1	3,75	15,64	3,75	15,64
PC2	3,24	13,52	7,00	29,16
PC3	2,61	10,87	9,61	40,03
PC4	1,78	7,43	11,39	47,46
PC5	1,54	6,41	12,93	53,87
PC6	1,40	5,82	14,33	59,69
PC7	1,24	5,15	15,56	64,85



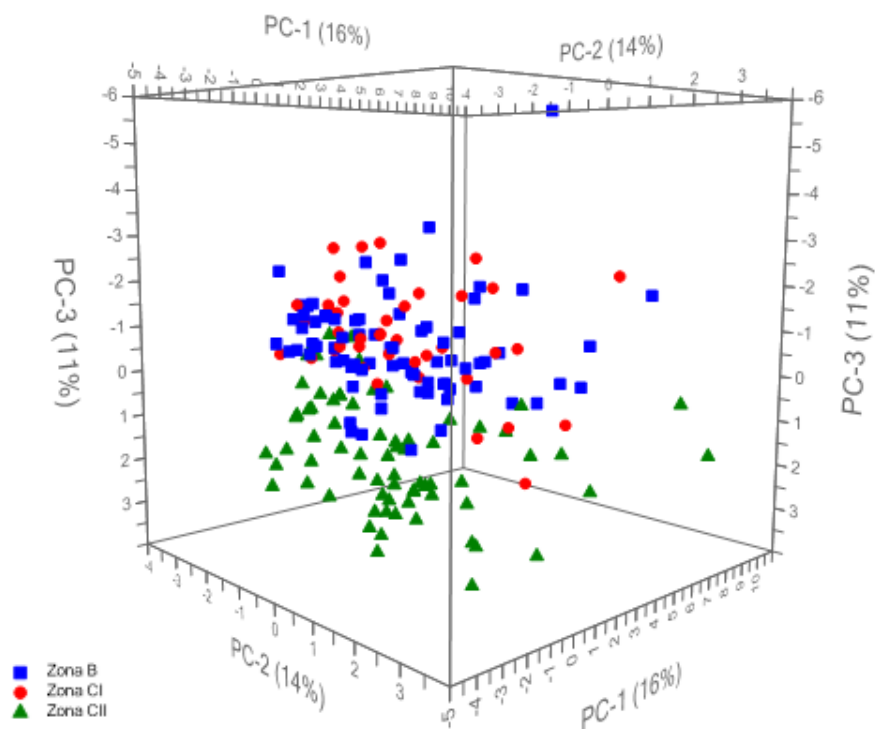
**Slika 6.** Analiza glavnih komponentata (PCA): projekcija uzoraka (A) i varijabli (B - omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije 22 elementa) na faktorske ravnine PC1xPC3, razlikovanih obzirom na način proizvodnje vina (autentična i konvencionalna vina).



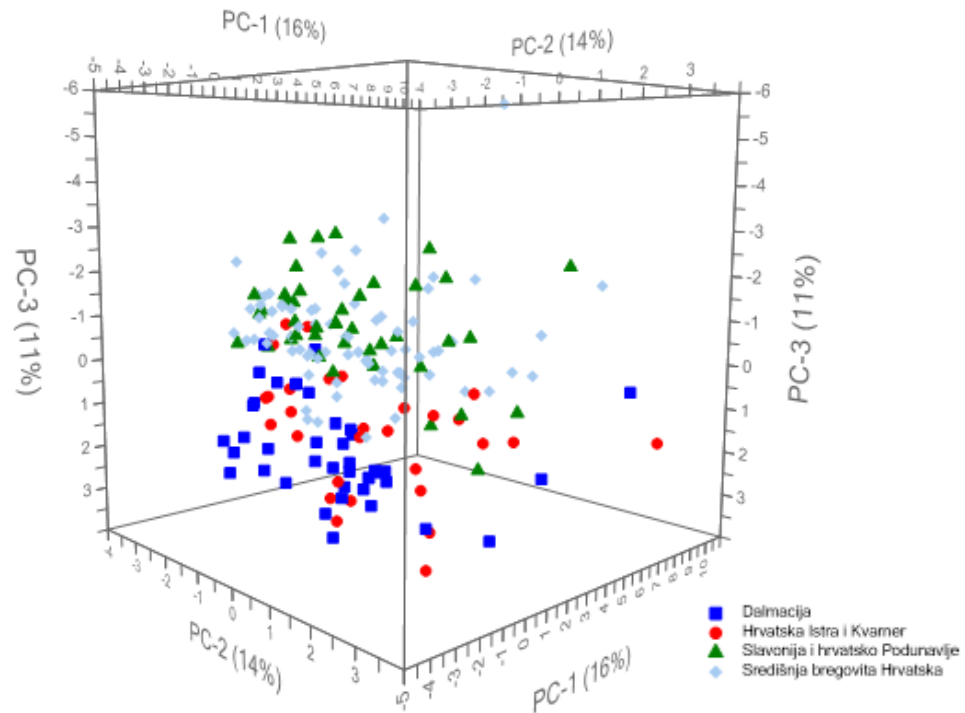
**Slika 7.** Analiza glavnih komponenta (PCA): projekcija uzoraka i varijabli (omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije 22 elementa) na faktorske ravnine PC1xPC2 (A – uzorci, C – varijable) i PC1xPC3 (B - uzorci, D - varijable).



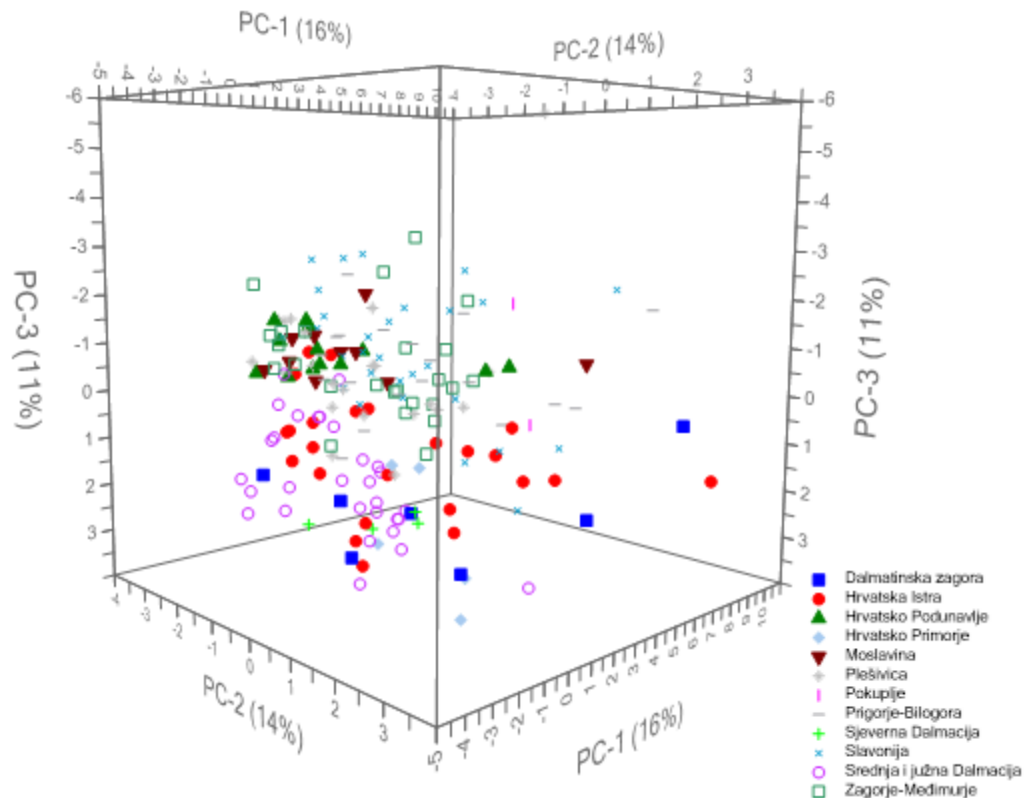
**Slika 8.** Analiza glavnih komponenta (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3, razlikovanih obzirom na zemljopisna područja: kontinentalna i primorska Hrvatska.



**Slika 9.** Analiza glavnih komponenta (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3 razlikovanih s obzirom na vinogradarske zone B, CI i CII.



**Slika 10.** Analiza glavnih komponenta (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3, razlikovanih s obzirom na vinogradarske regije uzgoja.



**Slika 11.** Analiza glavnih komponenta (PCA): projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1xPC2xPC3, razlikovanih s obzirom na ZOI.

#### 4.6 Opća diskriminantna analiza (GDA) za razlikovanje hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te ZOI.

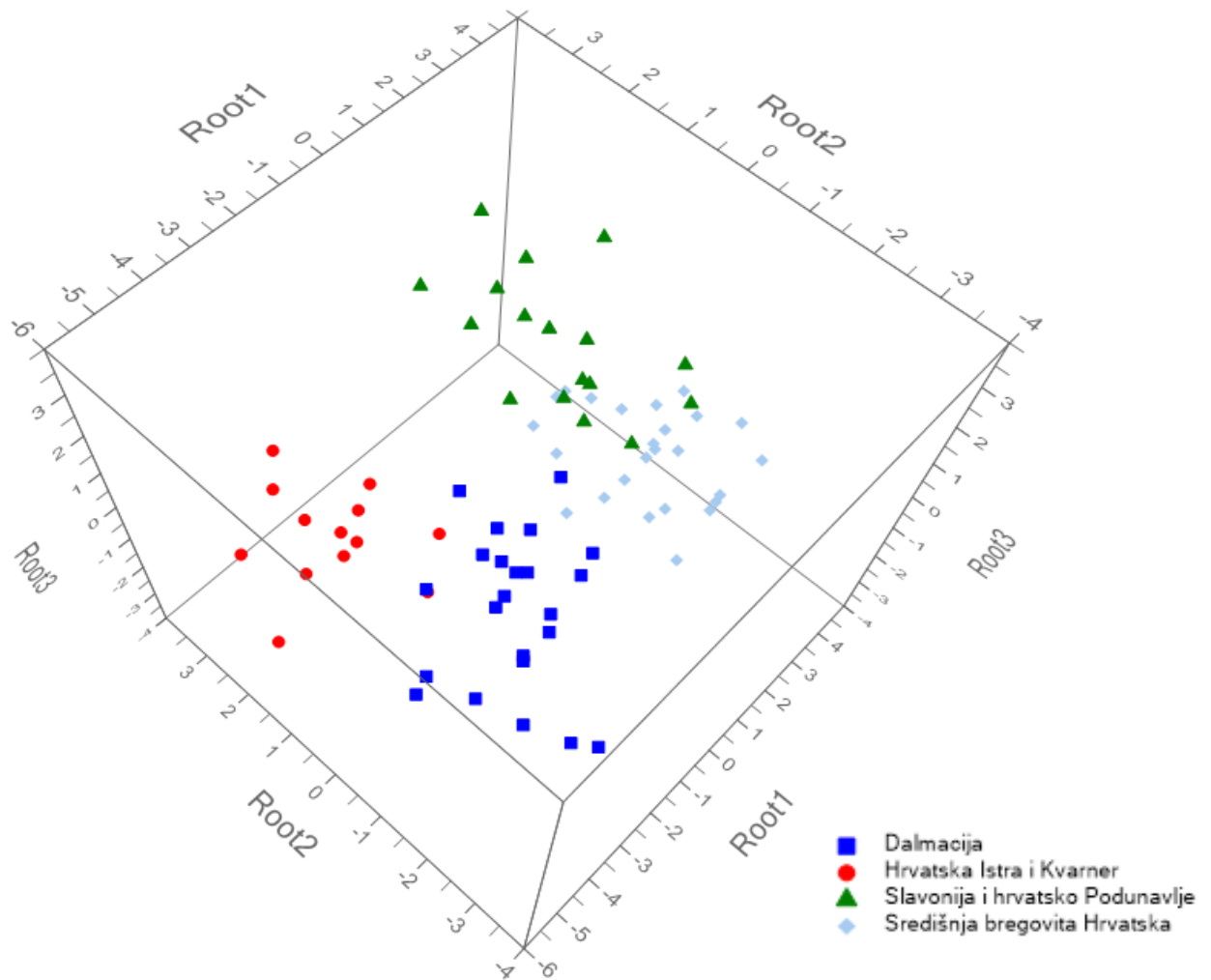
**Tablica 20.** Multivarijatni test značajnosti (Wilksov lambda test, crveno su označeni rezultati s  $p < 0,05$ ) efekata/utjecaja koncentracija određenih elemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika na zemljopisno podrijetlo (zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te ZOI).

Efekti	Područje			Zona			Regija			ZOI		
	Wilksova $\lambda$	F	p	Wilksova $\lambda$	F	p	Wilksova $\lambda$	F	p	Wilksova $\lambda$	F	p
sjecište	0,988	2,008	0,158	0,972	2,329	0,101	0,960	0,715	0,547	0,870	0,835	0,536
<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O	<b>0,594</b>	<b>112,702</b>	<b>0,000</b>	<b>0,573</b>	<b>61,108</b>	<b>0,000</b>	<b>0,571</b>	<b>12,795</b>	<b>0,000</b>	<b>0,549</b>	<b>4,599</b>	<b>0,003</b>
<sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C	<b>0,976</b>	<b>4,087</b>	<b>0,045</b>	0,973	2,290	0,104	0,961	0,683	0,566	0,929	0,425	0,827
Al	0,992	1,326	0,251	0,989	0,913	0,403	0,936	1,172	0,330	0,874	0,804	0,556
As	0,999	0,124	0,725	0,998	0,186	0,830	0,967	0,582	0,629	0,884	0,738	0,601
B	0,994	0,925	0,338	0,993	0,592	0,555	0,980	0,339	0,797	0,753	1,842	0,137
Ba	0,999	0,152	0,697	0,997	0,221	0,802	0,884	2,235	0,095	0,796	1,431	0,244
Ca	1,000	0,068	0,794	0,984	1,367	0,258	0,929	1,301	0,284	0,875	0,799	0,560
Cd	1,000	0,008	0,927	0,992	0,658	0,519	0,929	1,304	0,283	0,921	0,481	0,787
Co	<b>0,924</b>	<b>13,493</b>	<b>0,000</b>	<b>0,895</b>	<b>9,619</b>	<b>0,000</b>	0,866	2,634	0,060	0,796	1,439	0,241
Cr	0,994	1,016	0,315	0,985	1,253	0,288	<b>0,848</b>	<b>3,045</b>	<b>0,037</b>	0,699	2,407	0,062
Cu	0,997	0,506	0,478	0,996	0,313	0,732	<b>0,823</b>	<b>3,658</b>	<b>0,018</b>	0,849	1,000	0,436
Fe	1,000	0,034	0,854	0,998	0,175	0,840	<b>0,820</b>	<b>3,732</b>	<b>0,017</b>	0,833	1,124	0,370
K	<b>0,947</b>	<b>9,268</b>	<b>0,003</b>	<b>0,945</b>	<b>4,816</b>	<b>0,009</b>	<b>0,856</b>	<b>2,866</b>	<b>0,046</b>	0,777	1,607	0,191
Li	<b>0,960</b>	<b>6,939</b>	<b>0,009</b>	<b>0,928</b>	<b>6,379</b>	<b>0,002</b>	0,950	0,898	0,449	0,801	1,395	0,256
Mg	0,999	0,240	0,625	0,995	0,395	0,674	0,982	0,308	0,820	0,806	1,344	0,275
Mn	0,985	2,523	0,114	0,975	2,116	0,124	0,893	2,037	0,120	0,848	1,002	0,435
Mo	0,999	0,163	0,687	0,998	0,168	0,845	0,949	0,919	0,439	0,801	1,388	0,259
Na	1,000	0,031	0,861	1,000	0,017	0,983	0,887	2,173	0,103	0,727	2,107	0,094
Pb	0,998	0,319	0,573	0,990	0,824	0,441	0,875	2,434	0,076	0,735	2,023	0,106
Rb	<b>0,945</b>	<b>9,520</b>	<b>0,002</b>	<b>0,917</b>	<b>7,449</b>	<b>0,001</b>	0,952	0,853	0,471	0,815	1,268	0,305
Sn	<b>0,951</b>	<b>8,489</b>	<b>0,004</b>	<b>0,949</b>	<b>4,403</b>	<b>0,014</b>	<b>0,741</b>	<b>5,931</b>	<b>0,002</b>	<b>0,593</b>	<b>3,847</b>	<b>0,009</b>
Sr	0,999	0,138	0,711	0,996	0,324	0,724	0,937	1,137	0,343	0,854	0,958	0,460
V	1,000	0,066	0,797	1,000	0,037	0,963	0,973	0,472	0,703	0,833	1,121	0,372
Zn	0,998	0,250	0,618	0,997	0,220	0,803	0,893	2,031	0,121	0,785	1,534	0,211

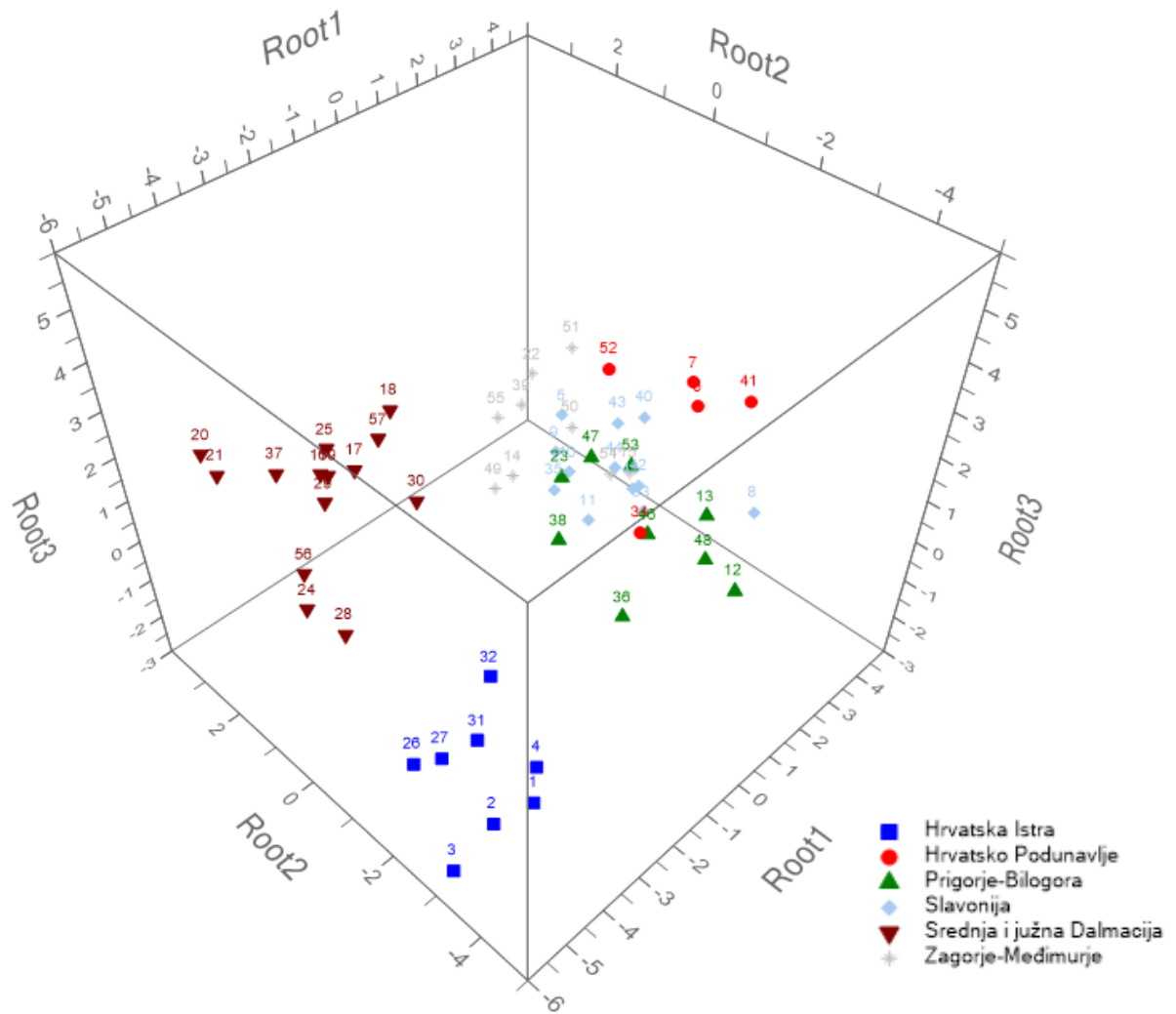


**Tablica 21.** Klasifikacijska matrica dobivena GDA-om s udjelom ispravno klasificiranih uzoraka (%) obzirom na zemljopisno podrijetlo (područja, zone, regije i ZOI).

	Sva vina	Autentična vina	Konvencionalna vina (krosvalidacija)
<b>Područje</b>	<b>n = 190</b>	<b>n = 78</b>	<b>n = 112</b>
Kontinentalna Hrvatska, n = 120	97.5	100.0	87.2
Primorska Hrvatska, n = 70	98.6	100.0	79.4
<b>Ukupno</b>	<b>97.9</b>	<b>100.0</b>	<b>84.8</b>
<b>Zona</b>	<b>n = 190</b>	<b>n = 78</b>	<b>n = 112</b>
B, n = 78	91.0	96.0	67.9
CI, n = 42	54.8	82.4	44.0
CII, n = 70	100.0	100.0	79.4
<b>Ukupno</b>	<b>86.3</b>	<b>94.9</b>	<b>66.1</b>
<b>Regija</b>	<b>n = 190</b>	<b>n = 78</b>	<b>n = 112</b>
Središnja bregovita Hrvatska, n = 78	71,8	96,0	60,4
Slavonija i hrvatsko Podunavlje, n = 42	61,9	82,4	48,0
Hrvatska Istra i Kvarner, n = 29	62,1	92,3	37,5
Dalmacija, n = 41	80,5	100,0	55,6
<b>Ukupno</b>	<b>70,0</b>	<b>93,6</b>	<b>53,6</b>
<b>ZOI</b>	<b>n = 141</b>	<b>n = 57</b>	<b>n = 84</b>
Prigorje-Bilogora, n = 20	70,0	88,9	54,5
Zagorje-Međimurje, n = 25	44,0	88,9	18,8
Slavonija, n = 29	44,8	83,3	17,6
Hrvatsko Podunavlje, n = 13	84,6	100,0	75,0
Hrvatska Istra, n = 24	58,3	100,0	37,5
Srednja i južna Dalmacija, n = 30	63,3	100,0	31,3
<b>Ukupno</b>	<b>58,2</b>	<b>93,0</b>	<b>34,5</b>



**Slika 12.** Projekcija uzoraka ( $n = 190$ ) razlikovanih obzirom na regiju u ravninama definiranim standardiziranim kanoničkim funkcijama Root 1, Root 2 i Root 3.  
 Kontinentalno područje =  
 zona B (Središnja bregovita Hrvatska) + zona CI (Slavonija i Hrvatsko Podunavlje)  
 Primorsko područje = zona CII (Hrvatska Istra i Kvarner + Dalmacija).



**Slika 13.** Projekcija uzoraka ( $n = 141$ ) razlikovanih obzirom na ZOI u ravninama definiranim standardiziranim kanoničkim funkcijama Root 1, Root 2 i Root 3.

