Nutraceutičke i antinutraceutičke komponente u hrvatskim crnim vinima sa zaštićenom oznakom izvornosti

Žurga, Paula

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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:159:488263

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Paula Žurga

NUTRACEUTIČKE I ANTINUTRACEUTIČKE KOMPONENTE U HRVATSKIM CRNIM VINIMA SA ZAŠTIĆENOM OZNAKOM IZVORNOSTI

DOKTORSKI RAD

Mentorice:

izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica Staver

prof. dr. sc. Nada Vahčić

Zagreb, 2019



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Paula Žurga

NUTRACEUTICAL AND ANTINUTRACEUTICAL COMPONENTS OF CROATIAN RED WINES WITH PROTECTED DESIGNATION OF ORIGIN

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Ph. D. Mladenka Malenica Staver, Associate Professor

Ph. D. Nada Vahčić, Full Professor

Zagreb, 2019

Tema doktorskog rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu održanoj dana 31. siječnja 2017. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 23. svibnja 2017. godine.

Ovaj rad izrađen je u Odsjeku za zajedničke analitičke tehnike Zdravstveno-ekološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.

Mentorice: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica Staver

prof. dr. sc. Nada Vahčić

Izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica Staver zaposlena je na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci od 2009. godine pa do danas, a od travnja 2019. godine izabrana je u nastavno zvanje izvanredni profesor.

Aktivno se bavi znanstveno-istraživačkim radom. Objavila je 18 znanstvenih radova iz kategorije a1, 2 rada u časopisima indeksiranim u sekundarnim bazama podataka (a2), i 2 cjelovita rada s kongresa s međunarodnom recenzijom (a3), te je sudjelovala na velikom broju nacionalnih i međunarodnih kongresa. Recenzirala je 10 znanstvenih radova u časopisima RSC Advances, Letters in Applied Microbiology i Food Adiitives & Contaminants, Part A.

Sudjelovala je kao suradnik na dva nacionalna projekta „Potencijalna primjena kakao polifenola u inhibiciji fibroze jetre" (MZOS 335-0000000-0221; 2009.-2012.) i „Visokoprotočne analitičke platforme za kontrolu kvalitete i provjeru izvornosti hrane iz jadranskog područja" (HRZZ; 2012.-2015.), te jednom međunarodnom projektu „Putenmuskulatur unter unterschiedlicher Stressbelastung" (Njemačko ministarstvo za hranu i poljoprivredu; 1.3.-30.11.2000.).

U razdoblju 2008.-2010. sudjelovala je u nastavi na kolegijima Uvod u prehrambene tehnologije, Tehnologija i kontrola kakvoće hrane I i Fizička kemija na preddiplomskom sveučilišnom studiju Sanitarno inženjerstvo, na kolegijima Kemija i Plinska kromatografija u analizi lipida na stručnom studiju Medicinsko-laboratorijske dijagnostike i na kolegiju Medicinska kemija i biokemija I na integralnom preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju Medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, od 2011. sudjeluje u nastavi kao voditeljica obveznog kolegija Opća kemija i od 2013. kao voditeljica izbornog kolegija Bioaktivne komponente mediteranske prehrane na preddiplomskom sveučilišnom studiju Biotehnologija i istraživanje lijekova. Pod njezinim mentorstvom obranjena su uspješno 14 diplomskih i 3 završna rada.

Sudjelovala je u radu Sveučilišta u Rijeci kao članica Povjerenstva fonda Aleksandar Abramov, Stručnog vijeća Centra za studije i Odbora za kvalitetu, te u radu Odjela za biotehnologiju kao ISVU koordinator i član Odbora za kvalitetu.

Usavršavala se u Njemačkom državnom institutu za istraživanje mesa (Max Rubner Institut) u sklopu stipendije njemačkog Ministarstva za hranu i poljoprivredu za istraživanje na temi doktorskog rada (1.3.-30.11.2000.).

Dobitnica je državne stipendije Republike Hrvatske za vrijeme studiranja, priznanja Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu povodom 40. obljetnice Fakulteta za postignuti uspjeh tijekom studija (1996.) i nagrade Biotehničke zaklade za postignute rezultate u području biotehničkih znanosti, polje biotehnologija (1997.). Član je Udruge senzorskih analitičara Gustus, 2010.-danas.

Prof. dr. sc. Nada Vahčić rođena je 1959. godine u Zagrebu. Diplomirala je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu 1985. godine te ostala raditi kao pripravnik postdiplomand. Magistrirala je 1988. godine, a doktorirala 1996. godine. Slijede izbori u docenta, izvanrednog profesora, redovitog profesora a od 2009. godine je redoviti profesor u trajnom zvanju.

Nositelj je predmeta "Kontrola kvalitete u prehrambenoj industriji" koji je uvođenjem bolonjskog procesa promijenio naziv u „Analitika hrane“ i „Analitika prehrambenih proizvoda“ te "Senzorske analize hrane". Nastavna djelatnost vezana joj je za kontrolu kvalitete hrane i senzorske analize te osiguranje kvalitete i sustave upravljanja kvalitetom. Nositelj je 2 kolegija na dodiplomskoj nastavi na PBF-u, jednog kolegija na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu i Sveučilištu-sjever u Koprivnici. Na poslijediplomskom studiju na matičnom fakultetu nositelj je 4 kolegija. Također je bila voditelj specijalističkog studija "Analitika i mikrobiologija namirnica" a danas poslijediplomskog specijalističkog studija „Kvaliteta i sigurnost hrane“ na PBF-u.

Pročelnik je Laboratorija za kontrolu kvalitete prehrambenih proizvoda, a od ove akademske godine predstojnik Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda te član nekoliko odbora na fakultetu. Bila je član TO 34 pri DZNM, predsjednik PO 10 unutar TO 34 pri DZNM, Vijeća za zaštitu potrošača pri Ministarstvu gospodarstva, rada i poduzetništva, Znanstvenog odbora za zdravstvenu ispravnost hrane pri Hrvatskoj agenciji za hranu te brojnih drugih stručnih i znanstvenih društava. Također je i područni recenzent u časopisu Food Technology and Biotechnology. Sudjeluje u radu komisija za senzorsko ocjenjivanje meda, pršuta i suhomesnatih proizvoda.

Dosada je kao istraživač ili voditelj aktivno bila uključena u rad 16 znanstveno-istraživačkih projekata, a trenutno je istraživač na 2 znanstvena projekta. Do početka 2019. godine objavila je 64 znanstvenih radova (prema WoS-u), 40 znanstvenih radova iz kategorije a2 te oko 50 stručnih radova. Sudjelovala na brojnim znanstvenim skupovima (domaća/inozemna). Također je bila voditelj stotinjak diplomskih i/ili završnih radova, više od 30 znanstvenih magistarskih i/ili specijalističkih radova i 8 disertacija. Sudjelovala je kao organizator i izvođač 63 seminara i izobrazbi za senzorskog analitičara namijenjenih prehrambenoj industriji. Usavršavala se u zemlji i inozemstvu kroz brojne seminare i studijske boravke vezano za područje kvalitete i sigurnosti hrane te senzorske procjene hrane.

Zahvaljujem mojim mentoricama, izv. prof. dr. sc. Mladenki Malenica Staver i prof. dr. sc. Nadi Vahčić na dragocjenim savjetima i vodstvu prilikom izrade ovog rada.
Zahvaljujem dragim kolegicama iz laboratorija, Lidiji i Renati, na velikodušnoj stručnoj pomoći.
Posebno hvala mojoj obitelji na strpljenju, mom suprugu na podršci i ohrabrenju, a najveće hvala mojima Damjanu i Loreni na vremenu koje su mi darovali.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 547.56:634.853:678.048(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

NUTRACEUTIČKE I ANTINUTRACEUTIČKE KOMPONENTE U HRVATSKIM CRNIM VINIMA SA ZAŠTIĆENOM OZNAKOM IZVORNOSTI

Mr. sc. Paula Žurga, dipl. ing.
Rad je izrađen u Odsjeku za zajedničke analitičke tehnike Zdravstveno-ekološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.
Mentori: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica Staver i prof. dr. sc. Nada Vahčić