ZOI zone B: Prigorje-Bilogora, Zagorje-Međimurje

ZOI zone CI: Slavonija, Hrvatsko Podunavlje

ZOI zone CII: Hrvatska Istra, Srednja i južna Dalmacija

## **5. RASPRAVA**

U ovom istraživanju ispitivane su 24 mjerne veličine: koncentracije 22 elementa ICP-OES tehnikom te omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika IRMS tehnikom u 190 uzoraka hrvatskih vina. Brojna su znanstvena istraživanja pokazala da poznavanje udjela makro- i mikroelemenata te omjera stabilnih izotopa može poslužiti kao osnova za utvrđivanje zemljopisnoga podrijetla vina, odnosno uspostavljanje „otiska prsta“ kojim se stvara veza između vina i njihovog zemljopisnoga podrijetla. Osim sorte grožđa, godine berbe i općenito kvalitete, zemljopisno podrijetlo predstavlja izuzetno bitnu značajku autentičnosti vina, stoga je dokazivanje autentičnosti neophodno temeljiti na parametrima specifičnim za podrijetlo vina koji ne prolaze promjene tijekom vinifikacije ili ih je teško krivotvoriti. Parametri koji zadovoljavaju ove kriterije svakako su makro- i mikroelementi te stabilni izotopi. Ovim su istraživanjem po prvi puta zajedničkom primjenom metoda atomske spektrometrije ICP-OES i IRMS prikupljeni podaci koji mogu poslužiti kao temelj za utvrđivanje autentičnosti zemljopisnoga podrijetla hrvatskih vina.

Dobiveni su rezultati grupirani obzirom na godinu berbe, način proizvodnje i zemljopisno podrijetlo. Zemljopisno je podrijetlo razmatrano kroz četiri razine, od najšire podjele prema najužoj: 1.) zemljopisna područja, 2.) vinogradarske zone i 3.) regije te 4.) zaštićene oznake izvornosti. Navedeni parametri obrađeni su dvjema multivarijantnim statističkim analizama, PCA i GDA, kako bi se utvrdila mogućnost klasifikacije hrvatskih vina s obzirom na zemljopisno podrijetlo kroz sve četiri razine.

## **5.1 Validacija primijenjenih analitičkih metoda**

Validacija ili vrednovanje metode jest postupak utvrđivanja, odnosno potvrđivanja, da je metoda prikladna za korištenje u određenu svrhu, to jest validacijom potvrđujemo kako će metoda dati točne rezultate. Prvi korak pri implementaciji određene metode u laboratoriju, koji je potrebno provesti prije njene primjene i prihvaćanja njome dobivenih rezultata, jest upravo validacija metode (Eurachem, 2014).

U Tablici 6. prikazani su rezultati validacije metode za određivanje 22 elementa ICP-OES metodom, i to primjenom sljedećih parametara: linearnost, kalibracijski raspon, granice

detekcije i kvantifikacije, ponovljivost, intermedijarna preciznost i točnost. Kalibracijski je raspon definiran za svaki pojedini element: 0,5-10,0  $\mu\text{g/L}$  za Co, Cr i Mo; 1-20  $\mu\text{g/L}$  za Cd i Li; 15-300  $\mu\text{g/L}$  za As i Pb; 5-100  $\mu\text{g/L}$  za V; 0,05-1,00  $\text{mg/L}$  za Ba, Cu, Sn i Sr; 0,1-2,0  $\text{mg/L}$  za Al; 0,25- 5,00  $\text{mg/L}$  za B, Mn, Rb, i Zn; 0,5-10,0  $\text{mg/L}$  za Fe; te za makroelemente Na (1,0-20,0  $\text{mg/L}$ ), Mg i Ca (5,0-100,0  $\text{mg/L}$ ) i K (100-2000  $\text{mg/L}$ ).

Metoda je pokazala linearan odnos između koncentracija pripremljenih kalibracijskih otopina i dobivenog intenziteta signala instrumenta i u području  $\mu\text{g/L}$  i  $\text{mg/L}$ . Linearnost je izražena koeficijentom korelacije ( $r$ ), koji je iznosio od 0,991 za molibden, pa do 1,000 za cink (u prosjeku 0,997).

Granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) za svaki pojedini element izračunate su iz standardnog odstupanja ( $\sigma$ ) deset mjerenja slijepe probe i koeficijenta smjera (nagiba) pravca  $a$  ( $\text{GD} = 3 \times \sigma / a$ ;  $\text{GK} = 10 \times \sigma / a$ ). Najniže granice detekcije i kvantifikacije dobivene su za elemente Li i Sr ( $\text{GD} = 0,004 \mu\text{g/L}$ ,  $\text{GK} = 0,014 \mu\text{g/L}$ ).

Postignuta je izvrsna ponovljivost mjerenja, a dobivena je višekratnim mjerenjem kontrolne otopine u uvjetima ponovljivosti u koncentraciji jednakoj srednjoj kalibracijskoj točki. Ponovljivost je izražena kao relativno standardno odstupanje (RSD, %) te je iznosila prosječno 1,2 %, odnosno od 0,1 % za željezo, do 6,5 % za molibden. Intermedijarna preciznost i točnost dobivene su mjerenjem iste kontrolne otopine, ali kroz dulje razdoblje. Intermedijarna preciznost je izražena kao relativno standardno odstupanje (RDS, %), a iznosila je od 2,2 % za kadmij, do 16,7 % za molibden, odnosno u prosjeku 4,5 %. Točnost, odnosno razlika između izmjerene i prihvaćene referentne vrijednosti (koncentracija kontrolne otopine) je to veća što je ta razlika manja. U Tablici 6. je točnost prikazana kao postotak podudaranja s koncentracijom kontrolne otopine, a iznosila je od 93,1 % do 107,5 % (u prosjeku 100,2 %).

Rezultati validacije pripreme uzorka za određivanje omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  pomoću ADCS automatiziranog sustava za destilacije izraženi su kroz ponovljivost određivanja vode u destilatu (RSD = 0,3 %), ponovljivost određivanja alkoholne jakosti destilata (RSD = 0,2 %) i ponovljivosti iskorištenja destilacije uzorka (RSD = 0,4 %), Tablica 7.

Ostatak vina koji je preostao nakon destilacije, odnosno uzorak kojem je odstranjen etanol koji onemogućava gorenje plazme kod ICP-OES tehnike, poslužio je za određivanje 22 odabrana elementa. Validacija pripreme uzorka je objavljena u radu Miloš i suradnika (2018).

U Tablici 8. prikazani su rezultati validacije IRMS mjerenja omjera stabilnih izotopa  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Provedena je pomoću parametara linearnosti, ponovljivosti, intermedijarne preciznosti i točnosti. Linearnost je dobivena mjerenjem certificiranih referentnih materijala i referentnih materijala s referentnim vrijednostima za omjere mjerenih stabilnih izotopa, pa je tako za  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  koeficijent korelacije ( $r$ ) iznosio 0,9999, a za  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  0,9989. Za oba para izotopa određena je ponovljivost i intermedijarna preciznost, a izražene su kao relativno standardno odstupanje od referentne vrijednosti (RSD, %). Dobivene su vrijednosti 2,5 % i 5,5 % za  $\delta^{18}\text{O}$  te 0,3 % i 0,4 % za  $\delta^{13}\text{C}$ . Također su obje metode pokazale visoku točnost, 98,2 % za  $\delta^{18}\text{O}$  i 100,0 % za  $\delta^{13}\text{C}$ .

Na osnovu provedenih validacijskih eksperimenata i dobivenih rezultata, zaključeno je da su sve korištene metode pogodne za namijenjenu svrhu (Magnusson, 2014), a to je određivanje odabranih elemenata (Miloš i sur., 2018) te izotopnih omjera kisika (OIV-MA-AS2-12, OIV, 2021b) i ugljika u uzorcima vina (OIV-MA-AS312-06, OIV, 2021b).

## **5.2 Koncentracije određivanih elemenata te omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika**

U Tablici 9. prikazana je srednja vrijednost, raspon (minimum – maksimum), varijanca, standardna devijacija i koeficijent varijacije svih mjerenih parametara u uzorcima vina iz dvije godine berbe. U svrhu statističke obrade, za vrijednosti koje su bile ispod granice detekcije (GD), uzete su vrijednosti GD/2 (EPA, 2006).

### **5.2.1 Omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika**

Omjeri stabilnih izotopa kisika ( $\delta^{18}\text{O}$ ) iz molekula vode ispitivanih uzoraka vina izmjereni su u rasponu od -7,28 do 7,79 ‰ VSMOW, sa srednjom vrijednosti 1,37 ‰ VSMOW, (Tablica 9) što za većinu uzoraka ulazi u raspone koji su, prema Christophu i suradnicima (2015), karakteristični za vina iz područja središnje Europe (od - 4 do + 3 ‰ VSMOW), odnosno za područje juga Europe (-1 do + 6 ‰ VSMOW). Magdas i suradnici (2012) su primjerice u vinima rumunjskih vinogorja izmjerili vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  u rasponu od - 2,60 do + 3,28 ‰ VSMOW. Za austrijska vina su omjeri izotopa kisika iznosili od -4,40 do + 2,30 ‰ VSMOW (Philipp i sur., 2018).

Dozrijevanjem grožđa se voda u bobici obogaćuje težim kisikovim izotopom ( $^{18}\text{O}$ ) i do vrijednosti viših od + 10 ‰ VSMOW, tako da su u vinima bogatijim težim izotopom kisika vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  pozitivnije, a u vinima u kojima je više lakšeg izotopa kisika ( $^{16}\text{O}$ ) su te vrijednosti negativnije. Također se s pomicanjem datuma berbe unutar jedne godine vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  mijenjaju ovisno o klimatskim posebnostima promatrane godine. Temeljem 25 godina iskustva u primjeni EU banke podataka definirane su vrijednosti omjera stabilnih izotopa kisika koje prirodno bobica grožđa ne može premašiti (Christoph i sur., 2015). Tako se kod vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  niže od -5,00 ‰ VSMOW, može posumnjati da se radi o vodi prirodnog podrijetla iz bobice grožđa, iako su i takve vrijednosti moguće kod vrlo kasnih datuma berbi ili čak kod grožđa ubranog u smrznutom stanju (Hermann, 2014).  $\delta^{18}\text{O}$  ispod -5,00 ‰ VSMOW su u ovome istraživanju izmjerene u dva konvencionalno proizvedena uzorka iz ZOI Zagorje-Međimurje: jednom crnom (Cabernet Sauvignon) i jednom bijelom vinu (Graševina), prikupljenim od dva proizvođača.

Razina obogaćivanja može se razlikovati od godine do godine, ali i između regija, i uglavnom je pod utjecajem izotopskog sadržaja vlage zraka i klimatskih uvjeta određenog zemljopisnoga područja. U svakom slučaju vrijednost  $\delta^{18}\text{O}$  vode vina može se koristiti kao parametar za dokazivanje dodavanja vode ili kao obilježivač za zemljopisno podrijetlo i godinu berbe. Naravno, moraju biti dostupni podaci odgovarajućeg broja reprezentativnih referentnih uzoraka (npr. iz EU izotopne banke podataka). Posebnosti pojedine godine berbe, poput izvanrednih meteoroloških uvjeta tijekom dozrijevanja i berbe mogu pomoći u razumijevanju dobivenih vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  i tumačenju eventualnih odstupanja od očekivanih  $\delta^{18}\text{O}$  vrijednosti za vina s određenog zemljopisnoga područja (Christoph i sur., 2015; Christoph i sur., 2006; Christoph i sur., 2004; Christoph i sur., 2003).

Omjeri stabilnih izotopa ugljika ( $\delta^{13}\text{C}$ ) iz molekule etanola ispitivanih uzoraka su u ovome istraživanju izmjereni u rasponu od -30,28 do -23,55 ‰ V-PDB, sa srednjom vrijednosti -27,57 ‰ V-PDB (Tablica 9), što se uklapa u vrijednosti za vina srednje (od -30,00 do -27,00 ‰ V-PDB) i južne (od -27,00 do -24,00 ‰ V-PDB) Europe (Christoph i sur., 2015). U istraživanjima rumunjskih vina (Magdas i sur, 2012) dobivene su slične vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$ , od -28,41 do -24,57 ‰ V-PDB, a također i u austrijskim vinima, u kojima su te vrijednosti varirale između -29,3 i -25,3 ‰ V-PDB (Philipp i sur, 2018).

Christoph i suradnici su (2015) također definirali i vrijednosti omjera stabilnih izotopa ugljika koje se prirodno mogu proizvesti u bobicama grožđa, a ne bi smjele biti iznad -22,00 ‰ V-PDB. U tome bi se slučaju moglo posumnjati da se radi o dodatku šećera šećerne repe ili šećerne trske te bi se za dokazivanje takvog potvorenja trebalo provesti još i određivanje omjera



(D/H)<sub>I</sub>. Međutim, značajan nedostatak vode u vrijeme dozrijevanja također može uzrokovati i tako visoke vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  (Christoph i sur., 2006).

Mnoga su istraživanja pokazala utjecaj zemljopisnogaa podrijetla na omjere stabilnih izotopa kisika u vodi vina te ugljika u etanolu vina, na osnovu kojih se može zaključiti da su njihovi omjeri u vinima to obogaćeniji težim izotopom što je klima toplija i suša (Philipp i sur, 2018; Kolesnov i sur., 2017; Camin i sur., 2015; Magdas i sur, 2012; Aghemo i sur., 2011; Christoph i sur., 2004; Christoph i sur., 2003). U ovome su istraživanju dobiveni rezultati koji potkrepljuju ovaj zaključak, što će nadalje biti podrobnije objašnjeno.

### 5.2.2 Koncentracije makroelemenata

Makroelementi K, Ca, Mg i Na su u vinu najzastupljeniji. K je prevladavajući element u soku grožđa (Fabani i sur., 2010), ali na njegovu koncentraciju, zajedno s Ca, utječe taloženje vina tijekom stabilizacije i odležavanja stvaranjem kristala kalijevog bitartarata i kalcijevog tartarata. Dodatne se količine K u sastav vina mogu uvesti upotrebom kalijevog bisulfita ili kalijevog metabisulfita tijekom proizvodnje vina (Lara i sur., 2005). Poznavanjem udjela kalija, tartarata, etanola i pH vrijednosti, moguće je predvidjeti potencijalnu stabilnost ili nestabilnost kalijevog tartarata u vinu. Udio kalija u vinu smanjuje se tijekom fermentacije i odležavanjem, uglavnom zbog taloženja kalij tartarata (McKinnon i Scollary, 1997; Ough i Amerine, 1988). U ovome je istraživanju kalij bio najzastupljeniji od svih elemenata (sr. vr. 788 mg/L) s najnižom izmjerenom vrijednosti od 392 mg/L i najvišom vrijednosti 1475 mg/L (Tablica 9), što je vrlo slično vrijednostima u češkim vinima, u kojima ga je nađeno od 789 do 1459 mg/L (Šperkova i Suchanek, 2005) ili vinima iz Njemačke s koncentracijama između 480 i 1860 mg/L (Thiel i Danzer, 1997). U prethodnom istraživanju hrvatskih vina (Leder i sur., 2015) nađeno je kalija u nešto širem koncentracijskom rasponu (239-1964 mg/L).

Kalcij u vinu sa kiselinama tvori soli (tartarate, glukonate, oksalate itd.) od kojih nastaju talozi. Taloženje se odvija vrlo polagano, počinje četiri do sedam mjeseci nakon fermentacije, obično nakon punjenja u boce. Na sadržaj kalcija utječe vrsta tla, dodatak kalcij sulfata ili kalcij karbonata moštu radi smanjivanja kiselosti, upotreba sredstava za bistrenje i filtriranje koja sadrže kalcij, zatim čuvanje u betonskim spremnicima, vrijeme i temperatura skladištenja, upotreba ionskih izmjenjivača i pH vrijednost (Ough i Amerine, 1988; Zoecklein i sur., 1999). Kalcij je u ovome istraživanju nađen u rasponu od 44,7 – 149,0 mg/L (sr. vr. 85,0 mg/L) (Tablica 9), a dobivene su vrijednosti vrlo slične onima u istraživanju Leder i suradnika (2015) gdje je kalcija u hrvatskim vinima nađeno od 34,3-130,6 mg/L, a usporedive su i s onima iz

čeških, talijanskih, njemačkih i španjolskih vina (Kment i sur., 2005; Šperkova i Suchanek, 2005; Frías i sur., 2003; Marengo i Aceto, 2003; Larcher i Nicolini, 2001).

Natrij je kao sastavni dio natrijeva klorida prisutan u tlu iz kojega prelazi u lozu, grozd i na kraju u vino. Natrij vinovoj lozi zapravo nije potreban, ali je zato mala količina klorida neophodna za fotosintezu. Izrazito visok salinitet tla uzrokuje inhibiciju fotosinteze i usporava dozrijevanje, dok u umjerenim koncentracijama (manje od 50 mmol/L) NaCl pogoduje dozrijevanju (Mullins i sur., 2007). Natrij u vino dolazi prirodnim putem iz tla ili zbog blizine mora, a može biti i namjerno dodan, što u enološkoj praksi nije dozvoljeno (Kment i sur., 2005). Prirodna koncentracija natrija u vinu se dodatkom natrij hidrogen sulfita, natrij sorbata, natrij bentonita, natrij sulfida ili natrij metabisulfita može povisiti i do 125 mg/L. Blizina mora i slanih jezera također povisuje njegovu koncentraciju (Eschnauer, 1982; Ough i Amerine, 1988), što je također potvrđeno u ispitivanjima vina sa Kanarskih otoka (Španjolska) gdje je nađeno od 56,7 do 167,2 mg/L natrija (Frias i sur. 2003).

Natrij je ovdje izmjeren u vrlo širokom rasponu od 2,7 mg/L do 196,5 mg/L (Tablica 9), a u tri je uzorka pronađen u koncentraciji iznad 80 mg/L, što je maksimalno dopušteno prema OIV-u (OIV, 2021c). U prethodnim ispitivanjima hrvatskih vina natrija je bilo od 2,1 do 64,8 mg/L (Leder i sur., 2015), sa srednjom vrijednosti od 14,9 mg/L, što se izvrsno slaže sa prosječnom koncentracijom Na dobivenom u ovome istraživanju (14,3 mg/L).

Potrebe vinove loze za magnezijem nisu naročito velike, ali smatra se da ga nema dovoljno ako je omjer kalija prema magneziju veći od 10, pa se tada u grožđu smanjuje udio šećera i peteljka se brže suši. Nasuprot tome, veće količine magnezija u tlu inhibiraju unos ostalih nutrijenata (Lanyon i sur., 2004). Magnezij je u vinu posljedica njegovog prirodnog sadržaja u grožđu (Álvarez et al. 2007), a važan je za stabilnost tartarata i kiseli okus vina. Na udio magnezija utječe upotreba sredstava za bistrenje i filtriranje, primjena ionskih izmjenjivača, čuvanje u betonskim spremnicima, vrijeme i temperatura čuvanja, koncentracija etanola, tartarata i sulfata te pH vrijednost. Za vrijeme fermentacije udio kalcija se smanjuje, a omjer magnezija prema kalciju se višekратно povećava (Ough i Amerine, 1988). Koncentracija magnezija (sr.vr. 81,3 mg/L) se u ovime istraživanju kretala između 47,1 i 140,0 mg/L (Tablica 9), što je usporedivo s prethodnim ispitivanjima hrvatskih vina (Leder i sur., 2015), a također i s koncentracijama u vinima ostalih europskih zemalja kao što su to Češka (Šperkova i Suchanek, 2005), Italija (Marengo i Aceto, 2003) i Španjolska (Alvarez i sur., 2007).

### 5.2.3 Koncentracije mikroelemenata

U grupu mikroelemenata svrstavaju se oni elementi koji se u vinu nalaze u koncentracijama između 10 µg/L i 10 mg/L (Voica i sur., 2009), a ispitivani elementi sa srednjim vrijednostima u ovome koncentracijskom rasponu bili su (u opadajućem nizu): B, Fe, Rb, Mn, Zn, Al, Sr, Cu, Ba, V, Sn, Pb i Cr (Tablica 9).

Bor dospijeva u vino putem prirodne kontaminacije koja je vezana uz mjesto uzgoja vinove loze i to pretežno preko površine bobica, a manje preko korijena vinove loze (Eschnauer, 1982). Dodatak bora gnojidbom povećava udio šećera u bobici grožđa i značajno smanjuje kiselost mošta (Batukaev i sur., 2016). U ovom je istraživanju prosječna koncentracija B u vinima iznosila 2,98 mg/L i to u rasponu od 0,66 - 7,35 mg/L (Tablica 9) te ga niti u jednom uzorku nije bilo iznad maksimalno dopuštene koncentracije koju propisuje OIV (80 mg/L izraženo kao borna kiselina, odnosno 14 mg/L bora, OIV, 2021c). Dobivene su vrijednosti usporedive s poljskim vinima (Płotka-Wasyłka i sur., 2018) u kojima je prosječna vrijednost bora bila od 0,333 do 12,1 mg/L, talijanskim vinima s prosječno 6,4 mg/L (Galgano i sur., 2008) te švicarskim vinima s vrijednostima oko 4,3 mg/L (Gremaud i sur., 2004).

Udio željeza u vinu uvjetuje više čimbenika, poput tla na kojem se proizvodi grožđe i gnojiva koja se pri tome koriste (Kment i sur., 2005; Lara i sur., 2005). Prirodni udio željeza u moštu jako varira ovisno o njegovu sadržaju u tlu i prašini na bobicama grožđa te kontaminaciji za vrijeme berbe, transporta i muljanja. Izvori željeza tijekom proizvodnje su nezaštićene košare od čelika, oštećeni zaštitni slojevi u rezervoarima, željezne armature, čelični vijci na drvenim bačvama i slično (Galani-Nikolakaki i sur., 2002). Za vrijeme fermentacije udio željeza se smanjuje usljed metabolizma kvasaca za 25-80 %, ovisno o prisustvu kisika i polifenolnih spojeva i o količini kvasca. U vinima koja su dobivena od grožđa muljanog u muljačama od nehrđajućeg čelika ima obično oko 1-2 mg/L željeza. U područjima u kojima se koristi primitivna oprema, željeza može biti čak oko 10 do 30 mg/L, pa i više (Ough i Amerine, 1988). Vrlo je važno poznavati koncentraciju željeza u vinu zbog njegova utjecaja na oksidativne procese (Frías i sur., 2001). U ovom istraživanju koncentracija željeza je zabilježena u rasponu od 0,25 mg/L do 8,55 mg/L, s prosječnom vrijednosti od 1,91 mg/L (Tablica 9), što je vrlo slično rezultatima prethodnih ispitivanja hrvatskih vina (Leder i sur., 2015; Šebečić i sur., 1998), u kojima su gornje dobivene vrijednosti okvirno dvostruko više od onih u vinima iz Češke (Kment i suradnici, 2005; Šperkova i Suchanek, 2005), Italije (Larcher i Nicolini, 2001) i Njemačke (Thiel i Danzer, 1997). Nasuprot tome, u ispitivanjima vina iz talijanske vinorodne

pokrajine Cuneo u Pijemontu, nađene su puno veće vrijednosti koncentracije željeza, između između 1,35 i 27,8 mg/L (Marengo i Aceto, 2003).

Alkalijski je element rubidij dobar pokazatelj zemljopisnoga podrijetla, jer se ne ubraja u kontaminanate vina i vrlo se često primjenjuje u istraživanjima zemljopisnoga podrijetla (Catarino i sur., 2008) jer potječe uglavnom iz tla te na njegov sadržaj ne utječu postupci pri proizvodnji vina (Marengo i Aceto, 2003). Dobivena srednja vrijednost koncentracije rubidija iznosila je 1,08 mg/L, a raspon je bio između 0,37 i 2,79 mg/L (Tablica 9). U znanstvenoj literaturi nema podataka o prethodnim istraživanjima rubidija u hrvatskim vinima, a dobivene su vrijednosti bitno niže od onih u portugalskim vinima u kojima je nađen u koncentracijama približno od 2,5 do 8,0 mg/L. Ovdje dobivene vrijednosti sličnije su koncentracijama Rb u vinima iz Srbije u kojima su vrijednosti bile od 0,79 do 4,70 mg/L (Đurđić i sur., 2017) te vinima iz Italije gdje je zabilježeno  $2,29 \pm 0,85$  mg/L u pokrajini Basilicata,  $2,18 \pm 0,65$  mg/L u Calabriji i  $3,79 \pm 2,21$  mg/L Campaniji (Galgano i sur., 2008).

Smatra se da je mangan esencijalni nutrijent za ljude jer njegov nedostatak uzrokuje abnormalnosti u radu mozga, utječe na formiranje kostura i hrskavice i toleranciju glukoze. Mn je neophodan za različite enzime koji sudjeluju u metabolizmu proteina i energije te u sintezi mukopolisaharida i kolesterola (Cabrera-Vique i sur., 2000). Udio Mn u vinu ovisi o kapacitetu unosa korijenskim sustavom vinove loze kao i o doprinosu tla. Na koncentraciju Mn u vinima može utjecati i poljoprivredna praksa i oprema podruma (Fabani i sur., 2010). U ovome je istraživanju koncentracija mangana (sr. vr. 0,96 mg/L) bila u rasponu od 0,19 mg/L do 3,32 mg/L (Tablica 9), što odgovara koncentracijama u prethodnim ispitivanjima vina iz Hrvatske (Leder i sur., 2015; Šebečić i sur., 1998) te je usporedivo s rezultatima dobivenim u portugalskim (Costa i sur. 2000), francuskim (Cabrera-Vique i sur., 2000) i češkim (Kment i sur., 2005; Šperkova i Suchanek, 2005) vinima.

Udio cinka u vinima također može biti posljedica antifungalnih tretmana u vinogradu (Fabani i sur., 2010; Lara i sur., 2005). U ovome je istraživanju nađeno cinka u rasponu od 0,13 do 2,84 mg/L (sr. vr. 0,69 mg/L) (Tablica 9). U dosadašnjim je istraživanjima hrvatskih vina nađeno Zn od ispod limita kvantifikacije do 3,07 mg/L (Leder i sur., 2015) odnosno od 0,23 do 1,70 mg/L (Šebečić i sur., 1998). Prema istraživanjima različitih autora maksimalni sadržaj cinka u španjolskim (Álvarez i sur., 2007; Moreno i sur., 2007; Frias i sur., 2003) i češkim vinima (Kment i sur., 2005; Šperkova i Suchanek, 2005) uglavnom je upola niži od onih

nađenih u ovome istraživanju (okvirno do 1,2 mg/L), dok je u talijanskim vinima (Larcher i Nicolini, 2001; Marengo i Aceto, 2003) skoro dvostruko viši (do 4,8 mg/L).

Aluminij je najzastupljeniji metal u Zemljinoj kori, a njegova visoka koncentracija u tlu sa niskom pH vrijednosti negativno utječe na rast vinove loze uzrokujući nepravilnosti u razvoju korijenovog sustava (Delhaize i sur., 2007). Prisustvo aluminija potiče unos fosfora, sumpora i kalija u listove i peteljke, ali potiskuje unos magnezija i kalcija. Aluminij u vino dospijeva i zbog skladištenja u ambalaži od aluminija i uporabe bentonita (McKinnon i sur., 1992). Ovdje dobivena srednja vrijednost koncentracije aluminija iznosila je 0,59 mg/L, a raspon je bio od 0,11 mg/L do 3,59 mg/L (Tablica 9). To su približno slične vrijednosti dobivene u prethodnom istraživanju hrvatskih vina (Leder i sur., 2015), ali su nešto niže od onih Šeruge i suradnika iz 1998. godine (0,62-8,60 mg/L), odnosno nešto više od vrijednosti zabilježenim u vinima iz Srbije (Đurđić i sur., 2017), gdje je najviša koncentracija iznosila oko 2,2 mg/L, što se može tumačiti razlikama u primijenjenoj tehnologiji proizvodnje i korištenju drugačijih ambalažnih materijala. Udio aluminija u ovome istraživanju hrvatskih vina usporediv je sa njegovim udjelom iz talijanske pokrajine Basilicata, gdje ga je dobiveno  $0,89 \pm 0,20$  mg/L, odnosno s pokrajinama Calabria i Campania, u kojima su vrijednosti bile  $1,55 \pm 0,12$  te  $1,26 \pm 0,27$  mg/L (Galgano i sur., 2008).

Zemnoalkalijski metal stroncij često se primjenjuje u istraživanjima zemljopisnoga podrijetla (Fan i sur., 2018), iako se u tu svrhu najčešće koriste omjeri njegovih izotopa  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  (Durante i sur., 2018; Geana i sur., 2016b; Almeida i Vasconcelos, 2003). U ovom istraživanju je prosječna koncentracija stroncija iznosila 0,46 mg/L, odnosno od 0,10 do 1,92 mg/L (Tablica 9), što su vrijednosti vrlo slične rumunjskim vinima u kojima je dobiveno 0,14 – 1,6 mg/L (Geana i sur, 2013), a također i vinima kanarskog otočja (Frías i sur., 2003), dok su u slovačkim vinima njegove koncentracije bile nešto niže, sa srednjim vrijednostima oko 0,15 mg/L (Suhaj i Koreňovská 2006).

Prisutnost bakra utječe na stvaranje zamućenja (bakarni lom) povezanog s nestabilnošću proteina (Clark i sur., 2015). Prema preporukama OIV-a u vinu ne bi smjelo biti bakra više od 1 mg/L da bi se prevenirala pojava bakarnog loma (OIV, 2021c). U ovome je istraživanju nađeno prosječno 0,18 mg/L bakra u rasponu od 0,05 do 1,50 mg/L (Tablica 9), dok ga je u koncentraciji iznad 1 mg/L nađeno u samo jednom uzorku. Bakar u vino dolazi iz tla, što je povezano s primjenom pesticida i proizvodnim procesom. Uzevši u obzir da mjere zaštite vinove loze sredstvima na bazi bakra mogu povećati njegovu količinu u moštu i vinu, kao i

obrada vina bakrenim sulfatom i kontakt s bakrenim legurama (Rusjan i sur., 2006; Kment i sur., 2005; Zoecklein i sur., 1999; Ough i Amerine, 1988), razumljive su i podudarnosti raspona ovoga elementa dobivenoga u prethodnim ispitivanjima vina podrijetlom iz Hrvatske, u kojima su nađene vrlo slične koncentracije bakra, od 0,016 do 1,32 mg/L (Leder i sur., 2015), odnosno od 0,09 do 0,93 mg/L (Šebečić i sur., 1998), a također i u vinima iz Rumunjske (Geana i sur., 2014), Italije (Larcher i Nicolini, 2001; Marengo i Aceto, 2003) i Češke (Kment i sur., 2005; Šperkova i Suchanek, 2005).

Vanadij je prisutan u zemljinoj kori u razinama usporedivim s koncentracijom cinka, a povišene koncentracije nađene su u fosilnim gorivima, posebno onima morskoga podrijetla. Njihovim izgaranjem u okoliš se emitiraju mikročestice spojeva vanadija, uglavnom  $V_2O_5$ , što može biti uzrokom onečišćenja, posebno u urbanim i industrijskim regijama. Drugi izvor onečišćenja vanadijem proizlazi iz njegove upotrebe kao komponente različitih legura, posebno nehrđajućeg čelika (Teissèdret i sur., 1998). Vanadij se vrlo često određuje u istraživanjima zemljopisnoga podrijetla vina (Fan i sur., 2018). Koncentracije vanadija izmjerene u uzorcima ovoga istraživanja kretale su se između 49,0 i 133,0  $\mu\text{g/L}$  sa srednjom vrijednosti 83,6  $\mu\text{g/L}$  (Tablica 9). Dobivene vrijednosti u skladu su s vrijednostima određenim u francuskim vinima iz pokrajine Languedoc ( $77,2 \pm 20,9 \mu\text{g/L}$ ) (Teissèdret i sur., 1998), ali su značajno veće od vrijednosti u vinima iz Bosne i Hercegovine, u kojima je prosječno nađeno 17  $\mu\text{g/L}$  vanadija (Blesić i sur., 2017).

Kositar se također često određuje u istraživanjima zemljopisnoga podrijetla vina (Fan i sur., 2018; Aydin i sur., 2010; Galgano i sur., 2008; Suhaj i sur., 2006). Srednja je vrijednost zabilježena u ovome istraživanju iznosila 55,0  $\mu\text{g/L}$ , a raspon je bio između 2,0 i 129,0  $\mu\text{g/L}$  (Tablica 9), što je nešto niže nego u ranije provedenom istraživanju hrvatskih vina (Leder i sur., 2015), gdje je dobiveno prosječno 124  $\mu\text{g/L}$ . Nasuprot tome, u talijanskim vinima su nađene vrijednosti koje su primjetno varirale, od vrlo niskih (prosječno 2,5  $\mu\text{g/L}$ ) u pokrajinama Basilicata, Calabria i Campania (Galgano i sur., 2008), pa preko vrijednosti od 20  $\mu\text{g/L}$  do 75  $\mu\text{g/L}$  u Trentinu (Larcher i Nicolini, 2001), do puno viših koncentracija u vinima iz pokrajine Cuneo gdje je nađeno između 20 i 1000  $\mu\text{g/L}$  (Marengo i Aceto, 2003). U vinima iz različitih regija Republike Češke njegov je udio bio od 1,0 do 79,0  $\mu\text{g/L}$  (Šperkova i Suchanek, 2005).

Olovo se ubraja u kontaminate vina (E Schnauer, 1982) te je kao i ostali teški metali toksično za biološke sustave zbog negativnog utjecaja na fiziološke funkcije pojedinih enzima stanice (Zoecklein i sur., 1999). Međunarodni ured za lozu i vino (franc. *Office international*

*de la Vigne et du Vin* - OIV) propisuje granične vrijednosti za pojedine elemente (OIV, 2021c), a ona za olovo iznosi 0,15 mg/L (počevši od godine berbe 2007.). U istraživanju provedenom na portugalskim vinima (Almeida i Vasconcelos, 2003), zaključeno da je glavni izvor onečišćenja sam proces vinifikacije, da je veći unos olova pri tradicionalnom nego modernom načinu proizvodnje i da samo oko 1/4 do 1/3 olova potječe iz tla ili atmosfere. Najniža koncentracija olova izmjerena u ovome istraživanju bila je 2,5 µg/L, najviša 111,0 µg/L, a prosječno 30,2 µg/L (Tablica 9), što je ispod maksimalno dopuštene granice koju propisuje OIV (OIV, 2021c). Dobivene vrijednosti su u skladu s onima zabilježenim u vinima iz Italije (Marengo i Aceto, 2003; Larcher i Nikolini, 2001) i Argentine (Lara i sur., 2005). U vinima iz različitih čeških regija su Šperkova i Suchanek (2005) našli od 11 do 48 µg/L olova. Kment i suradnici (2005) od 10,9 pa čak do 1253 µg/L, a Galani-Nikolakaki i suradnici (2002) u vinima s otoka Krete (Grčka) od 18 do 420 µg/L.

Krom u vino može dospjeti iz vinarske opreme koja sadrži njegove legure u pumpama, slavinama i priključcima (Ribereau-Gayon i sur., 2000). U hrvatskim vinima je ovog potencijalno toksičnog elementa nađeno između koncentracija ispod limita kvantifikacije pa do 38 µg/L (Leder i sur., 2015), odnosno od 12 do 75 µg/L prema Šebečić i suradnicima (1998). Približno slične vrijednosti kroma su nađene i u ovome istraživanju, od 4,7 do 161,0 µ/L (srednja vrijednost 19,0 µ/L) (Tablica 9). Ove vrijednosti su primjetno više od onih nađenih u vinima iz Srbije (Đurđić i sur., 2017) u kojima je nađeno od 0,1 do 20,7 µg/L, dok su nasuprot tome, približno slične vrijednostima (od 9,8 do 211,1 µg/L) nađenim u rumunjskim vinima (Geana i sur., 2014).

#### **5.3.4 Koncentracije ultra mikroelemenata**

Analizirani elementi kojima je koncentracija bila ispod 10 µg/L, a svrstavaju se u ultra mikroelemente (Voica i sur., 2009), bili su: As, Co, Li, Mo i Cd (u opadajućem nizu) (Tablica 9).

Arsen je prisutan u moštu i vinu samo u tragovima, no ukoliko su pri proizvodnji vina korišteni materijali koji ga sadrže, mogu biti prisutne i veće količine. Arsen se tlu vinograda akumulira u izuzetno visokim koncentracijama kao posljedica dugotrajne primjene pesticida na bazi arsena. U različitim istraživanjima ustanovljeni udio arsena u vinu je uglavnom toliko mali da ne predstavlja opasnost u smislu toksičnog učinka na konzumenta (Ough i Amerine, 1988). Arsen je u ovome istraživanju izmjeren u rasponu od 4,5 do 27,9 µg/L (sr. vr. 7,5 µg/L) (Tablica

9) te se može zaključiti da u vinogradima u kojima su uzorci prikupljeni nije bilo prekomjerne primjene pesticida s arsenom. I u dosadašnjim je ispitivanjima hrvatskih vina arsena bilo u sličnim koncentracijama (Leder i sur., 2015; Fiket i sur., 2011), a također i u vinima Srbije (Đurđić i sur., 2017) ili Češke (Kment i sur., 2005).

Kobalt je esencijalni element, potencijalno toksičan u slučaju prekomjernog unosa (Galgano i sur., 2008). Koncentracija Co u moštu i vinu može se povećati zbog bentonita koji se koristi u svrhu bistrenja (Nicolini i sur., 2004; Catarino i sur., 2008). Do danas je objavljeno samo nekoliko radova o hrvatskim vinima kojima je određivan i kobalt (Leder i sur., 2015; Fiket i sur., 2011) te su vrijednosti navedene u njima vrlo slične koncentracijama izmjerenim u ovome istraživanju, gdje je prosječna vrijednost iznosila 5,9  $\mu\text{g/L}$ , a raspon od 1,0 do 34,0  $\mu\text{g/L}$  (Tablica 9).

Kadmij je element koji je toksičan u vrlo niskim koncentracijama, s vremenom se akumulira u organizmu i može uzrokovati razne bolesti. Akumulira se u bubrezima, gdje mu je vrijeme poluraspada čak trideset godina (Robards i Worsfold, 1991). Kadmij u vino može dospjeti iz insekticida i fungicida koji ga sadrže, a također i zbog onečišćenja okoliša na onim mjestima gdje industrijska postrojenja postoje u blizini vinograda te je preporučljiva stroga kontrola sadržaja ovog elementa u vinu i ostalim alkoholnim pićima jer njihova konzumacija doprinosi unosu kadmija u organizam (Mena i sur., 1996). U hrvatskim je vinima ispitivanim u ovome istraživanju srednja vrijednost koncentracije kadmija iznosila 0,7  $\mu\text{g/L}$ , a raspon od 0,2 - 5,0  $\mu\text{g/L}$  (Tablica 9). Slične su razine kadmija ustanovljene prethodnim istraživanjima hrvatskih vina (Leder i sur., 2015; Fiket i sur., 2011) i makedonskih vina u kojima je pronađeno između 0,40 i 5,69  $\mu\text{g/L}$  (Ivanova-Petropulos i sur., 2013). Kadmij je također u tragovima nađen i u vinima iz Srbije (Đurđić i sur., 2017), Češke (Kment i sur., 2005; Šperkova i Suchanek, 2005) i Italije (Marengo i Aceto, 2003).

Alkalijski metal litij je element koji se često analizira u istraživanjima zemljopisnoga podrijetla vina raznih zemalja (Fan i sur., 2018), a važan je mikronutrijent u prehrani ljudi. Premda njegova točna molekularna funkcija kao potencijalnog esencijalnog elementa u tragovima još nije u potpunosti razjašnjena, povezuje ga se sa smanjenjem rizika od demencije i samoubojstva te Alzheimerove bolesti (Seidel i sur., 2020). Litij je u vinu prisutan zbog unosa putem korijena vinove loze, ali i zbog skladištenja u staklenim bocama (Zerbinati i sur., 2000). Litija je u ovome istraživanju izmjereno od 1,3 do 15,3  $\mu\text{g/L}$  (sr. vr. 4,6  $\mu\text{g/L}$ ) (Tablica 9). Ove se vrijednosti mogu usporediti samo s jednim objavljenim radom s ispitivanim Li u hrvatskim vinima (Fiket i sur., 2011) s vrlo sličnim vrijednostima. Značajno više vrijednosti Li (30-70



$\mu\text{g/L}$ ) nađene su u vinima iz Italije (Cugnetto i sur., 2014) i Španjolske (30-135  $\mu\text{g/L}$ ) (García-Rodríguez i sur., 2011), a dobivene razlike upućuju na mogućnost primjene Li u razlikovanju zemljopisnoga podrijetla vina.

Prijelazni metal molibden je osim u hrvatskim (Fiket i sur., 2011), također analiziran u vinima mnogih drugih zemalja u svrhu utvrđivanja zemljopisnoga podrijetla (Fan i sur., 2018; Cugnetto i sur., 2014; Ivanova-Petropulos i sur., 2013; González i sur., 2009). Tako je primjerice u makedonskim vinima nađen do najviše 4,4  $\mu\text{g/L}$  (Ivanova-Petropulos i sur., 2013), u talijanskim vinima od 30 do 140  $\mu\text{g/L}$  (Cugnetto i sur., 2014), a u španjolskim vinima do 0,052  $\mu\text{g/L}$  (González i sur., 2009). Molibdena je u ovome istraživanju izmjereno u rasponu od 0,1 do 11,0  $\mu\text{g/L}$  (sr. vr. 4,3  $\mu\text{g/L}$ ) (Tablica 9). Ova varijabilnost u koncentracijama molibdena ukazuje na veliki potencijal primjene ovoga elementa kao obilježivača zemljopisnog podrijetla.

### **5.3 Utjecaj boje vina, godine berbe, načina proizvodnje te zemljopisnoga podrijetla na određivane elemente te omjere stabilnih izotopa ugljika i kisika.**

U Tablici 10. prikazani su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika te koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina ( $n = 190$ ) izraženi obzirom na boju vina. Dobiveni rezultati su obrađeni ANOVA-om, a različita slova (A, B) u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey testu. ANOVA je pokazala da postoje signifikantne razlike između bijelih i crnih vina obzirom na sljedeće mjerne veličine:  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ , B, Ca, Fe, K, Mg, Na, Pb, Rb, Sn i V. Za sve je ovdje navedene mjerne veličine ustanovljen značajno viši udio u crnim vinima nego u bijelima, osim za kalcij.

Srednja vrijednost  $\delta^{18}\text{O}$  je u crnim vinima bila 2,5 ‰, a u bijelima -5,30 ‰ VSMOW, dok je za  $\delta^{13}\text{C}$  dobiveno -26,67 ‰ za crna i -30,28 ‰ V-PDB za bijela vina. Uzrok statistički značajno viših omjera stabilnih izotopa kisika i ugljika zabilježenih u crnim vinima u odnosu na bijele može se potražiti u utjecaju zemljopisnoga podrijetla, budući da je među uzorcima primorskoga područja veći udio crnih, a kontinentalnoga bijelih vina. Ovaj se utjecaj može primijetiti i za elemente B, Ca, K, Na, Pb, Rb i Sn u kojima su dobivene statistički značajne razlike u koncentracijama obzirom i na boju i na zemljopisno podrijetlo (Tablica 13), dok su za Fe, Mg i V dobivene statistički značajne razlike u pogledu boje, ali ne i zemljopisnog podrijetla.

Stoga bi se u slučaju potonja tri elementa moglo govoriti samo o utjecaju boje vina, odnosno s istom povezane tehnologije proizvodnje, dok za sve ostale mjerne veličine s utvrđenim statistički značajnim razlikama nije moguće izolirati uzrok. Dobivene razlike u ovdje mjerenim elementima su vjerojatno, osim osobitostima pojedinih bijelih i crnih sorti, uzrokovane i razlikom u tehnologiji proizvodnje crnih i bijelih vina, odnosno fazom maceracije kod proizvodnje crnih vina kojom se omogućuje dulji kontakt mošta s pokožicom i sjemenkama, a time i bolja ekstrakcija elemenata iz ovih dijelova bobice. Važno je napomenuti da su crna autentična vina proizvedena bez maceracije te se utjecaj boje vina ne može jednoznačno tumačiti.

Poznato je da raspodjela Ca, Fe, K, Mg i Na u bobici grožđa nije homogena. Primjerice, pulpa bobice bogatija je kalijem i natrijem od sjemenki i pokožice, koje su bogatije kalcijem i magnezijem (Curvelo-Garcia, 1988). Prema Ribereau-Gayonu (2000) kalija u vinu ima više u crnim nego u bijelim vinima, što se objašnjava sposobnošću fenola da inhibiraju taloženje kalijeva ditaratarata. U ovome su istraživanju koncentracije K bile statistički značajno više u crnim (sr. vr. 906 mg/L) nego u bijelim vinima (sr. vr. 720 mg/L), što se podudara s prethodnim istraživanjima hrvatskih (Leder i sur., 2015) i srpskih vina (Đurđić i sur., 2017).

Fermentacija mošta uz prisustvo pokožice grožđa imala je utjecaja na koncentracije magnezija i bora, kojih je također bilo statistički značajno više u crnim nego u bijelim vinima, što je u skladu s literaturnim podacima (Płotka-Wasyłka i sur., 2018; Đurđić i sur., 2017; Leder i sur., 2015; Gremaud i sur., 2004).

U ovome je istraživanju jedino za kalcij pronađena statistički viša koncentracija u bijelim vinima (89,3 mg/L) nego u crnima, što se podudara s rezultatima koje su objavili Leder i suradnici (2015), iako je očekivana obrnuta situacija obzirom da je kalcija, kao i magnezija, više u sjemenkama i pokožici grožđa nego u pulpi (Curvelo-Garcia, 1988). Međutim, magnezija je izmjereno statistički značajno više i u vinima kontinentalnoga područja nego u onima iz primorja, tako da je uzrok ove razlike vjerojatno u utjecaju zemljopisnogaa podrijetla. Ovaj je utjecaj vjerojatno dominantan i u pogledu statistički značajne razlike u koncentracijama Na, kojega je nađeno više u crnim nego u bijelim vinima, ali i također više u primorskim nego u kontinentalnim vinima.

Pokožica bobice grožđa posebno je bogata željezom, pa su tako crna vina zbog fermentacije masulja uz prisustvo pokožice grožđa bogatija željezom od bijelih (Riganakos i Veltsistas, 2003; Curvelo-Garcia, 1988), što je i ovdje primijećeno, s koncentracijama željeza statistički značajno većim u crnim (sr. vr. 2,28 mg/L) nego u bijelim vinima (sr. vr. 1,70 mg/L), kao i kod Leder i suradnika (2015).

Olova ima više u sjemenkama nego u pulpi (Teissedre i sur., 1994) te ga je sukladno tome ovdje u crnim vinima dobiveno u višim koncentracijama (35,8 µg/L) nego u bijelim (26,9 µg/L), kao što je to objavljeno i u radovima Đurđić i suradnika (2017) te Leder i suradnika (2015).

Koncentracije rubidija i kositra bile su također statistički značajno više u crnim nego u bijelim vinima, što je usporedivo s drugim istraživanjima (Płotka-Wasyłka i sur., 2018; Đurđić i sur., 2017; Aydın i sur., 2010; Gremaud i sur., 2004), ali također uz napomenu da je isti trend dobiven i u primorskim u odnosu na kontinentalna vina.

U pogledu vanadija je kao i u istraživanju francuskih i kalifornijskih vina (Teissèdret i sur., 1998) koncentracija bila viša u crnim nego u bijelim vinima, dok je kod vina iz Bosne i Hercegovine te Srbije bilo obrnuto (Blesić i sur., 2017; Đurđić i sur., 2017).

U Tablici 11. prikazani su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika i koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina (n = 190) izraženi s obzirom na godinu berbe. Dobiveni rezultati su obrađeni ANOVA-om, a različita slova (A, B) u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey testu.

ANOVA je pokazala da postoje signifikantne razlike između dviju godina berbi (2015. i 2016.) obzirom na sljedeće mjerne veličine:  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ , Ca, Cd, Co, Cr, Mo, Pb i Sn.

Sorte grožđa koje se mogu uzgajati u određenoj regiji i ukupna kvaliteta vina uvjetovani su općim klimatskim prilikama, dok klimatska varijabilnost određuje kvalitetu vina od berbe do berbe. Mnogi pojedinačni vremenski i klimatski čimbenici mogu utjecati na rast grožđa i kvalitetu vina, poput sunčevog zračenja, akumulacije topline, ekstremnih temperatura, oborina, vjetrova te ekstremnih vremenskih događaja poput tuče. Za dozrijevanje grožđa do optimalne razine šećera, kiselina i aroma za dobivanje vina dobre kvalitete ključni su aspekti duljina vegetacije i temperatura (Jones i sur., 2005).

Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHZ, 2015; DHZ, 2016) srednje godišnje temperature zraka za 2015. i 2016. godinu na području Hrvatske bile su iznad višegodišnjeg prosjeka (1961. - 1990.). Za obje promatrane godine su toplinske prilike u Hrvatskoj opisane dominantnom kategorijom ekstremno toplo. Analiza godišnjih količina oborine koje su izražene u postotcima (%) višegodišnjeg prosjeka (1961. - 1990.) pokazala je da je u 2015. godini u Hrvatskoj na većem broju analiziranih postaja oborine bilo manje od prosjeka, dok je nasuprot tome, u 2016. godini u Hrvatskoj količina oborine bila viša od prosjeka. Za 2015. godinu se u kategoriji kišno nalazio dio srednjeg i južnog Jadrana te šire

područje Karlovca i Siska dok je sušno i ekstremno sušno bilo na pojedinim dijelovima sjevernog Jadrana. Preostali dio Hrvatske svrstan je u dominantnu kategoriju normalno. Za 2016. godinu se u kategoriji kišno nalazilo šire područje Siska, dio istočne Hrvatske, šire područje Gospića i Ogulina te dio sjevernog Jadrana. Dio Istre i Kvarnera bio je svrstan u kategoriju vrlo kišno, dok se dio srednjeg i južnog Jadrana nalazio u kategoriji sušno. Preostali dio Hrvatske svrstan je u kategoriju normalno.

Vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  u vodi vina bile su u prosjeku za 1 ‰ pozitivnije u 2015. godini nego u 2016., što se može objasniti većom količinom oborine cijele 2016. godine, a osobito za vrijeme berbe. U rujnu 2016. prosječno je bilo 152 mm oborine, (DHZ, 2016), a u rujnu 2015. godine prosječno 88 mm (DHZ, 2015). Sličan utjecaj količine oborine na vrijednosti omjera  $\delta^{18}\text{O}$  objavili su Christoph i sur. (2006) i Dutra i sur. (2013).

Na varijacije vrijednosti omjera  $\delta^{13}\text{C}$  mogu također značajno utjecati uvjeti uzgoja vinove loze (Farquhar i sur., 1989). Konkretno, radi se o potrošnji  $\text{CO}_2$  iz foto-respiracije u biljci koja reagira na deficit vode zatvaranjem stoma (Gilbert i sur., 2011). Ovim je rezultatima pokazan i doprinos sezonskih meteoroloških prilika koje utječu na dostupnost pojedinih elemenata i njihov unos u biljku (Camin i sur., 2015; Charlton i sur., 2010), pa su tako Ca i Sn nađeni u značajnije višim koncentracijama u uzorcima berbe 2016. nego 2015., a obrnuto je utvrđeno za Cd, Co, Cr, Mo i Pb.

Tehnološki postupci proizvodnje vina se u većoj ili manjoj mjeri razlikuju od proizvođača do proizvođača vina, što može utjecati na udio pojedinih sastojaka vina i njegovu konačnu kvalitetu. U radu su razmatrane dvije kategorije vina: autentična vina, proizvedena mikroviniifikacijom prema EU propisima (Uredba EU 2018/274) namijenjena EU izotopnoj bazi podataka za vina (78 uzoraka). Druga kategorija su konvencionalno proizvedena vina (112 uzoraka) iz vinorodnih područja RH prikupljena nakon provedbe postupka stavljanja na tržište u HAPIH-CVVU. U Tablici 12. prikazani su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika te koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina ( $n = 190$ ) izraženi s obzirom na način proizvodnje uzoraka: autentični uzorci (A) i konvencionalno proizvedeni uzorci (C).

ANOVA je pokazala da postoji statistički značajan utjecaj načina proizvodnje na veličine:  $\delta^{18}\text{O}$ , Al, B, Ca, Fe, Mg, Na, Pb, Sr i V, što je u pogledu elemenata vjerojatno uzrokovano određenim agrotehničkim i enološkim postupcima (npr. primjena bentonita, dijatomejske zemlje itd.) koji su primijenjeni kod konvencionalno proizvedenih uzoraka, a kod mikroviniificiranih nisu, a također i razlikom u veličini uzorka (proizvodnja autentičnih uzoraka

od 25 kg grožđa) te nehomogenom raspodjelom Ca, Fe, K, Mg, Na i Pb u bobici grožđa (Curvelo-Garcia, 1988; Teissedre i sur., 1994).

Christoph i suradnici (2015) objavili su tipične varijacije omjera stabilnih izotopa u vodi i etanolu vina iz vinogradarskih zona srednje i južne Europe, prema kojima su najniže vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  – 4,00, odnosno -1,00 ‰ VSMOW. U tom bi se smislu ispod navedene granice od -4,00 ‰ VSMOW nalazi i dio konvencionalno proizvedenih uzoraka kojima je izmjeren raspon  $\delta^{18}\text{O}$  od -7,28 do 7,20 ‰ VSMOW.

Odstupanja u vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  mogu upućivati na pogrešno deklariranje konvencionalnih uzoraka obzirom na zemljopisno podrijetlo i godinu berbe ili mogućnost dodatka vode. Da bi se ustanovila takva vrsta patvorenja potrebno je provesti šire ispitivanje izotopnih omjera, uključujući omjere izotopa ugljika i vodika (Christoph i sur., 2003), usmjereno na specifično područje u kojem je upitno vino proizvedeno. Bez obzira na to, intenzivno će se kišno razdoblje tijekom berbe također odraziti na omjere ovih izotopa (Christoph i sur., 2006) te je stoga u procjenu autentičnosti potrebno uzeti u obzir i klimatske prilike za promatranu godinu berbe.

U ovome su istraživanju izmjerene statistički značajno više koncentracije B, Ca, Mg, Sr i V u konvencionalno proizvedenim uzorcima nego u autentičnim, dok je obrnuto bilo za Fe, Na i Pb. Ove razlike su vjerojatno uzrokovane utjecajem načina proizvodnje, ali ne smije se zanemariti i ovdje inkorporiran doprinos načina proizvodnje autentičnih vina crnih sorti (bez maceracije).

U Tablici 13. prikazani su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika i koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi s obzirom na zemljopisna područja: kontinentalna i primorska Hrvatska.

ANOVA je omogućila razlikovanje ova dva područja pomoću sljedećih mjernih veličina:  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ , Al, B, Ca, K, Li, Na, Pb, Rb, i Sn. Uzorci vina iz kontinentalnih vinograda pokazali su značajno niže srednje vrijednosti omjera izotopa kisika i ugljika (sr. vr.  $\delta^{18}\text{O}$ : -0.22 ‰ VSMOW;  $\delta^{13}\text{C}$ : -28,31 ‰ V-PDB) u odnosu na vinograde iz primorske Hrvatske (sr. vr.  $\delta^{18}\text{O}$ : 4.09 ‰ VSMOW;  $\delta^{13}\text{C}$ : -26,29 ‰ V-PDB). Ove vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^{13}\text{C}$  se uklapaju u prethodno objavljene vrijednosti za vina srednje i južne Europe (Christoph i sur., 2015) i za hrvatska vina iz berbi od 1999. do 2001. (Christoph i sur., 2004). Izuzetak su prosječne vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  iz vina primorskog područja, koje su bile niže od vrijednosti kod vina koje su ispitivali Christoph i suradnici (2004).

Dvojni geografski položaj Hrvatske, koja je istodobno i srednjoeuropska i sredozemna zemlja, uvelike objašnjava različitosti rezultata dobivenih u uzorcima iz pojedinih područja. Ove se razlike mogu objasniti i specifičnim klimatskim uvjetima svakog pojedinog područja, kao što su temperatura, vlaga i meteorološki uvjeti.

Uzorci iz primorskih hrvatskih vinograda sadržavali su značajno više Al, B, K, Na, Pb, Rb i Sn od onih iz kontinentalnih vinograda. Vrijednosti Na bile su gotovo dvostruko veće u primorskom (sr. vr. 20,8 mg/L) nego u kontinentalnom području (sr. vr. 10,6 mg/L) što je i očekivano zbog utjecaja blizine Jadranskog mora. Suprotno tome, kontinentalni vinogradi bili su karakterizirani značajno višim srednjim vrijednostima Ca (89,3 mg/L) i Li (5,2 µg/L) nego primorski vinogradi (77,5 mg/L Ca i 3,6 µg/L Li). U znanstvenoj literaturi su za razlikovanje vina prema zemljopisnom podrijetlu također kao značajni ustanovljeni ovdje navedeni elementi u različitim kombinacijama (Fan i sur., 2018; Kokkinofa i sur., 2017; Dinca i sur., 2016; Leder i sur., 2015; Geana i sur., 2014; Coetzee i sur., 2014; Geana i sur., 2013; Ivanova-Petropulos i sur., 2013; Galgano i sur., 2008).

U Tablici 14. prikazani su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika i koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi s obzirom na vinogradarske zone u Hrvatskoj (B, CI i CII).

ANOVA je omogućila razlikovanje ove tri zone pomoću:  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ , Al, B, Ba, Ca, K, Li, Mg, Mn, Na, Rb, i Sn.

Pokazalo se da su vrijednosti omjera izotopa kisika statistički značajno različite u sve tri promatrane zone (B: sr. vr. -0,61 ‰ VSMOW; CI: 0,51 ‰ VSMOW; CII: 4,09 ‰ VSMOW).

Za zonu CII karakteristične su značajno više vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  (sr. vr. - 26,29 ‰ V-PDB) u odnosu na dvije kontinentalne zone (B: sr. vr. -28,38 ‰ V-PDB i CI: sr. vr. -28,20 ‰ V-PDB).

Vrijednosti kalija pratile su isti trend sa značajno višim koncentracijama u zoni CII (sr. vr. 889 mg/L) nego u B i CI (sr. vr. 730 mg/L u obje), a tako je i za Na (CII: sr. vr. 20,8 mg/L, B: 10,7 mg/L, CI: 10,2 mg/L), Rb (CII: sr. vr. 1,22 mg/L, B: 1,05 mg/L, CI: 0,88 mg/L) i Sn (CII: sr. vr. 66,3 µg/L, B: 46,8 µg/L, CI: 51,6 µg/L).

Osim omjera izotopa ugljika i kisika, značajne razlike opažene su za elemente Mg i Mn za razlikovanje kontinentalnih zona B i CI. Zonu B karakteriziraju niže koncentracije Mg (sr. vr. 76,8 mg/L) od zone CI (sr. vr. 85,4 mg/L), a također i niže koncentracije Mn (B: sr. vr. 0,92 mg/L, CI: sr. vr. 1,19 mg/L).

U pogledu razlikovanja primorske zone CII od kontinentalne zone B, značajne su iste mjerne veličine kao i za cijelo kontinentalno i primorsko područje, uz izuzetak Pb i dodatak Mg, čija je koncentracija bila značajno niža u zoni B (sr. vr. 76,8 mg/L) nego CII (sr. vr. 83,9 mg/L).

Razlikovanje kontinentalne zone CI u odnosu na primorsku zonu CII postignuto je još i ovim elementima: B, Ba, Li i Mn. Vrijednosti dobivene za B bile su značajno više u zoni CII (sr. vr. 3,60 mg/L) nego u CI (sr. vr. 2,36 mg/L). Uočeno je da element Ba ima značajno različite koncentracije između zona CI i CII.

Vrijednosti litija bile su značajno više u zoni CI (sr. vr. 6,0  $\mu\text{g/L}$ ) nego u CII (sr. vr. 3,6  $\mu\text{g/L}$ ), a također i za Mn (CI: sr. vr. 1,19 mg/L, CII: sr. vr. 0,87 mg/L). B, Ba, Li i Mn su se pokazali značajni i u razlikovanju zemljopisnoga podrijetla južnoafričkih (Coetzee i sur., 2014), rumunjskih (Dinca i sur., 2016), argentinskih (Fabani i sur., 2010), makedonskih (Ivanova-Petropulos i sur., 2013) ciparskih (Kokkinofta i sur., 2017) i hrvatskih vina (Leder i sur., 2015).

U Tablici 15. prikazani su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika i koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi s obzirom na četiri vinogradarske regije: Središnja bregovita Hrvatska, Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Hrvatska Istra i Kvarner i Dalmacija.

ANOVA je omogućila razlikovanje regija pomoću ovih mjernih veličina:  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ , B, Ba, Ca, Co, K, Li, Mg, Mn, Na, Rb, Sn i V. Pokazalo se da su vrijednosti omjera izotopa kisika statistički značajno različite u sve četiri promatrane regije.

Utvrđeno je da se vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  statistički značajno razlikuju u sve četiri promatrane vinogradarske regije. U Središnjoj bregovitoj Hrvatskoj zabilježene su najniže vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  (sr. vr. -0,61 ‰ VSMOW), zatim redom u Slavoniji i hrvatskom Podunavlju (sr. vr. 0,51 ‰ VSMOW), Hrvatskoj Istri i Kvarneru (sr. vr. 3,55 ‰ VSMOW) te Dalmaciji (sr. vr. 4,09 ‰ VSMOW).

Vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  omogućile su razlikovanje dvije primorske regije, Hrvatske Istre i Kvarnera (sr. vr. -26,85 ‰ V-PDB) u odnosu na Dalmaciju (sr. vr. -25,90 ‰ V-PDB) te obje navedene regije prema kontinentalnim regijama, Središnjoj bregovitoj Hrvatskoj (sr. vr. -28,38 ‰ V-PDB) i Slavoniji i hrvatskom Podunavlju (sr. vr. -28,20 ‰ V-PDB).

Kod elemenata bora i kalija značajno se razlikuju obje kontinentalne regije u odnosu na obje primorske, a kod barija je utvrđena statistički značajna razlika između Slavonije i hrvatskog Podunavlja (sr. vr. 0,12 mg/L) i Dalmacije (sr. vr. 0,09 mg/L).

Kalcij je omogućio razlikovanje dviju primorskih regija u kojima su zabilježene značajno niže vrijednosti (sr. vr. 78,1 mg/L i 77,1 mg/L) nego u Središnjoj bregovitoj Hrvatskoj (sr. vr. 92,1 mg/L). Kod kobalta su zabilježene značajno najviše vrijednosti u vinima Hrvatske Istre i Kvarnera (8,3 µg/L), što omogućava njeno razlikovanje od ostale tri vinogradarske regije u kojima je kobalta zabilježeno prosječno 4,9 µg/L, 5,5 µg/L i 5,8 µg/L. Ova dva elementa su se pokazala značajnima za razlikovanje zemljopisnoga podrijetla i u drugim istraživanjima (Fan i sur., 2018; Dinca i sur., 2016; Leder i sur., 2015).

Ustanovljene su značajne razlike između vrijednosti dobivenih za litij u dvije primorske regije (3,6 mg/L) u odnosu na kontinentalnu regiju Slavonija i hrvatsko Podunavlje (6,0 mg/L), što se može usporediti s rezultatima Kruzlicove i suradnika (2013) koji su objavili da se pomoću litija mogu razlikovati uzorci vina iz Slavonije, Istre i Vojvodine.

Vrijednosti magnezija su se značajno razlikovale u Središnjoj bregovitoj Hrvatskoj (76,8 mg/L) i Dalmaciji (87,1 mg/L).

Izmjerene vrijednosti mangana u Dalmaciji značajno su niže (0,71 mg/L) od onih u Hrvatskoj Istri i Kvarneru (1,09 mg/L) te Slavoniji i hrvatskom Podunavlju (1,19 mg/L). U Središnjoj bregovitoj Hrvatskoj (0,92 mg/L) se vrijednosti Mn statistički značajno razlikuju od onih u Slavoniji i hrvatskom Podunavlju (1,19 mg/L).

Udio natrija je bio dvostruko niži u obje kontinentalne regije (10-11 mg/L) u odnosu na udio zabilježen u vinima Hrvatske Istre i Kvarnera, (22,9 mg/L) što je omogućilo i njihovo međusobno razlikovanje.

Obzirom na udio rubidija, Slavonija i hrvatsko Podunavlje (0,88 mg/L) razlikuje se od obje primorske regije (1,22 i 1,23 mg/L), dok se obzirom na vrijednosti kositra obje kontinentalne regije (41,8 i 51,6 mg/L) značajno razlikuju od Dalmacije u kojoj su zabilježene najviše vrijednosti (71,6 mg/L).

Vanadij je omogućio značajno razlikovanje vina Središnje bregovite Hrvatske (80 mg/L) i Dalmacije (88,6 mg/L), a njegov utjecaj je također istaknut kod utvrđivanja zemljopisnoga podrijetla rumunjskih (Dinca i sur., 2016; Geana i sur., 2013) i talijanskih vina (Galgano i sur., 2008).



U Tablici 16. prikazani su omjeri stabilnih izotopa ugljika i kisika i koncentracije elemenata u ispitivanim uzorcima vina izraženi s obzirom na dvanaest zaštićenih oznaka izvornosti.

Rezultati su obrađeni ANOVA-om i post hoc Tukey testom za osam ZOI, u kojima je broj uzoraka bio  $\geq 10$ . Kao i kod prethodnih promatranih parametara, omjer stabilnih izotopa kisika  $\delta^{18}\text{O}$  pokazao se nakon provedene ANOVA-a i post hoc testa kao mjerna veličina s najvećom snagom razlikovanja obzirom na promatrane ZOI.

Međutim, zapažena je veća sposobnost razlikovanja pojedinih ZOI ukoliko oni ne pripadaju istom području, regiji ili zoni, dok promatrani ZOI unutar istih zona nisu pokazali statistički značajne razlike. Tako se primjerice ZOI Zagorje-Međimurje iz kontinentalne zone B ( $\delta^{18}\text{O} = -1,22 \text{ ‰ VSMOW}$ ) značajno razlikuje od četiri ZOI, od kojih su dva u kontinentalnoj zoni CI (Slavonija s  $\delta^{18}\text{O} = 0,47 \text{ ‰ VSMOW}$  i Hrvatsko Podunavlje s  $\delta^{18}\text{O} = 0,60 \text{ ‰ VSMOW}$  u), a dva u primorskom području, odnosno zoni CII (Hrvatska Istra s  $\delta^{18}\text{O} = 3,29 \text{ ‰ VSMOW}$  i Srednja i južna Dalmacija s  $\delta^{18}\text{O} = 4,38 \text{ ‰ VSMOW}$ ). Vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  četiri ZOI iz regije Središnja bregovita Hrvatska, zona B (Moslavina, Plešivica, Prigorje-Bilogora i Zagorje-Međimurje; sr. vr.  $\delta^{18}\text{O}$  od  $-1,22$  do  $0,23 \text{ ‰ VSMOW}$ ) međusobno se ne razlikuju, ali se značajno razlikuju od promatranih primorskih ZOI, zona CII (Hrvatska Istra i Srednja i južna Dalmacija), koji se opet statistički značajno razlikuju i od ZOI iz kontinentalne zone CI (Slavonija i Hrvatsko Podnavlje).

Obzirom na omjere stabilnih izotopa ugljika  $\delta^{13}\text{C}$ , moguće je razlikovati kontinentalne ZOI u odnosu na primorske, uz izuzetak Moslavine ( $\delta^{13}\text{C} = -28,05 \text{ ‰ V-PDB}$ ) kod koje nisu zabilježene značajne razlike u odnosu na Hrvatsku Istru ( $\delta^{13}\text{C} = -27,06 \text{ ‰ V-PDB}$ ). Izmjerene vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  svih promatranih ZOI iz kontinentalnog područja, bez obzira na vinogradarsku zonu, međusobno se ne razlikuju. Nasuprot tome, unutar primorske zone CII značajno se razlikuje Hrvatska Istra od Srednje i južne Dalmacije, koja se također značajno razlikuje od svih ostalih promatranih ZOI i ima najvišu izmjerenu srednju vrijednost  $\delta^{13}\text{C}$  ( $-26,00 \text{ ‰ V-PDB}$ ).

U pogledu elementa aluminijsa postignuto je razlikovanje jedino ZOI Plešivice ( $0,38 \text{ mg/L}$ ) i Hrvatske Istre ( $0,80 \text{ mg/L}$ ). Ovaj je rezultat u skladu s istraživanjem Kruzlicove i suradnika (2013) koji su utvrdili da se s obzirom na udio Al značajno razlikuju vina iz Slavonije, Istre i Vojvodine.

Izmjerene koncentracije bora omogućile su značajno međusobno razlikovanje dva ZOI iz iste kontinentalne regije, odnosno zone CI: Slavonija sa 1,84 mg/L i Hrvatsko Podunavlje sa 3,52 mg/L. ZOI Slavonija se značajno razlikuje i od tri ZOI iz zone B (Zagorje-Međimurje, Plešivica i Moslavina) i dva ZOI iz zone CII (Srednja i južna Dalmacija i Hrvatska Istra). Između ZOI unutar zone CII nisu zabilježene značajne razlike obzirom na sadržaj B, ali je moguće razlikovati ZOI Hrvatska Istra (3,99 mg/L) od četiri kontinentalna ZOI-a: Slavonija iz zone CI te Plešivica, Prigorje-Bilogora i Zagorje-Međimurje iz zone B, u kojima su srednje vrijednosti koncentracija B iznosile od 1,84 do 3,12 mg/L. Između ZOI koji pripadaju kontinentalnim zonama (B i CI) utvrđeno je da se ZOI Slavonija (1,84 mg/L) iz zone CI, značajno razlikuje od Moslavine (3,37 mg/L), Plešivice (3,12 mg/L) i Zagorja-Međimurja (2,74 mg/L) iz zone B.

U pogledu sadržaja barija, postignuto je razlikovanje Slavonije (zona CI, 0,14 mg/L) od Srednje i južne Dalmacije (zona CII, 0,09 mg/L), dok između ostalih ZOI nije utvrđena značajna razlika.

Prema vrijednostima dobivenim za udio kalcija u ispitivanim uzorcima, pokazalo se da se značajno razlikuju samo vina iz ZOI Slavonija (zona CI, 77,9 mg/L) i ZOI Moslavina (102,0 mg/L) i Plešivica (96,9 mg/L) iz zone B, dok u usporedbi s ostalim ZOI nema značajnih razlika.

Prema udjelu kobalta značajno se međusobno razlikuju vina iz Hrvatske Istre (8,5 µg/L) i Srednje i južne Dalmacije (4,6 µg/L), međutim nije utvrđena razlika u odnosu na ostale ZOI.

Obzirom na koncentracije kalija zapažene su značajne razlike ZOI Srednja i južna Dalmacija (zona CII; 928 mg/L) od tri promatrana kontinentalna ZOI, Plešivica (719 mg/L) i Prigorje-Bilogora (658 mg/L) iz zone B te Slavonija (zona CI; 730 mg/L). Moguće je još razlikovati i Prigorje-Bilogoru u odnosu na Hrvatsku Istru (857 mg/L).

Litija je nađeno u najvišoj koncentraciji u Slavoniji (sr. vr. 6,2 µg/L), što se značajno razlikuje od vrijednosti u Hrvatskoj Istri (sr. vr. 3,6 µg/L) i Srednjoj i južnoj Dalmaciji (sr. vr. 3,2 µg/L). U istraživanju Kruzlicove i suradnika (2013) istaknuti su također Ba i Li u razlikovanju Slavonije od ostalih promatranih regija podrijetla (Istra i Vojvodina). Između vina s ostalim ZOI nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Najviša prosječna koncentracija magnezija dobivena je za vina iz Hrvatskog Podunavlja (sr. vr. 98,8 mg/L), pa se tako značajno međusobno razlikuju Hrvatsko Podunavlje i Slavonija (sr. vr. 79,4 mg/L) unutar zone CI te Hrvatsko Podunavlje u odnosu na Plešivicu (sr. vr. 72,1

mg/L) i Prigorje-Bilogoru (sr. vr. 73,3 mg/L) iz zone B te Hrvatsko Podunavlje u odnosu na Hrvatsku Istru (zona CII; 79,9 mg/L). Zapaženo je i značajno razlikovanje ZOI Srednja i južna Dalmacija (zona CII; 89,5 mg/L) od Plešivice i Prigorja-Bilogore (zona B).

U Moslavini i Slavoniji su izmjerene najviše vrijednosti mangana, 1,30 odnosno 1,20 mg/L, što ova dva ZOI čini značajno različitima od Srednje i južne Dalmacije sa 0,71 mg/L Mn, dok u odnosu na ostale ZOI nije utvrđena značajna razlika.

Najviša koncentracija molibdena izmjerena je u ZOI Zagorje-Međimurje (sr. vr. 5,6  $\mu$ /L) što je u odnosu na ZOI Srednja i južna Dalmacija (sr. vr. 3,6  $\mu$ /L) statistički značajno različito, međutim između ostalih promatranih ZOI razlike nisu pronađene.

Prema udjelima natrija moguće je razlikovanje ZOI Slavonije od Hrvatske Istre u kojoj su izmjerene u najviše srednje vrijednosti (sr. vr. 18,7 mg/L) u ZOI sa  $n \geq 10$ . Međutim, u Tablici 16. navedene su i puno više vrijednosti koje su izmjerene u ZOI Hrvatsko primorje (sr. vr. 42,9 mg/L;  $n = 5$ ) i Dalmatinska zagora (sr. vr. 40,8 mg/L;  $n = 7$ ), a koje zbog malog broja uzoraka nisu obrađene Tukey testom. U ova su dva ZOI-a izmjereni također i najveći rasponi ovoga elementa (14,2 - 86,8 mg/L, odnosno 6,8 - 196,5 mg/L), gdje bi se granične vrijednosti mogle smatrati netipičnim („*outlier*“) vrijednostima. Uzrok netipičnih vrijednosti natrija trebalo bi potražiti u posebnostima pojedine lokacije.

Vrijednosti rubidija dobivene za vina iz ZOI Hrvatska Istra (sr. vr. 1,31 mg/L) i Srednja i južna Dalmacija (sr. vr. 1,26 mg/L) značajno se statistički razlikuju od vrijednosti dobivenih u Slavoniji (sr. vr. 0,85 mg/L), dok kod ostalih vina nisu zabilježene statistički značajne razlike.

Obrada rezultata je pokazala i da je s obzirom na udio kositra moguće razlikovati vina sa ZOI Srednja i južne Dalmacija, u kojoj je izmjerena najviša srednja vrijednost (75,7  $\mu$ g/L) od kontinentalnih ZOI: Plešivica (sr. vr. 35,4  $\mu$ g/L), Prigorje-Bilogora (sr. vr. 43,9  $\mu$ g/L), Zagorje-Međimurje (sr. vr. 49,9  $\mu$ g/L) i Slavonija (sr. vr. 42,4  $\mu$ g/L). Unutar kontinentalnog područja zabilježene su značajne razlike vina sa ZOI Plešivica (sr. vr. 35,4  $\mu$ g/L) u odnosu na ZOI Moslavina (sr. vr. 70,9  $\mu$ g/L) i Hrvatsko Podunavlje (sr. vr. 72,0  $\mu$ g/L).

Najviša vrijednost za udio vanadija zabilježena je u vinima sa ZOI Hrvatsko Podunavlje (sr. vr. 98,9  $\mu$ g/L) prema čemu se značajno razlikuje od Slavonije (zona CI; 81,2  $\mu$ g/L) te od Plešivice (76,5  $\mu$ g/L) i Prigorja-Bilogore (76,5  $\mu$ g/L) iz zone B. Ovaj je element istaknut kao značajan za razlikovanje Istre od ostalih promatranih regija podrijetla (Slavonija i Vojvodina) u istraživanju Kruzlicove i suradnika (2013). U ovom se istraživanju također pokazalo da se s

obzirom na udio vanadija Hrvatska Istra (sr. vr. 81,8  $\mu\text{g/L}$ ) značajno razlikuje od Hrvatskog Podunavlja (sr. vr. 98,9  $\mu\text{g/L}$ ).

Statistička obrada podataka je pokazala da među vinima iz odabranih ZOI ne postoji značajna razlika u udjelima As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Sr i Zn.

Ovdje razmotrene mjerne veličine također su u različitim kombinacijama utvrđene kao ključni čimbenici za utvrđivanje zemljopisnoga podrijetla vina i u drugim istraživanjima (da Costa i sur., 2020; Tanabe i sur., 2020; Orellana i sur., 2019; Dinca i sur., 2016; Coetzee i sur., 2014., Geana i sur., 2016a; Geana i sur., 2016b; Kokkinofta i sur., 2014; Dutra i sur., 2013).

#### 5.4 Koeficijenti korelacije među rezultatima mjerenja koncentracija određenih elemenata te omjera stabilnih izotopa ugljika i kisika

Među ispitivanim elementima i omjerima izotopa provedena je korelacijska analiza kako bi se ustanovilo postoji li međusobni odnos između ispitivanih parametara te je izračunat Pearsonov koeficijent korelacije (Tablica 17) koji mjeri jakost i smjer linearne korelacije. Koeficijenti korelacije tumačeni su na sljedeći način:  $r < -0,7$  /  $r > 0,7$  (jaka negativna / pozitivna korelacija);  $-0,7 < r < -0,5$  /  $0,5 < r < 0,7$  (umjerena negativna / pozitivna korelacija);  $-0,5 < r < -0,3$  /  $0,3 < r < 0,5$  (slaba negativna / pozitivna korelacija). Korelacije  $-0,3 < r < 0,3$  smatrane su vrlo slabim (Montgomery, 2001). Značajna korelacija između dvoje ili više mjernih elemenata ukazuje na sličnu sposobnost ulaska u grožđe ili na postojanje istog načina dospijevanja u vino (Kment i sur., 2005).

Makroelement magnezij je snažno pozitivno korelirao s vanadijem ( $r = 0,974$ ,  $p < 0,05$ ) što može biti povezano s onečišćenjem okoliša, odnosno nedostatkom istog u specifičnim područjima zemljopisnoga podrijetla uzoraka, bilo česticama prirodnog ili antropogenog podrijetla (Almeida i Vasconcelos, 2003) te s utjecajem boje vina i načinom proizvodnje, budući da su ova dva elementa statistički značajno prevladavala u crnim vinima, a također i u konvencionalno proizvedenim uzorcima u odnosu na autentične.

Između omjera stabilnih izotopa kisika i ugljika nađena je umjerena pozitivna korelacija ( $r = 0,697$ ,  $p < 0,05$ ) što se može tumačiti utjecajem klime, položaja vinograda i zemljopisnoga podrijetla (Camin i sur., 2015; Christoph i sur., 2007).

Statistički značajne umjerene pozitivne korelacije nađene su između aluminijska i natrija ( $r = 0,530$ ,  $p < 0,05$ ), barija i mangana ( $r = 0,627$ ,  $p < 0,05$ ), kobalta i molibdena ( $r = 0,510$ ,  $p < 0,05$ ), kobalta i olova ( $r = 0,588$ ,  $p < 0,05$ ), kadmija i olova ( $r = 0,590$ ,  $p < 0,05$ ) te magnezija i kositra ( $r = 0,504$ ,  $p < 0,05$ ) što je mogla biti posljedica utjecaja zemljopisnoga podrijetla vina, geokemije tla, klime, položaja vinograda, karakteristika loze (starost trsa, sorta), agrotehničkih mjera (uporaba gnojiva, pesticida, herbicida, fungicida, navodnjavanje, zrelost grožđa kod berbe), načina vinifikacije (postupci maceracije, filtracije, uporaba aditiva) te posuđa i pribora koji se upotrebljava pri proizvodnji, skladištenju i transportu vina (Fan i sur., 2018; Fabani i sur., 2010; Kment i sur., 2005; Almeida i Vasconcelos, 2003; Šeruga i sur., 1998).

Među mjernim veličinama ispitivanim u ovome istraživanju nađeno je i mnoštvo statistički značajnih, ali slabih korelacija (Tablica 17).

Između  $\delta^{18}\text{O}$  i Ca je nađena slaba negativna korelacija ( $-0,37, p < 0,05$ ), razlog koje se najvjerojatnije nalazi u njihovom suprotstavljenom odnosu izraženom obzirom na boju vina (Tablica 10), godinu berbe (Tablica 11) i zemljopisno podrijetlo (Tablica 12). Primjerice, u primorskoj Hrvatskoj je  $\delta^{18}\text{O}$  značajnije viši (sr. vr. 4,09 ‰ VSMOW) nego u kontinentalnoj Hrvatskoj (sr. vr. -0,22 ‰ VSMOW), dok je sa Ca obrnuto, viša je koncentracija u primorskom području (sr. vr. 77,5 mg/L) nego u kontinentalnom (sr. vr. 89,3 mg/L). Na isti su način  $\delta^{18}\text{O}$  i Ca suprotstavljeni i obzirom na boju vina i način proizvodnje.

Statistički značajne slabe korelacije nađene su između aluminijsa s arsenom i kobaltom, bora s kalijem i rubidijem, barija s litijem, kalcija s magnezijem, stroncijem i vanadijem, kadmija s kobaltom i molibdenom, kobalta s kromom, litijem, manganom i natrijem, kroma s molibdenom i olovom, željeza s olovom, litija s manganom, magnezija sa stroncijem, molibdena s olovom, natrija sa stroncijem te vanadija s kositrom i stroncijem. Ostale su korelacije bile vrlo slabe ili ih nije bilo (Tablica 17). U istraživanju Fiket i suradnika (2011) također je ustanovljena korelacija između Al s As, Li i Pb iako snažnija nego u ovome istraživanju, a također i između Li i Co, samo umjerena i negativnog predznaka.

### **5.5 Analiza glavnih komponenata (PCA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranja) hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te ZOI.**

Ispitivanjem hrvatskih vina instrumentalnim tehnikama primijenjenim u ovome istraživanju dobiveni su vrlo složeni i brojni podaci te je stoga bilo nužno primijeniti odgovarajuće kemometrijske metode za odabir i obradu podataka koji pružaju najbolju mogućnost diferencijacije. Jedna od ovdje primijenjenih kemometrijskih metoda koje su unaprijedile primjenu samih analitičkih tehnika detekcije pojedinih analita i postale esencijalni dio identifikacije vina (Sun i sur., 2021) je i PCA. Ovu su klasičnu multivarijatnu metodu u svojim istraživanjima autentičnosti vina koristili brojni istraživači: Orellana i sur. (2019), Fan i sur. (2018), Kokkinofta i sur. (2017), Di Paola-Naranjo i sur. (2011), Smeyers-Verbeke i sur. (2009). Analizom glavnih komponenata (PCA) istraženo je prirodno grupiranje uzoraka hrvatskih vina ovisno o omjerima stabilnih izotopa kisika i ugljika te koncentracijama makro- i mikroelemenata.

Osnovu za interpretaciju glavnih komponenata čine svojstveni vektori (*Eigenvektor*). Njihove vrijednosti su u prvoj glavnoj komponenti relativno ravnomjerno raspoređene po svim izvornim varijablama, a u drugoj glavnoj komponenti dolazi do njihove veće disproporcije. To omogućava izdvajanje izvorne varijable (ili tek nekoliko njih) i pomaže u objašnjavanju i sažimanju ukupne varijabilnosti. Svojstveni vektori imaju pripadajuće svojstvene vrijednosti (*Eigenvalue*). Svojstvena vrijednost najviša je u prvoj komponenti i u svakoj sljedećoj njena vrijednost je niža. Suma svih svojstvenih vrijednosti jednaka je ukupnoj varijanci. Ako je veliki dio varijance (80-90%) protumačen jednom, dvije ili tri glavne komponente, tada te komponente mogu zamijeniti početnih  $p$  varijabli bez većeg gubitka informacija (Montgomery, 2001).

Da bi se reducirao broj varijabli potrebno je pronaći kriterij za zadržavanje onih varijabli koje nose najveći dio informacija sadržanih u polaznom sustavu varijabli. Postoji niz kriterija a neki od njih su (Montgomery, 2001):

- Kaiserov kriterij prema kojemu se uzimaju samo one glavne komponente kojima odgovaraju svojstvene vrijednosti veće od 1;
- uzimaju se samo one glavne komponente kojima odgovaraju svojstvene vrijednosti veće od prosjeka svih svojstvenih vrijednosti;

- uzimaju se samo one glavne komponente koje nose (svaka posebno) unaprijed zadani dio informacija;
- uzimaju se samo one glavne komponente koje nose odnosno zadržavaju (ukupno kao sustav) unaprijed zadani dio informacija;
- broj komponenata se određuje proizvoljno.

Nakon standardizacije originalnih podataka dobivenih u ovome istraživanju, prve tri glavne komponente objasnile su 40,0 % ukupne varijance, od čega je prva glavna komponenta (engl. PC1 – *principal component 1*) obuhvatila 15,6 %, druga glavna komponenta (engl. PC2 – *principal component 2*) 13,6 %, a treća je glavna komponenta (engl. PC3 – *principal component 3*) obuhvatila 10,8 % ukupne varijance (Tablica 18). Preostalih 60 % varijabilnosti raspršeno je između preostale 21 glavne komponente, u padajućem postotku počevši s četvrtom glavnom komponentom (PC4) koja obuhvaća samo 7,4 % varijabilnosti.

U Tablici 18. prikazana je ukupna varijabilnost prvih 7 faktora (PC1-PC7) sa svojstvenim vrijednostima korelacijskog matriksa  $> 1$  i odgovarajućim svojstvenim vektorima za sve uzorke ( $n = 190$ ) dobivenih analizom glavnih komponenata (PCA). Prema Kaiser-Gutmanovom pravilu (Kaiser, 1961) napravljena je selekcija glavnih komponenti koje će biti uključene u daljnjoj analizi. Prema ovom pravilu glavne komponente (F) koje imaju vrijednost veću od 1 zadržavaju se u analizi.

PCA model za cijeli skup podataka validiran je segmentiranom krosvalidacijom primjenom metode slučajnog odabira na 20 segmenata i s devet uzoraka po segmentu. Značajnost varijabli ( $p$ -vrijednost) je procjenjena t-testom. Utvrđeno je da je većina mjernih veličina prema dobivenim  $p$ -vrijednostima statistički značajna ( $p < 0,05$ ) za razlikovanje zemljopisnoga podrijetla (Tablica 18). Samo Cu i Zn nisu pokazali značaj niti u jednoj od testiranih glavnih komponenti (PC1 - PC7). Budući da je kalibracijski skup (svi uzorci,  $n = 190$ ) objasnio samo 65 %, a validacijski skup samo 39 % ukupne varijabilnosti za prvih sedam glavnih komponenata (Tablica 18), zaključeno je da je ukupna nesigurnost modela prilično velika te je stoga potrebno primijeniti dodatni statistički alat multivarijantne analize, GDA.

Budući da su mikrovinificirani uzorci dio hrvatske nacionalne baze izotopa autentičnih vina, PCA je također provedena kako bi se vizualizirao učinak načina proizvodnje na pozicioniranje uzoraka na faktorskim ravninama (Slika 6) i kako bi se utvrdilo mogu li se mikrovinificirana vina koristiti kao reprezentativni skup za ocjenu autentičnosti deklariranog



zemljopisnoga podrijetla komercijalnih vina (konvencionalno proizvedenih) korištenim skupom varijabli (stabilni izotopi i elementi). Uz cjelokupni niz podataka, PCA je izvedena i za mikroviniificirane i komercijalne uzorke odvojeno.

Svojtvene vrijednosti korelacijskog matriksa  $> 1$  (Tablica 19.) pokazale su da se 76% ukupne varijabilnosti objašnjava s prvih osam čimbenika za mikroviniificirane uzorke ( $n = 78$ ), a 71% za skup podataka konvencionalno proizvedenih vina ( $n = 112$ ), odnosno 65 % ukupne varijance za cjelokupni set podataka ( $n = 190$ ). Ova se razlika može objasniti činjenicom da kod mikroviniificiranih uzoraka nema utjecaja elemenata iz proizvodnog procesa, kao što su to Al, B, Cu, K, Fe i Mn (Batukaev i sur., 2016; Catarino i sur., 2008; Álvarez i sur., 2007; Kment i sur., 2005). U ovim je uzorcima razlikovanje zemljopisnoga podrijetla postignuto samo endogenim mjernim veličinama koji prirodno dospijevaju u vino, kao što su to stabilni izotopi (Camin i sur., 2015) i elementi Mg i Sr (Fan i sur., 2018; Álvarez i sur., 2007) te prirodni kontaminanti poput Na (Kment i sur., 2005). Čak je i kod konvencionalno proizvedenih uzoraka analiziranih zasebno pomoću PCA objašnjen veći udio varijabilnosti (71 %) nego kod cjelokupnog skupa (65 %) od 190 uzoraka (Tablica 19). Ovo se također može objasniti utjecajem tehnološkog postupka koji je manje ili više sličan u svim komercijalnim uzorcima. Stoga se može zaključiti da kombinacija uzoraka različitih vrsta proizvodnje dovodi do manjeg udjela objašnjene ukupne varijabilnosti.

Na Slici 6A prikazana je projekcija uzoraka autentičnih i konvencionalno proizvedenih uzoraka zajedno s intervalom pouzdanosti od 95%. Prilično ravnomjerna distribucija autentičnih i konvencionalnih uzoraka na faktorskim ravninama PC1xPC3 ukazuje na isti učinak mjernih veličina (stabilnih izotopa i elemenata) na raspodjelu obje vrste uzoraka. Međutim, može se primijetiti pozicioniranje tri mikroviniificirana uzorka iz zone CII i jednog komercijalnog uzorka iz zone B izvan intervala pouzdanosti od 95%. To bi moglo biti rezultat specifičnih mikroklimatskih i pedoloških karakteristika pojedinih lokacija vinograda, što može biti potkrijepljeno istraživanjem hrvatskih vinogradarskih regija (Karoglan i sur., 2018) gdje je utvrđeno da i zapadne i istočne hrvatske kontinentalne regije imaju raspon od 1.323,9 do 1.652,5 GDD za promatrano klimatološko razdoblje (1988–2017) i pripadaju Winklerovim regijama I i II, odnosno zonama A i B, a ne B i CI. Za primorsku su se Hrvatsku u istom razdoblju vrijednosti kretale između 1.496,5 i 2.483,5 GDD, što je Winkler regija II do V, odnosno zone B, CI, CII i CIII, a ne samo CII prema podjeli sukladno važećoj regulativi (Uredba (EU) 1308/2013 Dodatak I). Razlog izdvajanja jednog konvencionalnog uzorka iz zone B trebalo bi detaljnije istražiti, uzimajući u obzir sve relevantne meteorološke i vinogradarske

parametre kao što su oborine, datum berbe, sorta grožđa te upotrijebiti reprezentativan broj referentnih uzoraka (Christoph i sur., 2003).

Na Slici 6B prikazana je projekcija 24 varijable (omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije 22 elementa) na faktorskim ravninama PC1xPC3 zajedno s Hotellingovim  $T^2$  elipsama koje predstavljaju 50 odnosno 100% modelirane varijance ( $r^2 = 0.5/1$ ), iz čega se vidi da najveći utjecaj na objašnjenu varijabilnost u PC3 imaju varijable  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^{13}\text{C}$  koje su smještene između dviju elipsi.

Na Slici 7 prikazana je projekcija uzoraka i varijabli (omjeri stabilnih izotopa  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i koncentracije 22 elementa) na faktorske ravnine PC1xPC2 (Slika 7A – uzorci; Slika 7C – varijable) i PC1xPC3 (Slika 7B – uzorci; Slika 7D – varijable) s uzorcima istaknutim obzirom na vinogradarske regije. Promatrajući projekciju PC1xPC2 (Slika 7A) nije moguće primijetiti razdvajanje uzoraka, dok je razdvajanje uzoraka kontinentalnih regija (Središnja bregovita Hrvatska, Slavonija i hrvatsko Podunavlje) od primorskih (Hrvatska Istra i Kvarner, Dalmacija) jasno zamjetno u ravninama PC1xPC3 (Slika 7B).

Sve varijable u faktorskoj ravnini PC1 nalazile su se u pozitivnom području (Slika 7C), a varijabla s najvećim doprinosom bio je Co (0,69), dok su Sr, V, Na, Mg, Mn i Al doprinosile PC1 sa svojstvenim vektorima iznad 0,5. Drugoj glavnoj komponenti (PC2) najviše doprinose Pb i Co (0,62 i 0,52) i pozitivnom dijelu te Sn, Mg i V (-0,65, -0,62 i -0,61, redom) u negativnom dijelu faktorske ravnine. Najveći doprinos u PC3 (Slika 7D) imaju omjeri stabilnih izotopa  $\delta^{18}\text{O}$  (0,78) i  $\delta^{13}\text{C}$  (0,74) u pozitivnom dijelu ove faktorske ravnine.

Analiza glavnih komponenata primijenjena je kako bi se utvrdila mogućnost klasifikacije hrvatskih vina s obzirom na zemljopisno podrijetlo od najšire podjele prema najužoj: zemljopisna područja (Slika 8), vinogradarske zone (Slika 9) i regije (Slika 10) te zaštićene oznake izvornosti (Slika 11).

Trodimenzionalna projekcija svih uzoraka na faktorske ravnine (PC1 × PC2 × PC3) ukazuje na zadovoljavajuću separaciju uzoraka obzirom na zemljopisna područja, odnosno kontinentalnu i primorsku Hrvatsku (Slika 8), iako prve tri glavne komponente objašnjavaju samo 40 % ukupne varijabilnosti. Vina iz kontinentalnog područja Hrvatske jasno su se grupirala uglavnom na pozitivnoj strani PC3, dok su vina iz primorske Hrvatske ostala na negativnoj strani PC3.

Na Slici 9 prikazana je projekcija uzoraka na faktorske ravnine PC1 × PC2 × PC3 razlikovanih s obzirom na vinogradarske zone, gdje su vina iz kontinentalnog dijela Hrvatske

(zone B i CI) pozicionirana na pozitivnoj strani PC3, dok su vina iz primorske Hrvatske (zona CII) ostala na negativnoj strani PC3. Međutim, na ovoj projekciji nije moguće jasno međusobno razlikovati dvije kontinentalne zone B i CI na kojima su uzorci raspoređeni bez grupiranja.

Također je i nadalje primjenom PCA od šire podjele prema užoj, odnosno preko vinogradarskih regija (Slika 10) pa do ZOI (Slika 11), bilo sve teže razlikovati uzorke obzirom na zemljopisnu pripadnost. Ipak je na Slici 7 moguće opaziti određeno grupiranje uzoraka iz pojedinih ZOI, kao što su to Moslavina, Plešivica, Zagorje-Međimurje, Slavonija te Srednja i južna Dalmacija, iako se uzorci ZOI-a iz istoga zemljopisnoga područja međusobno preklapaju.

## 5.6 Opća diskriminantna analiza (GDA) za razlikovanje hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo: zemljopisna područja, vinogradarske zone i regije uzgoja te ZOI.

U razvoju modela zemljopisne sljedivosti hrvatskih vina na temelju pokazatelja anorganskih elemenata i stabilnih izotopa u ovome je radu primijenjena još jedna od klasičnih multivarijantnih kemometrijskih metoda, opća diskriminantna analiza (GDA) koja se ubraja u nadzirane metode prepoznavanja uzoraka (Sun i sur., 2021), a u istraživanjima autentičnosti vina na temelju multielementnog sastava i omjera stabilnih izotopa koristili su je istraživači kao što su to primjerice Orellana i sur. (2019), Dinca i sur. (2016) te Dutra i sur. (2013).

GDA analiza je u ovome istraživanju provedena kako bi se odabrale varijable koje su najznačajnije pridonijele diskriminaciji između kontinentalnog i primorskog vinorodnog područja Hrvatske, zatim za vinogradarske zone B, CI i CII te regije (Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Središnja bregovita Hrvatska, Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija) i odabrane ZOI.

Diskriminantna analiza ima široku primjenu u situacijama gdje je primarni cilj identifikacija grupe kojoj neki promatrani objekt pripada (Montgomery, 2001), a ovdje je to pripadnost uzoraka vina određenom zemljopisnom području. Ova metoda uključuje i predviđanje stupnja uspješnosti klasifikacije objekata u grupe, kao i pronalaženje one varijable (ili više njih) koja najviše pridonosi klasifikaciji. Pouzdanost diskriminantne analize može se testirati raznim multivarijantnim testovima, a obradi ovdje dobivenih podataka korišten je Wilk's Lambda (Wilk's  $\lambda$ ) test. Najprije su izračunati Wilk's Lambda koeficijenti koji predstavljaju značaj snage razlikovanja u modelu. Wilk's Lambda vrijednosti mogu biti u rasponu od 1 (nema klasifikacijskog značaja) do 0 (savršeno klasificiranje), što upućuje na mogućnost razlikovanja unaprijed odabranih grupa prema potvrđenim svojstvima. U analizi je Wilk's Lambda koeficijent izražen i putem F-vrijednosti, koja je obrnuto proporcionalna ovom koeficijentu, pa je i razlikovna snaga varijable veće što je F-vrijednost viša. Za sve varijable kojima je p-vrijednost manja od odabrane razine pouzdanosti (ovdje je to  $p < 0,05$ ), možemo zaključiti da odgovarajuća funkcija dobro objašnjava članstvo u skupini (Montgomery, 2001). Wilk's Lambda test proveden je na uzorcima hrvatskih vina obzirom na zemljopisno podrijetlo i to za zemljopisna područja, vinogradarske zone, regije i odabrane ZOI (Tablica 20).

U primijenjenim se testovima u pogledu razlikovanja zemljopisnih područja (kontinentalnog i primorskog) pokazalo da vjerojatnost greške zaključivanja o statističkoj značajnosti razlike između dva područja ne prelazi 5 % za sedam promatranih mjernih veličina.

Najznačajniji je bio omjer stabilnih izotopa kisika  $\delta^{18}\text{O}$  (Wilk's  $\lambda = 0,594$ ;  $F = 112,702$ ), pa zatim Co (Wilk's  $\lambda = 0,924$ ;  $F = 13,493$ ), Rb (Wilk's  $\lambda = 0,945$ ;  $F = 9,520$ ), K (Wilk's  $\lambda = 0,947$ ;  $F = 9,268$ ), Sn (Wilk's  $\lambda = 0,951$ ;  $F = 8,489$ ), Li (Wilk's  $\lambda = 0,960$ ;  $F = 6,939$ ) i  $\delta^{13}\text{C}$  (Wilk's  $\lambda = 0,976$ ;  $F = 4,087$ ). Preostali elementi nisu pokazali statističku značajnost za klasificiranje uzoraka vina prema zemljopisnim područjima.

Izračunati Wilk's Lambda koeficijenti s pripadajućim F-vrijednostima za varijable obzirom na vinogradarske zone (B, CI i CII) bili su, kao i za zemljopisna područja, najznačajniji  $\delta^{18}\text{O}$  (Wilk's  $\lambda = 0,573$ ;  $F = 61,108$ ), Co (Wilk's  $\lambda = 0,895$ ;  $F = 9,619$ ), i Rb (Wilk's  $\lambda = 0,917$ ;  $F = 7,449$ ). Zatim su u silaznom redosljedu slijedili Li (Wilk's  $\lambda = 0,928$ ;  $F = 6,379$ ), K (Wilk's  $\lambda = 0,945$ ;  $F = 4,816$ ) i Sn (Wilk's  $\lambda = 0,949$ ;  $F = 4,403$ ).

Wilk's Lambda test je također pokazao da je za razlikovanje vinogradarskih regija (Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Središnja bregovita Hrvatska, Hrvatska Istra i Kvarner, Dalmacija) najznačajniji omjer stabilnih izotopa kisika  $\delta^{18}\text{O}$  (Wilk's  $\lambda = 0,571$ ;  $F = 12,795$ ), iza kojega u opadajućem redosljedu dolaze Sn (Wilk's  $\lambda = 0,741$ ;  $F = 5,931$ ), Fe (Wilk's  $\lambda = 0,820$ ;  $F = 3,732$ ), Cu (Wilk's  $\lambda = 0,823$ ;  $F = 3,658$ ), Cr (Wilk's  $\lambda = 0,848$ ;  $F = 3,045$ ) i K (Wilk's  $\lambda = 0,856$ ;  $F = 2,866$ ).

Statistički značajna klasifikacija uzoraka prema ZOI dobivena je samo za dvije ispitivane mjerne veličine. I ovdje je najznačajniji bio omjer stabilnih izotopa kisika  $\delta^{18}\text{O}$  (Wilk's  $\lambda = 0,549$ ;  $F = 4,599$ ) i uz njega Sn (Wilk's  $\lambda = 0,593$ ;  $F = 3,847$ ).

Diskriminacija uzoraka je ispitana s obzirom na zemljopisno podrijetlo obradom rezultata u dvije razine: koristeći sve uzorke ( $n = 190$ ) kao model i koristeći autentične uzorke ( $n = 78$ ) kao model. Kako bi se testirale mogućnosti diskriminacijskog modela u smislu udjela ispravno klasificiranih uzoraka, provedena je unakrsna validacija. Cilj je bio verificirati model procijenjen iz referentnog skupa podataka, ali ne klasificiranjem uzoraka na temelju njih samih. U tu svrhu je provedena krosvalidacija koristeći rezultate autentičnih uzoraka kao model (referentni skup podataka), a rezultate konvencionalno proizvedenih uzoraka kao nepoznate uzorke kojima treba prema validacijskom modelu odrediti pripadnost obzirom na zemljopisno podrijetlo.

Klasifikacijska matrica dobivena GDA-om, koja pokazuje udio točno klasificiranih uzoraka (%) u odnosu na definirana zemljopisna područja, zone podrijetla, regije uzogija i odabrane ZOI (dva iz svake regije) prikazana je u Tablici 21. zajedno s rezultatima krosvalidacije.

Obradom cijelog skupa podataka (sva vina zajedno) GDA je ispravno klasificirala 97,9 % uzoraka prema zemljopisnim područjima, dok je zasebno za autentična vina postignuta ispravna klasifikacija za sve uzorke (100,0 %). Koristeći autentične uzorke kao referentni set, krosvalidacijom je ispravno klasificirano 84,8 % konvencionalno proizvedenih vina.

Primjenom GDA na uzorke podijeljene obzirom na vinogradarske zone, dobivena je točna klasifikacija za ukupno 86,3 % uzoraka cijelog skupa, gdje je u CII zonu točno raspoređeno 100 % uzoraka. Diskriminacija je u modelu s autentičnim uzorcima bila uspješna za 94,9 % uzoraka te također smješta 100,0 % autentičnih uzoraka ispravno u zonu CII. U postupku krosvalidacije je prosječno 66,1 % konvencionalnih uzoraka točno prepoznato, i to ponovno najviše u zoni CII (79,4 %), dok je nešto slabija točnost klasifikacije u dvjema kontinentalnim zonama B (67,9 %) i CI (44,0 %). Uzrok ovom slabijem udjelu točno prepoznatih uzoraka može biti u neusklađenosti između službenih granica vinogradarskih zona (Slika 1, Uredba (EU) 1308/2013 Dodatak I) i stvarnog stanja objavljenog u istraživanju Karoglan i suradnika (2018), koji su utvrdili da unutar zone B postoji manje područje koje odgovara Winkler regiji I (zona A) i da Slavonija i hrvatsko Podunavlje spadaju u Winkler regiju II, koja je zona B, a ne CI prema službenom sustavu podjele EU. Ovo također može objasniti odstupanje nekih uzoraka izvan deklarirane zone i to naročito ako se to uzme u obzir da je najdominantniji obilježivač zemljopisnoga podrijetla ustanovljen u ovom istraživanjem  $\delta^{18}\text{O}$ , na koji također snažno utječe klima (Camin i sur., 2015; Christoph i sur., 2015).

Diskriminacija uzoraka obzirom na vinogradarske regije postignuta je ispravno za prosječno 70,0 % uzoraka u modelu sa svim vinima, a 93,6 % u modelu s autentičnim uzorcima. I ovdje je prema modelu 100,0 % autentičnih uzoraka iz regije Dalmacija ispravno klasificirano. Koristeći autentične uzorke kao referentni set, krosvalidacijom je ispravno klasificirano prosječno 53,6 % konvencionalno proizvedenih vina, od čega u najviše u Središnjoj i bregovitoj Hrvatskoj (60,4 %).

GDA je provedena i za uzorke podijeljene obzirom na odabраниh šest ZOI i to po dvije za svaku vinogradarsku zonu te se ukupan skup podataka sastojao od 141 uzorka u kojem je ispravno klasificirano 93,0 % uzoraka. U grupi autentičnih uzoraka je postignuta ispravna klasifikacija za 100,0 % uzoraka iz ZOI Hrvatsko Podunavlje, Hrvatska Istra te Srednja i južna Dalmacija, a prosječno 93,0 %. Obzirom na ZOI je u postupku krosvalidacije točno prepoznato prosječno samo 34,5 % konvencionalnih uzoraka, od čega najviše u ZOI Hrvatsko Podunavlje (75,0 %), a najmanje u ZOI Slavonija (17,6 %).

Na Slici 12. prikazana je projekcija uzoraka ( $n = 190$ ) razlikovanih obzirom na regiju u ravnini definiranoj koeficijentima tri standardizirane kanoničke funkcije (Root 1, Root 2 i Root 3). Vidljivo je da su uzorci iz kontinentalnog područja Hrvatske (zone B i CI) smješteni uglavnom na negativnoj strani funkcije 1 (Root 1), dok su vina iz kontinentalne Hrvatske (zona CII) grupirana na pozitivnoj strani. Primorsko područje Hrvatske, odnosno zona CII podijeljeno je na dvije uzgojne regije, Hrvarsku Istru i Kvarner te Dalmaciju. Ove dvije regije su vrlo dobro odijeljene funkcijom Root 2 i to tako da je Hrvatska Istra i Kvarner u pozitivnom dijelu, a Dalmacija u negativnom. Kontinentalne regije Središnju bregovitu Hrvatsku (zona B) i Slavoniju i hrvatsko Podunavlje (zona CI) također međusobno odjeljuje funkcija Root 2, iako u manjoj mjeri.

Na Slici 13. prikazana je projekcija uzoraka ( $n = 141$ ) razlikovanih obzirom na ZOI u ravnini definiranoj koeficijentima tri standardizirane kanoničke funkcije (Root 1, Root 2 i Root 3). U analizi su korišteni uzorci odabranih ZOI, i to po dva iz svake zone te je pozicioniranje uzoraka prikazano na Slici 7, ovdje još preciznije definirano. Najbolje su međusobno razdvojeni zemljopisno najudaljeniji ZOI (Hrvatska Istra od Srednje i južne Dalmacije), dok se kod onih susjednih, koji pripadaju istoj zoni kontinentalnog područja može primijetiti određeno preklapanje, iako uzorci pojedinih ZOI uglavnom tvore dobro definirane grupe, npr. ZOI Hrvatsko Podunavlje ili ZOI Prigorje-Bilogora sa 84,6 %, odnosno 70,0 % točno klasificiranih uzoraka u GDA klasifikacijskoj matrici (Tablica 21).

Kod GDA je, kao i kod PCA, također opaženo, da su najbolja razlikovanja postignuta za najširu podjelu (prema zemljopisnim područjima), a nešto slabija za najužu podjelu (prema ZOI). Osim toga, bez obzira na način podjele prema zemljopisnom podrijetlu, GDA je najuspješnije razlikovala autentične uzorke koji su korišteni kao referentni set podataka za model, a nešto manje kod primjene cjelokupnih podataka za sve uzorke u modelu, a još manje kod konvencionalnih uzoraka korištenih kao krosvalidacijski set.

Analiza bioklimatskih indeksa u hrvatskom vinogradarskim regijama (Karoglan i sur., 2018) omogućila bi točnije tumačenje izotopnih i multielementnih podataka dobivenih u ovom istraživanju u smislu alata za određivanje zemljopisnoga podrijetla hrvatskih vina.

Nadalje, trenutna administrativna podjela vinogradarskih zona utvrđena zakonodavstvom EU-a (Uredba (EU) 1308/2013) definira granice i uvjete za određene enološke postupke (dozvoljeno pojačavanje radi povećanja prirodne alkoholne jakosti) u pojedinim vinogradarskim zonama gdje su klimatski uvjeti su to učinili neophodnim. Posljedično, postavlja se pitanje tumačenja izotopnih podataka iz banke podataka o vinu EU-a u odnosu na nedozvoljeni dodatak šećera te ukazuje na potrebu povećanja broja reprezentativnih uzoraka i stručnu evaluaciju istih.

Nedostaci postojećeg sustava zoniranja hrvatskih vinograda također su objavljeni u istraživanju Omazić i suradnika (2018) u kojem su prikazane projekcije daljnjeg zagrijavanja i sušenja klime u Hrvatskoj, čineći postojeći sustav vinogradarskog zoniranja još manje primjerenim.

Ovo je istraživanje pokazalo da su stabilni izotopi kisika i ugljika najvrjedniji pokazatelji diskriminacije vina prema hrvatskim vinogradarskim područjima i zonama, a posebno u kombinaciji s analizom multielementnog sastava, koja je ovdje prvi put provedena za hrvatska vina.

Rezultati ukazuju na to da predložena metodologija predstavlja vrijedan alat koji bi mogao predstavljati dodatnu vrijednost hrvatskim vinima naglašavajući važnost autentičnosti vina, osobito u svjetlu rastuće turističke industrije i sve veće svijesti o značaju vinarstva kao gospodarske djelatnosti.



## **6. ZAKLJUČCI**

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika između hrvatskih vina iz različitih vinorodnih područja, vinogradarskih zona, regija i podregija s pripadajućim oznakama izvornosti te utvrditi pokazatelje specifične za definirano zemljopisno podrijetlo, čime će se omogućiti pouzdanija autentifikacija vina. U 190 ispitivanih uzoraka vina određene su prosječne vrijednosti, rasponi i standardna odstupanja za udjele Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Rb, Sn, Sr, V i Zn te za omjere stabilnih izotopa ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Radom su obuhvaćeni uzorci vina iz kontinentalnog i primorskog područja Hrvatske, iz tri vinogradarske zone (B, CI i CII), četiri regije uzgoja (Središnja bregovita Hrvatska, Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija) i dvanaest ZOI.

Na osnovu provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Multielementarna tehnika spektrometrije optičke emisije induktivno spregnute plazme ICP-OES prikladna je za određivanje odabranih makro- i mikroelemenata u vinu, a metode masene spektrometrije omjera izotopa prikladne su za određivanje omjera stabilnih izotopa ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  u etanolu vina i kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  u vodi vina.
2. Statistička obrada rezultata ANOVA-om i post hoc Tukey testom pokazala je da se vina međusobno statistički značajno razlikuju obzirom na boju, godinu berbe, način proizvodnje i zemljopisno podrijetlo.
3. Analiza glavnih komponenata (PCA) pokazala je da se na osnovu ispitivanih mjernih veličina, vina diferenciraju s obzirom na zemljopisno podrijetlo, pri čemu su najznačajniji pokazatelji bili stabilni izotopi kisika  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i ugljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .
4. Pomoću PCA je postignuto jasno razdvajanje vina kontinentalnih regija (Središnja bregovita Hrvatska ili zona B, Slavonija i hrvatsko Podunavlje ili zona CI), od primorskih regija (Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija ili zona CII). Međutim, nije bilo moguće jasno međusobno razlikovati dvije kontinentalne regije ili zone B i CI u kojima su uzorci raspoređeni bez grupiranja.
5. Pomoću PCA primijenjene na vina podijeljena prema ZOI moguće je opaziti određeno grupiranje uzoraka iz pojedinih ZOI, kao što su to Moslavina, Plešivica, Zagorje-Međimurje, Slavonija te Srednja i južna Dalmacija, iako se uzorci ZOI-a iz istoga zemljopisnog područja međusobno preklapaju.

6. PCA je pokazala da se mikroviniificirana vina mogu koristiti kao reprezentativni skup za ocjenu autentičnosti deklariranog zemljopisnog podrijetla komercijalnih vina (konvencionalno proizvedenih) primjenom ispitivanih stabilnih izotopa i elemenata.

7. Opća diskriminantna analiza (GDA) pokazala koje su mjerne veličine najznačajnije pridonijele razlikovanju vina obzirom na zemljopisno podrijetlo. Bile su to za:

- o kontinentalno i primorsko područje Hrvatske:  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, Rb, K, Sn, Li i  $\delta^{13}\text{C}$ ,
- o vinogradarske zone (B, CI i CII):  $\delta^{18}\text{O}$ , Co, Rb, Li, K i Sn,
- o vinogradarske regije (Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Središnja bregovita Hrvatska, Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija):  $\delta^{18}\text{O}$ , Sn, Fe, Cu, Cr i K,
- o odabrane zaštićene oznake izvornosti (ZOI):  $\delta^{18}\text{O}$  i Sn.

8. Pomoću GDA je postignuto jasno razdvajanje vina kontinentalnih regija (Središnja bregovita Hrvatska ili zona B, Slavonija i hrvatsko Podunavlje ili zona CI), od primorskih (Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija ili zona CII). Postignuto je i vrlo dobro međusobno razdvajanje dvije primorske regije, Hrvatske Istre i Kvarnera od Dalmacije. Kontinentalne regije Središnja bregovita Hrvatska (zona B) i Slavonija i hrvatsko Podunavlje (zona CI) također su međusobno odijeljene, iako u manjoj mjeri.

9. Pomoću GDA su najbolje međusobno razdvojeni zemljopisno najudaljeniji ZOI (Hrvatska Istra od Srednje i južne Dalmacije), dok se kod onih susjednih, koji pripadaju istoj zoni kontinentalnog područja može primijetiti određeno preklapanje, iako uzorci pojedinih ZOI uglavnom tvore dobro definirane grupe, npr. ZOI Hrvatsko Podunavlje ili ZOI Prigorje-Bilogora.

10. Ovo je istraživanje pokazalo da su stabilni izotopi kisika i ugljika najvrjedniji pokazatelji autentičnosti vina prema zemljopisnom podrijetlu, a posebno u kombinaciji s analizom multielementnog sastava, koja je ovdje prvi put provedena za hrvatska vina.

11. Rezultati ukazuju na to da predložena metodologija predstavlja vrijedan alat koji bi mogao predstavljati dodatnu vrijednost hrvatskim vinima naglašavajući važnost autentičnosti vina, osobito u svjetlu rastuće turističke industrije i sve veće svijesti o značaju vinarstva kao gospodarske djelatnosti.

## **7. LITERATURA**

Aghemo, C., Albertino, A., Gobetto, R., Spanna, F. (2011) Correlation between isotopic and meteorological parameters in Italian wines: a local-scale approach. *J Sci Food Agric*, **91**(11), 2088-2094. [doi:10.1002/jsfa.4510](https://doi.org/10.1002/jsfa.4510)

Almeida, C.M., Vasconcelos, M.T. (2003) Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *J Agric Food Chem*, **51**(16), 4788-4798. [doi:10.1021/jf034145b](https://doi.org/10.1021/jf034145b)

Álvarez, M., Moreno, I. M., Jos, Á., Cameán, A. M., Gustavo González, A. (2007) Differentiation of 'two Andalusian DO 'fino' wines according to their metal content from ICP-OES by using supervised pattern recognition methods. *Microchemical Journal*, **87**(1), 72-76. [doi:10.1016/j.microc.2007.05.007](https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.05.007)

ASTM E203-16 (2016) Standard Test Method for Water Using Volumetric Karl Fischer Titration, ASTM International, West Conshohocken, PA.

Aydın, I., Yüksel, U., Güzel, R., Ziyadanoğulları, B., Aydın, F. (2010) Determination of trace elements in Turkish wines by ICP-OES and HG-ICP-OES. *Atomic Spectroscopy* **31**, 97–71.

Batukaev, A., Magomadov, A., Sushkova, S., Minkina, T., Bauer, T. (2016) Influence of boron fertilization on productivity of grape plants. *BIO Web of Conferences*, **7**. [doi:10.1051/bioconf/20160701030](https://doi.org/10.1051/bioconf/20160701030)

Bender, M. M. (1971) Variations in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochemistry*, **10**(6), 1239-1244.

Benes, R. P., Reininger, F., del Bianco, A. (2008) Method for the spectroscopic determination of ethanol concentration in an aqueous sample. Patent Anton Paar® US 6,690,015; AT 406711.

Blesić, M., Drmać, M., Batinić, K., Spaho, N., Smajić Murtić, M., Zele, M. (2017) Levels of selected metals in wines from different Herzegovinian viticultural localities. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, **9**(1), 1-10. [doi:10.17508/cjfst.2017.9.1.01](https://doi.org/10.17508/cjfst.2017.9.1.01)

Bong, Y. S., Shin, W. J., Gautam, M. K., Jeong, Y. J., Lee, A. R., Jang, C. S., Lim, Y. P., Chung, G. S., Lee, K. S. (2012) Determining the geographical origin of Chinese cabbages using multielement composition and strontium isotope ratio analyses. *Food Chemistry*, **135**(4), 2666-2674. [doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.045](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.045)

Boss, C. B., Freden, K. J. (2004) *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (Third edition ed.) Perkin-Elmer Corporation. [https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE\\_Concepts-of-ICP-OES-Booklet.pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE_Concepts-of-ICP-OES-Booklet.pdf)

Cabrera-Vique, C., Teissedre, P. L., Cabanis, M. T., Cabanis, J. C. (2000) Manganese Determination in Grapes and Wines From Different Regions of France. *Am. J. Enol. Viticult.*, **51**(2), 103-107.

Cabrita, M. J., Martins, N., Barrulas, P., Garcia, R., Dias, C. B., Pérez-Álvarez, E. P., Costa Freitas, A. M., Garde-Cerdán, T. (2018) Multi-element composition of red, white and palhete amphora wines from Alentejo by ICPMS. *Food Control*, **92**, 80-85. [doi:10.1016/j.foodcont.2018.04.041](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.041)

Camin, F., Dordevic, N., Wehrens, R., Neteler, M., Delucchi, L., Postma, G., Buydens L. (2015) Climatic and geographical dependence of the H, C and O stable isotope ratios of Italian wine. *Anal Chim Acta*, **853**, 384-390. [doi:10.1016/j.aca.2014.09.049](https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.049)

Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R., van der Veer, G., van Ruth, S. M. (2013) Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**(1), 12-28. [doi:10.1002/jsfa.5914](https://doi.org/10.1002/jsfa.5914)

Catarino, S., Madeira, M., Monteiro, F., Rocha, F., Curvelo-Garcia, A. S., de Sousa, R. B. (2008) Effect of Bentonite Characteristics on the Elemental Composition of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(1), 158-165. [doi:10.1021/jf0720180](https://doi.org/10.1021/jf0720180)

Charlton, A. J., Wrobel, M. S., Stanimirova, I., Daszykowski, M., Grundy, H. H., Walczak, B. (2010) Multivariate discrimination of wines with respect to their grape varieties and vintages. *European Food Research and Technology*, **231**(5), 733-743. [doi:10.1007/s00217-010-1299-2](https://doi.org/10.1007/s00217-010-1299-2)

Christoph, N., Rossmann, A., Voerkelius, S. (2003) Possibilities and limitations of wine authentication using stable isotope and meteorological data, data banks and statistical tests. Part 1: Wines from Franconia and Lake Constance 1992 to 2001. *Mitteilungen Klosterneuburg*. **53**, 23-40.

Christoph, N., Barátossy, G., Kubanović, V., Kozina, B., Rossmann, A., Schlicht, C., Voerkelius S. (2004) Possibilities and limitations of wine authentication using stable isotope

ratio analysis and traceability. Part 2: Wines from Hungary, Croatia, and other European countries. *Mitteilungen Klosterneiburg*, **54**, 144-158.

Christoph, N., Rossmann, A., Schlicht, C., Voerkelius, S. (2006) Wine Authentication Using Stable Isotope Ratio Analysis: Significance of Geographic Origin, Climate, and Viticultural Parameters. In *Authentication of Food and Wine* (pp. 166-179) [doi:10.1021/bk-2007-0952.ch011](https://doi.org/10.1021/bk-2007-0952.ch011)

Christoph, N., Hermann, A., Wachter H. (2015) *25 Years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Union – Review and outlook* 38<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine (Part 1), [https://www.bio-conferences.org/articles/bioconf/pdf/2015/02/bioconf\\_oiv2015\\_02020.pdf](https://www.bio-conferences.org/articles/bioconf/pdf/2015/02/bioconf_oiv2015_02020.pdf)

Chua, L. S., Abdul-Rahaman, N. L., Sarmidi, M. R., Aziz, R. (2012) Multi-elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia. *Food Chemistry*, **135**(3), 880-887. [doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.106](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.106)

Clark, A. C., Wilkes, E. N., Scollary, G. R. (2015) Chemistry of copper in white wine: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **21**(3), 339-350. [doi:10.1111/ajgw.12159](https://doi.org/10.1111/ajgw.12159)

Coetzee, P. P., Steffens, F. E., Eiselen, R. J., Augustyn, O. P., Balcaen L., Vanhaecke, F. (2005) Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. *J Agric Food Chem*, **53**(13), 5060-5066. [doi:10.1021/jf048268n](https://doi.org/10.1021/jf048268n)

Coetzee, P. P., van Jaarsveld, F.P., Vanhaecke, F. (2014) Intraregional classification of wine via ICP-MS elemental fingerprinting. *Food Chem*, **164**, 485-492. [doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.027](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.027)

Costa, R. C. C., Cardoso, M. I., Araujo, A. N. (2000) Metals Determination in Wines by Sequential Injection Analysis With Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Am. J. Enol. Viticult.*, **51**(2), 131-136.

Craig, H. (1961) Isotopic Variations in Meteoric Waters. *Science* **133**, 1702-1703.

Cubero-Leon, E., Peñalver, R., Maquet, A. (2014) Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, **60**, 95-107. [doi:10.1016/j.foodres.2013.11.041](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.041)

Cugnetto, A., Santagostini, L., Rolle, L., Guidoni, S., Gerbi, V., Novello, V. (2014) Tracing the “terroirs” via the elemental composition of leaves, grapes and derived wines in cv Nebbiolo (*Vitis vinifera* L.) *Scientia Horticulturae*, **172**, 101-108. [doi:10.1016/j.scienta.2014.03.055](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.055)

Curvelo-Garcia, A. (1988a) *Controlo da qualidade dos vinhos. Química enológica. Métodos analíticos* (I. d. V. e. d. Vinho, Ed. 1st ed.) Pentaedro.

Curvelo-Garcia, A. (1988b) *Controlo de qualidade dos vinhos. Possibilidades atuais e perspectivas futuras*.

Čačić, J., Renko, S., Tratnik, M., Gajdoš Kljusurić, J., Čačić, D., Kovačević, D. (2011) Wine with geographical indication – awareness of Croatian consumers. *British Food Journal*, **113**(1), 66-77. [doi:10.1108/00070701111097349](https://doi.org/10.1108/00070701111097349)

da Costa, N. L., Ximenez, J. P. B., Rodrigues, J. L., Barbosa, F., Barbosa, R. (2020) Characterization of Cabernet Sauvignon wines from California: determination of origin based on ICP-MS analysis and machine learning techniques. *European Food Research and Technology*, **246**(6), 1193-1205. [doi:10.1007/s00217-020-03480-5](https://doi.org/10.1007/s00217-020-03480-5)

Delegirana uredba Komisije (EU) 2018/273 od 11. prosinca 2017. o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu programa odobravanja sadnje vinove loze, registra vinograda, pratećih dokumenata i certificiranja, ulaznog i izlaznog registra, obveznih izjava, obavijesti i objave informacija o kojima se obavještava te o dopuni Uredbe (EU) br. 1306/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu odgovarajućih kontrola i kazni, o izmjeni uredaba Komisije (EZ) br. 555/2008, (EZ) br. 606/2009 i (EZ) br. 607/2009 i o stavljanju izvan snage Uredbe Komisije (EZ) br. 436/2009 i Delegirane uredbе Komisije (EU) 2015/560 (2018) *Službeni list Europske unije* **L 58**, Bruxelles.

Delhaize, E., Gruber, B. D., Ryan, P. R. (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters*, **581**(12), 2255-2262. [doi:10.1016/j.febslet.2007.03.057](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.057)

Dettmer, K., Aronov, P. A., Hammock, B. D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, **26**(1), 51-78. [doi:10.1002/mas.20108](https://doi.org/10.1002/mas.20108)



DHZ - Državni hidrometeorološki zavod (2015) Godišnji izvještaj. Klimatološki podaci. <[https://meteo.hr/klima\\_e.php?section=klima\\_podaci&param=k2\\_1&Godina=2015](https://meteo.hr/klima_e.php?section=klima_podaci&param=k2_1&Godina=2015)>.

Pristupljeno 15. svibnja 2020.

DHZ - Državni hidrometeorološki zavod (2016) Godišnji izvještaj. Klimatološki podaci. <[https://meteo.hr/klima\\_e.php?section=klima\\_podaci&param=k2\\_1&Godina=2016](https://meteo.hr/klima_e.php?section=klima_podaci&param=k2_1&Godina=2016)>

Pristupljeno 15. svibnja 2020.

di Martino, M., Domenico, C., di Giacomo, F., Civitarese, C., Cichelli A. (2013) ICP-MS analysis for the characterization of the origins of wines. *Agro FOOD Industry Hi Tech*, **24**(1), 30-34.

Di Paola-Naranjo, R. D., Baroni, M. V., Podio, N. S., Rubinstein, H. R., Fabani, M. P., Badini, R. G., Inga, M., Ostera, H. A., Cagnoni, M., Gallegos, E., Gautier, E., Peral-Garcia, P., Hoogewerff, J., Wunderlin, D. A. (2011) Fingerprints for main varieties of argentinean wines: terroir differentiation by inorganic, organic, and stable isotopic analyses coupled to chemometrics. *J Agric Food Chem*, **59**(14), 7854-7865. [doi:10.1021/jf2007419](https://doi.org/10.1021/jf2007419)

Dinca, O. R., Ionete, R. E., Costinel, D., Geana, I. E., Popescu, R., Stefanescu, I., Radu G. L. (2016) Regional and Vintage Discrimination of Romanian Wines Based on Elemental and Isotopic Fingerprinting. *Food Analytical Methods*, **9**(8), 2406-2417. [doi:10.1007/s12161-016-0404-y](https://doi.org/10.1007/s12161-016-0404-y)

Dordevic, N., Camin, F., Marianella, R. M., Postma, G. J., Buydens, L. M. C., Wehrens, R. (2013) Detecting the addition of sugar and water to wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **19**(3), 324-330. [doi:10.1111/ajgw.12043](https://doi.org/10.1111/ajgw.12043)

Dunbar, J. (1982) A Study of the Factors Affecting the  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  Ratio of the Water of Wine. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. **174**, 355-359.

Durante, C., Bertacchini, L., Cocchi, M., Manzini, D., Marchetti, A., Rossi, M. C., Sighinolfi, S., Tassi, L. (2018) Development of  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  maps as targeted strategy to support wine quality. *Food Chemistry*, **255**, 139-146. [doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.084](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.084)

Dutra, S. V., Adami, L., Marcon, A. R., Carnieli, G. J., Roani, C. A., Spinelli, F. R., Leonardelli, S., Vanderlinde, R. (2013) Characterization of wines according the geographical origin by

analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values. *Food Chem*, **141**(3), 2148-2153. [doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.106](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.106)

Đurđić, S., Pantelić, M., Trifković, J., Vukojević, V., Natić, M., Tešić, Ž., Mutić J. (2017) Elemental composition as a tool for the assessment of type, seasonal variability, and geographical origin of wine and its contribution to daily elemental intake. *RSC Advances*, **7**(4), 2151-2162. [doi:10.1039/c6ra25105f](https://doi.org/10.1039/c6ra25105f)

eAmbrosia (2021) The EU geographical indications register <<https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register>>. Pristupljeno 20.5.2021.

EC - European Commission (2018) Monthly Summary of Articles on Food Fraud and Adulteration. <<https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/jrc-food-fraud-summary-april-2018.pdf>>. Pristupljeno 23.3.2020.

EPA - Environmental Protection Agency (2006) Data Quality Assessment: Statistical Methods for Practitioners EPA QA/G-9S. <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/g9s-final.pdf>>. Pristupljeno 23. ožujka 2020.

Eschnauer, H. (1982) Trace Elements in Must and Wine: Primary and Secondary Contents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **33**(4), 226-230.

Eschnauer, H. (1986) Spurenelemente und Ultra-Spurenelemente in Wein. *Naturwissenschaften*, **73**(6), 281-290. [doi:10.1007/bf00451473](https://doi.org/10.1007/bf00451473)

Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2014) Eurachem, UK.

Fabani, M. P., Arrúa, R. C., Vázquez, 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 Chemistry*, **119**(1), 372-379. [doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.085](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.085)

Fan, S., Zhong, Q., Gao, H., Wang, D., Li, G., Huang, Z. (2018) Elemental profile and oxygen isotope ratio ( $\delta^{18}\text{O}$ ) for verifying the geographical origin of Chinese wines. *Journal of Food and Drug Analysis*, **26**(3), 1033-1044. [doi:10.1016/j.jfda.2017.12.009](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.12.009)

Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., Hubick, K. T. (1989) Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**(1), 503-537. [doi:10.1146/annurev.pp.40.060189.002443](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443)

Fiket, Ž., Mikac, N., Kniewald, G. (2011) Arsenic and other trace elements in wines of eastern Croatia. *Food Chemistry*, **126**(3), 941-947. [doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.091](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.091)

Fischer, K. (1935) Neues Verfahren zur maßanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern. *Angewandte Chemie*, **48**(26), 394-396. [doi:10.1002/ange.19350482605](https://doi.org/10.1002/ange.19350482605)

Fischer, U., Löchner, M., Wolz, S. (2006) Red Wine Authenticity: Impact of Technology on Anthocyanin Composition. In *Authentication of Food and Wine* (pp. 239-253) [doi:10.1021/bk-2007-0952.ch016](https://doi.org/10.1021/bk-2007-0952.ch016)

Flanagan, L. B. (1993) Environmental and biological influences on the stable oxygen and hydrogen isotopic composition of leaf water. In Ehleringer JR, Hall AE, F. GD (Eds.), *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations* (pp. 71-90) Academic Press,.

Frías, S., Pérez Trujillo, J. P., Peña, E. M., Conde, J. E. (2001) Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. *European Food Research and Technology*, **213**(2), 145-149. [doi:10.1007/s002170100344](https://doi.org/10.1007/s002170100344)

Frías, S. (2003) Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta*, **59**(2), 335-344. [doi:10.1016/s0039-9140\(02\)00524-6](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(02)00524-6)

Galani-Nikolakaki, S., Kallithrakas-Kontos, N., Katsanos, A. A. (2002) Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *Science of The Total Environment*, **285**(1-3), 155-163. [doi:10.1016/s0048-9697\(01\)00912-3](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(01)00912-3)

Galgano, F., Favati, F., Caruso, M., Scarpa, T., Palma, A. (2008) Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to provenance. *LWT - Food Science and Technology*, **41**(10), 1808-1815. [doi:10.1016/j.lwt.2008.01.015](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.01.015)

García-Rodríguez, G., Hernández-Moreno, D., Soler, F., Pérez-López, M. (2011) Characterization of "Ribera del Guadiana" and "Mérida" Spanish red wines by chemometric

techniques based on their mineral contents. *Journal of Food and Nutrition Research*, **50**, 41-49.

Geana, I., Iordache, A., Ionete, R., Marinescu, A., Ranca, A., Culea, M. (2013) Geographical origin identification of Romanian wines by ICP-MS elemental analysis. *Food Chemistry*, **138**(2-3), 1125-1134. [doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.104](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.104)

Geana, E. I., Marinescu, A., Iordache, A. M., Sandru, C., Ionete, R. E., Bala, C. (2014) Differentiation of Romanian Wines on Geographical Origin and Wine Variety by Elemental Composition and Phenolic Components. *Food Analytical Methods*, **7**(10), 2064-2074. [doi:10.1007/s12161-014-9846-2](https://doi.org/10.1007/s12161-014-9846-2)

Geana, E. I., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O. R., Stefanescu, I., Ionete, R. E., Bala, C. (2016a) Verifying the red wines adulteration through isotopic and chromatographic investigations coupled with multivariate statistic interpretation of the data. *Food Control*, **62**, 1-9. [doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.003)

Geana, E. I., Sandru, C., Stanciu, V., Ionete, R. E. (2016b) Elemental Profile and  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  Isotope Ratio as Fingerprints for Geographical Traceability of Wines: an Approach on Romanian Wines. *Food Analytical Methods*, **10**(1), 63-73. [doi:10.1007/s12161-016-0550-2](https://doi.org/10.1007/s12161-016-0550-2)

Georgiou, C. A., Danezis, G. P. (2015) Elemental and isotopic mass spectrometry. In Y. Pico (Ed.), *Advanced mass spectrometry for food safety and quality* (pp. 131–243) Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier.

Ghidini, S., Ianieri, A., Zanardi, E., Conter, M., Boschetti, T., Iacumin, P., Bracchi, P. (2006) Stable isotopes determination in food authentication: A review. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*, **26**, 193-204.

Gilbert, A., Silvestre, V., Segebarth, N., Tcherkez, G., Guillou, C., Robins, R. J., Akoka, S., Remaud, G. S. (2011) The intramolecular  $^{13}\text{C}$ -distribution in ethanol reveals the influence of the CO<sub>2</sub>-fixation pathway and environmental conditions on the site-specific  $^{13}\text{C}$  variation in glucose. *Plant, Cell & Environment*, **34**(7), 1104-1112. [doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02308.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02308.x)

González, A., Llorens, A., Cervera, M. L., Armenta, S., de la Guardia, M. (2009) Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chemistry*, **112**(1), 26-34. [doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.043)

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. *European Food Research and Technology*, **219**(1), 97-104. [doi:10.1007/s00217-004-0919-0](https://doi.org/10.1007/s00217-004-0919-0)

Hall, R. D. (2006) Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, **169**(3), 453-468. [doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x)

Hanžek, M., Sušić, G. (2019) Croatian Wine Tourism from the Winery Perspective: The Case of the Grand Cro. In (pp. 669-684) [doi:10.31410/tmt.2019.669](https://doi.org/10.31410/tmt.2019.669)

Hermann, A. (2014) Icewine Authentication by 18O Measurements. *American Journal of Enology and Viticulture*, **65**(4), 499–503. [doi:10.5344/ajev.2014.13143](https://doi.org/10.5344/ajev.2014.13143)

Holmberg. (2010) Wine fraud. *International Journal of Wine Research*. [doi:10.2147/ijwr.S14102](https://doi.org/10.2147/ijwr.S14102)

IAEA/UNESCO - International Atomic Energy Agency and United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (2001) Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle: Principles and applications <[http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/documents/global\\_cycle/Environmental%20Isotopes%20in%20the%20Hydrological%20Cycle%20Vol%201.pdf](http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/documents/global_cycle/Environmental%20Isotopes%20in%20the%20Hydrological%20Cycle%20Vol%201.pdf)>.

Pristupljeno 23. ožujka 2020.

HRN EN ISO/IEC 17025:2017, Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija, Hrvatski zavod za norme.

Ivanova-Petropulos, V., Wiltsche, H., Stafilov, T., Stefova, M., Motter, H., Lankmayr E. (2013) Multielement analysis of Macedonian wines by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) and inductively coupled plasma–optical emission spectrometry (ICP-OES) for their classification. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **32**(2), 265-281.

Jakubowski, N., Brandt, R., Stuewer, D., Eschnauer, H., Görtges, S. (1999) Analysis of wines by ICP-MS: Is the pattern of the rare earth elements a reliable fingerprint for the provenance? *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **364**, 424-428. [doi:10.1007/s002160051361](https://doi.org/10.1007/s002160051361)

Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., Storchmann, K. (2005) Climate Change and Global Wine Quality. *Climatic Change*, **73**(3), 319-343. [doi:10.1007/s10584-005-4704-2](https://doi.org/10.1007/s10584-005-4704-2)

Kaiser, H. (1961) A note on Guttman's lower bound for the number of common factor. *British Journal of Statistical Psychology*, **14**, 1-2. [doi:10.1111/j.2044-8317.1961.tb00061.x](https://doi.org/10.1111/j.2044-8317.1961.tb00061.x)

Karoglan, M., Telišman Prtenjak, M., Šimon, S., Osrečak, M., Anić, M., Karoglan Kontić, J., Andabaka, Ž., Tomaz, I., Grisogono, B., Belušić, A., Marki, A., Prša, Ž., Omazić, B., Jelić, D., Vešenaj, Ž., Vučetić, V., Počakal, D., Petric, I. V., Leder, R., Prša, I. (2018) Classification of Croatian winegrowing regions based on bioclimatic indices. *E3S Web of Conferences*, XII Congreso Internacional Terroir, Zaragoza, **50**, 01032, str.1-5. [doi:10.1051/e3sconf/20185001032](https://doi.org/10.1051/e3sconf/20185001032)

Kment, P., Mihaljevič, M., Ettler, V., Šebek, O., Strnad, L., Rohlová, L. (2005) Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry*, **91**(1), 157-165. [doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.010](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.010)

Kokkinofta, R., Economidou, N., Tzioni, E., Damianou, K., Poulli, K., Savvidou, C., Charalambos, L., Kanari, P. (2014) Studies on the Authenticity of Local Wines by Spectroscopic and Chemometric Analysis. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **8**, 101-107.

Kokkinofta, R., Fotakis, C., Zervou, M., Zoumpoulakis, P., Savvidou, C., Poulli, K., Louka, C., Economidou, N., Tzioni, E., Damianou, K., Loupasaki, S., Kefalas, P. (2017) Isotopic and Elemental Authenticity Markers: a Case Study on Cypriot Wines. *Food Analytical Methods*, **10**(12), 3902-3913. [doi:10.1007/s12161-017-0959-2](https://doi.org/10.1007/s12161-017-0959-2)

Kolesnov, A., Aurand, J. M., Zenina, M., Tsimbalaev, S., Davlyatshin, D., Ganin, M., Anikina, N., Agafonova, N., Egorov, E., Guguchkina, T., Prakh, A., Antonenko, M. (2017) *Scientific study of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C carbon and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O oxygen stable isotopes biological fractionation in grapes in the Black Sea, Don Basin and the Western Caspian regions* 40th OIV Congress Bulgaria.

Košir, I. J., Kocjančič, M., Ogrinc, N., Kidrič, J. (2001) Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). *Analytica Chimica Acta* **429**(2):195-206. [doi: 10.1016/s0003-2670\(00\)01301-5](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)01301-5)

Kruzlicova, D., Fiket, Ž., Kniewald, G. (2013) Classification of Croatian wine varieties using multivariate analysis of data obtained by high resolution ICP-MS analysis. *Food Research International*, **54**(1), 621-626. [doi:10.1016/j.foodres.2013.07.053](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.053)

Lachenmeier, D. W. (2016) Advances in the Detection of the Adulteration of Alcoholic Beverages Including Unrecorded Alcohol. In G. Downey (Ed.), *Advances in Food Authenticity Testing* (pp. 565-584) Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [doi:10.1016/b978-0-08-100220-9.00021-7](https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100220-9.00021-7)

Lanyon, D., Cass, A., Hansen, D. (2004) The effect of soil properties on vine performance. *CSIRO Land and Water Technical Report No. 34/04*.

Lara, R., Cerutti, S., Salonia, J., Olsina, R. A., Martinez, L. (2005) Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **43**, 293-297. [doi:10.1016/j.fct.2004.10.004](https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.10.004)

Larcher, R., Nicolini, G. (2001) Survey of 22 mineral elements in wines from Trentino (Italy) using ICP-OES. *Italian Journal of Food Science*, **13**(2), 233-241.

Laursen, K., Schjoerring, J. K., Kelly, S., Husted, S. (2014) The advantages and the limitations of multi-element and stable-isotope analysis based on atomic spectroscopy in authenticating organic plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **59**, 73-82.

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. *Journal of Food and Nutrition Research*, **54**(3), 229-238.

Leder, R., Petric, I. V., Jusup, J., Banović, M. (2021) Geographical Discrimination of Croatian Wines by Stable Isotope Ratios and Multielemental Composition Analysis. *Frontiers in Nutrition*, **8**(12), 1-14. [doi:10.3389/fnut.2021.625613](https://doi.org/10.3389/fnut.2021.625613)

Lide, D. R. (2002) *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (B. Raton, Ed. 83 ed.) CRC Press.

Louw, L., Roux, K., Tredoux, A., Tomic, O., Naes, T., Nieuwoudt, H. H., van Rensburg, P. (2009) Characterization of Selected South African Young Cultivar Wines Using FT-MIR Spectroscopy, Gas Chromatography, and Multivariate Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(7), 2623-2632. [doi:10.1021/jf8037456](https://doi.org/10.1021/jf8037456)

Lukić, I., Horvat, I. (2017) Differentiation of Commercial PDO Wines Produced in Istria (Croatia) According to Variety and Harvest Year Based on HS-SPME-GC/MS Volatile Aroma

Compounds Profiling. *Food Technology and Biotechnology*, **55**(1). doi:10.17113/ftb.55.01.17.4861.

Luykx, D. M., van Ruth, S. M. (2008) An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, **107**(2), 897-911. doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.038

LZMK - Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2018) Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. <<http://www.enciklopedija.hr>> Pristupljeno 17. prosinca 2020.

Magdas, D. A., Cuna, S., Cristea, G., Ionete, R. E., Costinel, D. (2012) Stable isotopes determination in some Romanian wines. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **48**(2), 345-353. doi:10.1080/10256016.2012.661731

Marengo, E., Aceto, M. (2003) Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. *Food Chemistry*, **81**(4), 621-630. doi:10.1016/s0308-8146(02)00564-2

Martin, G. J., Brun, S. (1987) Applications de la risonance magnetique nucleaire du deuterium au controle des mouts, des mouts concentres, du sucre de raisin et des vins (R.M.N.-F.I.N.S./S.N.I.F.-N.M.R.). *Bulletin de l'OIV*, 671–672, 132–145.

Martin, G. J., Martin, M. L. (1981) Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative <sup>2</sup>H NMR. *Tetrahedron Letters*, **22**(36), 3525-3528. doi:doi:10.1016/S0040-4039(01)81948-1

Martin, G. J., Martin, M. L. (2003) Climatic significance of isotope ratios. *Phytochemistry Reviews*, **2**(1-2), 179-190. doi:10.1023/B:PHYT.0000004187.23624.dd

Martin, G. J., Martin, M. L., Mabon, F., Michon, M. J. (1982) Identification of the origin of natural alcohols by natural abundance hydrogen-2 nuclear magnetic resonance. *Analytical Chemistry*, **54**(13), 2380-2382. doi:10.1021/ac00250a057

Martin, G. J., Mazure, M., Jouitteau, C., Martin, Y. L., Aguilé, L., Allain, P. (1999) Characterization of the Geographic Origin of Bordeaux Wines by a Combined Use of Isotopic and Trace Element Measurements. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**(4), 409-417. <https://www.ajevonline.org/content/ajev/50/4/409.full.pdf>



- McKinnon, A., Scollary, G. R. (1997) Size fractionation of metals in wine using ultrafiltration. *Talanta*, **44**(9), 1649-1658. [doi:10.1016/s0039-9140\(97\)00070-2](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(97)00070-2)
- McKinnon, A. J., Cattrall, R. W., Scollary, G. R. (1992) Aluminum in wine - Its measurement and identification of major sources. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, 166-170.
- Mena, C., Cabrera, C., Lorenzo, M. L., López, M. C. (1996) Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: possible sources of contamination. *Science of The Total Environment*, **181**(3), 201-208. [doi:10.1016/0048-9697\(95\)05010-8](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)05010-8)
- Miedico, O., Iammarino, M., Tarallo, M., Chiaravalle, A. E. (2017) Application of inductively coupled plasma–mass spectrometry for trace element characterisation of equine meats. *International Journal of Food Properties*, **20**(12), 2888-2900. [doi:10.1080/10942912.2016.1256304](https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1256304)
- Miloš, M., Petric, I. V., Jusup, J., Šimon, S., Leder, R., Banović, M. (2018) Preparation of wine for the analysis by analytical techniques: NMR, IRMS and ICP-OES – method validation. 9<sup>th</sup> International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Croatian Society of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, str. 103-107.
- Minnaar, P. P., Rohwer, E. R., Booysse, M. (2005) Investigating the Use of Element Analysis for Differentiation between the Geographic Origins of Western Cape Wines. *South African Journal of Enology & Viticulture*, **26**(2), 95-105. [doi:10.21548/26-2-2124](https://doi.org/10.21548/26-2-2124)
- Moreno, I., Gonzalezweller, D., Gutierrez, V., Marino, M., Camean, A., Gonzalez, A., Hardisson, A. (2007) Differentiation of two Canary DO red wines according to their metal content from inductively coupled plasma optical emission spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry by using Probabilistic Neural Networks. *Talanta*, **72**(1), 263-268. [doi:10.1016/j.talanta.2006.10.029](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.10.029)
- Mullins, M. G., Bouquet, A., Williams, L. E. (2007) *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press. <https://books.google.hr/books?id=2zOBPwAACAAJ>
- Nicolini, G., Larcher, R., Pangrazzi, P., Bontempo, L. (2004) Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis-Geilweilerhof*, **43**, 41-45.

OIV - International Organisation of Vine and Wine (2021a) State of the world vitivinicultural sector in 2020. <<https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-vitivinicultural-sector-in-2020.pdf>> Pristupljeno 20.5.2021.

OIV - International Organisation of Vine and Wine (2021b) Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts. *International Organisation of Vine and Wine*. <<https://www.oiv.int/public/medias/7788/oiv-compendium-of-international-methods-of-analysis-vol2-en.pdf>>. Pristupljeno 20.5.2021.

OIV - International Organisation of Vine and Wine (2021c) International Code of Oenological Practices, OIV Code Sheet. *International Organisation of Vine and Wine* (2021/01) <<https://www.oiv.int/public/medias/7713/en-oiv-code-2021.pdf>>. Pristupljeno 20.5.2021.

Omazić, B., Telišman Prtenjak, M., Prša, I., Belušić Vozila, A., Vučetić, V., Karoglan, M., Karoglan Kontić, J., Prša, Ž., Anić, M., Šimon, S., Güttler, I. (2020) Climate change impacts on viticulture in Croatia: Viticultural zoning and future potential. *International Journal of Climatology*, **40**(13):5634-55. doi: 10.1002/joc.6541.

Orellana, S., Johansen, A. M., Gazis, C. (2019) Geographic classification of U.S. Washington State wines using elemental and water isotope composition. *Food Chemistry: X*, **1**, 100007. [doi:10.1016/j.fochx.2019.100007](https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100007)

Oroian, M. (2015) Romanian white wine authentication based on mineral content. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **21**(1), 9-13.

Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) *Methods for analysis of musts and wines* (2nd ed.) New York, (etc.): John Wiley & Sons.

Palade, M., Popa, M. (2014) Wine traceability and authenticity – a literature review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XVIII, 226-233.

Paneque, P., Álvarez-Sotomayor, M. T., Clavijo, A., Gómez, I. A. (2010) Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing. *Microchemical Journal*, **94**(2), 175-179. [doi:10.1016/j.microc.2009.10.017](https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.10.017)

Pérez Trujillo, J. P., Conde, J. E., Pérez Pont, M. L., Câmara, J., Marques, J. C. (2011) Content in metallic ions of wines from the Madeira and Azores archipelagos. *Food Chemistry*, **124**(2), 533-537. [doi:10.1016/j.foodchem.2010.06.065](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.065)

Philipp, C., Horacek, M., Nauer, S., Reitner, H., Rosner, A., Jaborek, C., Guillou, C., Patzl-Fischerleitner, E., Eder, R. (2018) Isotope data of Austrian wines: Evaluation of their potential as a means of identification of geographic origin and vintage year. *Mitteilungen Klosterneuburg*, **68**(2):120-140.

Pietrzak, U., McPhail, D. C. (2004) Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, **122**(2-4), 151-166. [doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.005](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.005)

Pisano, P., Silva, M., Olivieri, A. (2015) Anthocyanins as markers for the classification of Argentinean wines according to botanical and geographical origin. Chemometric modeling of liquid chromatography–mass spectrometry data. *Food Chemistry*, **175**, 174-180. [doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.124](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.124)

Provedbena uredba Komisije (EU) 2018/274 od 11. prosinca 2017. o utvrđivanju pravila za primjenu Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu programa odobravanja nasada vinove loze, certificiranja, ulaznog i izlaznog registra, obveznih izjava i obavijesti te Uredbe (EU) br. 1306/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu odgovarajućih provjera i o stavljanju izvan snage Provedbene uredbe Komisije (EU) 2015/561 (2018) *Službeni list Europske unije* **L 58**, Bruxelles

Plotka-Wasyłka, J., Frankowski, M., Simeonov, V., Polkowska, Ż., Namieśnik, J. (2018) Determination of Metals Content in Wine Samples by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Molecules*, **23**(11):1-11 [doi:10.3390/molecules23112886](https://doi.org/10.3390/molecules23112886)

Raco, B., Dotsika, E., Poutoukis, D., Battaglini, R., Chantzi, P. (2015) O–H–C isotope ratio determination in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. *Food Chemistry*, **168**, 588-594. [doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.043)

Ramachandran, V., D'Souza, T. (1998) Plant Uptake of Cadmium, Zinc, and Manganese in Soils Amended with Sewage Sludge and City Compost. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **61**, 347-354. [doi:10.1007/s001289900769](https://doi.org/10.1007/s001289900769)

Rastija, V., Srećnik, G., Medić Šarić, M. (2009) Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, **115**(1):54-60. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.071.

Reid, L., O'Donnell, C., Downey, G. (2006) Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 344-353. doi:10.1016/j.tifs.2006.01.006

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 Control*, **64**:157-64. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.12.035.

Robards, K., Worsfold, P. (1991) Cadmium: toxicology and analysis. A review. *The Analyst*, **116**(6) doi:10.1039/an9911600549

Roca, P., Horacek, M., Hola, M., Tobolkova, B., Kolar, K., Vaculovic, T., Mikes, O., Marosanovic, B., Philipp, C., Lojovic, M., Polovka, M., Belajova, E., Jankura, E. (2019) Investigation of geographic origin of wine from border regions: Results from investigation of two vintages. *BIO Web of Conferences*, *42<sup>nd</sup> World Congress of Vine and Wine*, **15**, doi:10.1051/bioconf/20191502039

Roden, J., Lin, G., Ehleringer, J. (2000) A mechanistic model for interpretation of hydrogen and oxygen isotope ratios in tree-ring cellulose - Evidence and implications for the use of isotopic signals transduced by plants. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **64**. doi:10.1016/S0016-7037(99)00195-7

Rodrigues, S. M., Otero, M., Alves, A. A., Coimbra, J., Coimbra, M. A., Pereira, E., Duarte, A. C. (2011) Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**(4-5), 548-562. doi:10.1016/j.jfca.2010.12.003

Römisch, U., Jäger, H., Capron, X., Lanteri, S., Forina, M., Smeyers-Verbeke, J. (2009) Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part III: multivariate discrimination and classification methods. *European Food Research and Technology*, **230**, 31-45. doi:10.1007/s00217-009-1141-x

Rusjan, D., Strlič, M., Pucko, D., Šelih, V., Korošec-Koruza, Z. (2006) Vineyard soil characteristics related to content of transition metals in a sub-Mediterranean winegrowing region of Slovenia. *Geoderma*, **136**(3-4) pp. 930-936. ISSN 00167061. [doi:10.1016/j.geoderma.2006.06.014](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.06.014)

Schlesier, K., Fauhl-Hassek, C., Forina, M., Cotea, V., Kocsi, E., Schoula, R., van Jaarsveld, F., Wittkowski, R. (2009) Characterisation and determination of the geographical origin of wines. Part I: overview. *European Food Research and Technology*, **230**, 1-13. [doi:10.1007/s00217-009-1140-y](https://doi.org/10.1007/s00217-009-1140-y)

Schmidt, H.-L. (2003) Fundamentals and systematics of the non-statistical distributions of isotopes in natural compounds. *Die Naturwissenschaften*, **90**, 537-552. [doi:10.1007/s00114-003-0485-5](https://doi.org/10.1007/s00114-003-0485-5)

Seidel, U., Jans, K., Hommen, N., Ipharraguerre, I. R., Lüersen, K., Birringer, M., Rimbach, G. (2020) Lithium Content of 160 Beverages and Its Impact on Lithium Status in *Drosophila melanogaster*. *Foods*, **9**(6). [doi:10.3390/foods9060795](https://doi.org/10.3390/foods9060795)

Sen, I., Tokatli, F. (2013) Characterization and Classification of Turkish Wines Based on Elemental Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, **65**(1), 134-142. [doi:10.5344/ajev.2013.13081](https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13081)

Smeyers-Verbeke, J., Jäger, H., Lanteri, S., Brereton, P., Jamin, E., Fauhl-Hassek, C., Forina, M., Römisch, U. (2009) Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part II: descriptive and inductive univariate statistics. *European Food Research and Technology*, **230**, 15-29. [doi:10.1007/s00217-009-1142-9](https://doi.org/10.1007/s00217-009-1142-9)

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., Mafra, I. (2017) A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **16**(5), 1072-1100. [doi:10.1111/1541-4337.12278](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12278)

Son, H. S., Kim, K. M., Berg, F., Hwang, G. S., Park, W. M., Lee, C. H., Hong, Y. S. (2008) <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 8007-8016. [doi:10.1021/jf801424u](https://doi.org/10.1021/jf801424u)

Son, H. S., Hwang, G. S., Ahn, H. J., Park, W. M., Lee, C. H., Hong, Y. S. (2009a) Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of <sup>1</sup>H NMR spectroscopic data. *Food Research International*, **42**(10), 1483-1491. [doi:10.1016/j.foodres.2009.08.006](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.006)

Son, H. S., Hwang, G. S., Kim, K. M., Ahn, H. J., Park, W. M., Van Den Berg, F., Hong, Y. S., Lee, C. H. (2009b) Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using <sup>1</sup>H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(4), 1481-1490. [doi:10.1021/jf803388w](https://doi.org/10.1021/jf803388w)

Stanziani, A. (2007) Negotiating Innovation in a Market Economy: Foodstuffs and Beverages Adulteration in Nineteenth-Century France. *Enterprise and Society*, **8**, 375-412. [doi:10.1017/S1467222700005899](https://doi.org/10.1017/S1467222700005899)

Suhaj, M., Koreňovská, M. (2006) Distribution of selected elements as wine origin markers in the wine-making products. *Czech Journal of Food Sciences*, **24**, 232-240. [doi:10.17221/3319-cjfs](https://doi.org/10.17221/3319-cjfs)

Sun, X., Zhang, F., Gutiérrez-Gamboa, G., Ge, Q., Xu, P., Zhang, Q., Fang, Y., Ma, T. (2021) Real wine or not? Protecting wine with traceability and authenticity for consumers: chemical and technical basis, technique applications, challenge, and perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-27. [doi:10.1080/10408398.2021.1906624](https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1906624)

Šebečić, B., Pavišić-Strache, D., Vedrina-Dragojević, I. (1998) Trace elements in wine from Croatia. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **94**, 341-344.

Šelih, V. S., Šala, M., Drgan, V. (2014) Multi-element analysis of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia. *Food Chemistry*, **153**, 414-423. [doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.081](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.081)

Šeruga, M., Grgić, J., Grgić, Z., Šeruga, B. (1998) Aluminium content of some Croatian wines. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **94**, 336-340.

Šperkova, J., Suchanek, M. (2005) Multivariate classification of wines from different Bohemian regions (Czech Republic) *Food Chemistry*, **93**(4), 659-663. [doi:10.1016/j.foodchem.2004.10.044](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.044)

Tanabe, C. K., Nelson, J., Boulton, R. B., Ebeler, S. E., Hopfer, H. (2020) The Use of Macro, Micro, and Trace Elemental Profiles to Differentiate Commercial Single Vineyard Pinot noir Wines at a Sub-Regional Level. *Molecules*, **25**(11). doi: 10.3390/molecules25112552

Teissedre, P. L., Łobiński, R., Cabanis, M. T., Szpunar-Łobińska, J., Cabanis, J. C., Adams, F. C. (1994) On the origin of organolead compounds in wine. *Science of The Total Environment*, **153**(3), 247-252. doi:10.1016/0048-9697(94)90204-6

Teissèdret, P. L., Krosniak, M., Portet, K., Gasc, F., Waterhouse, A. L., Serrano, J. J., Cabanis, J. C., Cros, G. (1998) Vanadium levels in French and Californian wines: Influence on vanadium dietary intake. *Food Additives & Contaminants*, **15**(5), 585-591. doi:10.1080/02652039809374685

Thiel, G., Danzer, K. (1997) Direct analysis of mineral components in wine by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **357**(5), 553-557. doi:10.1007/s002160050212

Uredba (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007 (2013) *Službeni list Europske unije* **L 347**, Bruxelles.

Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane (2002) *Službeni list Europske unije* **L 031**, Bruxelles.

Vaclavik, L., Lacina, O., Hajslova, J., Zweigenbaum, J. (2011) The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Analytica Chimica Acta*, **685**, 45-51. doi:10.1016/j.aca.2010.11.018

van der Linde, G., Fischer, J. L., Coetzee, P. P. (2010) Multi-element Analysis of South African Wines and their Provenance Soils by ICP-MS and their Classification according to Geographical Origin using Multivariate Statistics. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **31**(2), 143-153. doi:10.21548/31-2-1411

Vargas-Bello-Pérez, E., Gómez-Cortés, P., Geldsetzer-Mendoza, C., Morales, M. S., Toro-Mujica, P., Fellenberg, M. A., Ibáñez, R. A. (2018) Authentication of retail cheeses based on fatty acid composition and multivariate data analysis. *International Dairy Journal*, **85**, 280-284. [doi:10.1016/j.idairyj.2018.06.011](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.011)

Voica, C., Dehelean, A., Pamula, A. (2009) Method validation for determination of heavy metals in wine and slightly alcoholic beverages by ICP-MS. *Journal of Physics: Conference Series*, **182**, 12-36. [doi:10.1088/1742-6596/182/1/012036](https://doi.org/10.1088/1742-6596/182/1/012036)

Vystavna, Y., Rushenko, L., Diadin, D., Klymenko, O., Klymenko, M. (2014) Trace metals in wine and vineyard environment in southern Ukraine. *Food Chemistry*, **146**, 339-344. [doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.091](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.091)

Winkler, A., Cook, A., Kliwere, W. M., Lider, L. A. (1974) *General Viticulture* (L. Cerruti, Ed.) University of California Press, Berkeley.

Wolfender, J. L., Rudaz, S., Choi, Y., Kim, H. (2013) Plant Metabolomics: From Holistic Data to Relevant Biomarkers. *Current medicinal chemistry*, **20**(8), 1056–1090. [doi:10.2174/092986713805288932](https://doi.org/10.2174/092986713805288932)

Zakon o vinu (2019) *Narodne Novine* **32**, Zagreb.

Zerbinati, O., Balduzzi, F., Dell’Oro, V. (2000) Determination of lithium in wines by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, **881**(1-2), 645-650. [doi:10.1016/S0021-9673\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00261-2)

Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., Nury, F. (1999) *Wine Analysis and Production*. Kluwer Academic/Plenum. [doi:10.1007/978-1-4757-6967-8](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6967-8)

Žurga, P., Vahčić, N., Pasković, I., Banović, M., Staver, M. M. (2019) Croatian Wines from Native Grape Varieties Have Higher Distinct Phenolic (Nutraceutical) Profiles than Wines from Non-Native Varieties with the Same Geographic Origin. *Chemistry & Biodiversity*, **16**(8) [doi:10.1002/cbdv.201900218](https://doi.org/10.1002/cbdv.201900218)



## **8. ŽIVOTOPIS**

Renata Leder rođena je 2. kolovoza 1972. godine u Zagrebu, gdje završava osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 1997. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, studij prehrambena tehnologija smjer nutricionizam. Na istom fakultetu 2007. godine završava poslijediplomski magistarski studij prehrambena tehnologija, smjer prehrambeno inženjerstvo. Nakon završetka studija zapošljava se kao nastavnik stručnih predmeta u Prehrambeno tehnološkoj školi u Zagrebu, a 2000. godine kao analitičar u Hrvatskom zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo. Od 2010. godine rukovoditeljica je Odjela za fizikalno kemijska ispitivanja Centra za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu.

U razdoblju od 2008. do 2012. godine bila je licencirani trener TrainMiC® (*Training in Metrology in Chemistry*) edukacijskog programa za module: „Međulaboratorijske usporedbe“ i „Izbor i uporaba referentnih materijala“. Od 2015. godine sudjeluje kao ekspert u radnim skupinama za izotopna mjerenja, izotopnu banku podataka vina EU i nove analitičke metode Zajedničkog istraživačkog centra Europske Komisije.

Objavila je 2 znanstvena rada klasificirana u a1 skupinu (Web of Science Core Collection) i 2 znanstvena rada klasificirana u a2 skupinu te brojne radove u zbornicima znanstvenih i stručnih skupova. Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima te znanstvenim projektima, od kojih su najznačajniji „VITCLIC - Vinogradarstvo i klimatske promjene na području Hrvatske“ i „Uloga svojstava tla i okolišnih uvjeta u elementarnom i izotopnom sastavu masline: temelj za zemljopisnu sljedivost maslinova ulja“.

Stalno se educira kroz stručne seminare, tečajeve, trajne edukacije i kongrese, pa je tako 2008. godine prošla specijalizaciju iz područja vinogradarstva, vinarstva i kontrole kvalitete vina u sklopu Cochran stipendije koju dodjeljuje Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država. U organizaciji Zajedničkog istraživačkog centra Europske Komisije usavršavala se u području mjeriteljstva u kemiji (2007. godina, Geel, Belgija), u području utvrđivanja autentičnosti proizvoda primjenom IRMS tehnike (2009. godina, Ispra, Italija) te u području mjerenja stabilnih izotopa i njihove primjene u kontroli autentičnosti vina (2015. godina, Bordeaux, Francuska).

## **IZJAVA O IZVORNOSTI**

Ja, Renata Leder, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima osim onih navedenih u doktorskom radu. Ujedno, osobno sam sudjelovala u multidisciplinarnom timu u pripremi i provedbi istraživanja, kao analitičar u provedbi fizikalno kemijskih analiza, te u obradi i analizi dobivenih rezultata.

---