Kratki sažetak doktorskog rada: Antioksidacijski kapacitet te koncentracije nutraceutičkih (fenolni spojevi, makro-, mikro- i elementi u tragovima) i antinutraceutičkih (toksični elementi, biogeni amini, okratoksin A) komponenata određene su u 110 uzoraka hrvatskih crnih vina sa zaštićenom oznakom izvornosti. Istraživanje je obuhvatilo vina sedam sorti iz pet godišta berbe i sedam zaštićenih oznaka izvornosti. Antioksidacijski kapacitet vina te koncentracije pojedinačnih fenola u hrvatskim su vinima ovisne većim dijelom o geografskom podrijetlu vina, a manjim dijelom o karakteristikama proizvodne sorte, dok je elementni sastav vina najvećim dijelom ovisan o geografskom podrijetlu vina. Među biogenim aminima, histamin je jedini bio sortno i regionalno specifičan. Više koncentracije histamina izmjerene su u vinima s višim pH te u vinima proizvedenim od grožđa ubranog u klimatološki nepovoljnoj godini. Koncentracije okratoksina A i udio kontaminiranih vina postupno je rastao od sjevera prema jugu. Također je učestalost kontaminacije upućivala na sortno specifičnu osjetljivost. Analizom glavnih komponenata i kanoničkom diskriminacijskom analizom istražen je potencijal ispitivanih fenolnih spojeva i elemenata za diskriminaciju hrvatskih crnih vina s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe. Učinkoviti fenolni spojevi u diskriminaciji vina bili su: katehin, kvercetin, miricetin, vanilinska i ferulinska kiselina i resveratrol. Učinkoviti elementi u diskriminaciji vina bili su K, Na, Al, Cr, Co i As.

Broj stranica: 156
Broj slika: 24
Broj tablica: 27
Broj literaturnih navoda: 242
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, fenolni spojevi, elementi, kontaminanti, kanonička diskriminacijska analiza, crno vino
Datum obrane: 13.12.2019.
Stručno povjerenstvo za obranu:
1. prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić
2. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac
3. doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović
Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Ph. D. Thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate Study in Biotechnology and Bioprocessing Engineering, Food Technology and Nutritionism
UDK: 547.56:634.853:678.048(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Biotechnology

NUTRACEUTICAL AND ANTINUTRACEUTICAL COMPONENTS OF CROATIAN RED WINES WITH PROTECTED DESIGNATION OF ORIGIN

M. sc. Paula Žurga
Thesis was performed in Analytical Division of Department of Health Ecology of Teaching Institute of Public Health of Primorsko-goranska County.
Supervisors: Ph. D. Mladenka Malenica Staver, Associate Professor and Ph. D. Nada Vahčić, Full Professor
Short abstract: Antioxidant capacity and concentrations of nutraceutical (phenols, macro-, micro- and trace elements) and antinutraceutical (toxic elements, biogenic amines and ochratoxin A) components were determined in 110 samples of Croatian red wines with protected designation of origin. Seven varieties, five vintages and seven protected designations of origin were included in the study. Antioxidant capacity and concentrations of individual phenols in Croatian wines depended mostly on the geographic origin and less on the variety, while elemental composition in greatest part depended on the geographic origin. Among biogenic amines, only histamine was varietally and regionally specific. Higher histamine concentrations were measured in wines with higher pH and in wines produced from the grapes harvested in the climatologically unfavorable year. Ochratoxin A concentration and frequency of contamination increased southwards. The frequency of ochratoxin A contamination pointed to variety-specific susceptibility. Principal component analysis and canonical discriminant analysis were used to investigate the potential of investigated phenols and elements to discriminate Croatian red wines according to variety, geographic origin and vintage. Catechin, quercetin, miricetin, vanillic and ferulic acid and resveratrol were efficient phenols while K, Na, Al, Cr, Co and As were efficient elements in wine discrimination.
Number of pages:156
Number of figures: 24
Number of tables: 27
Number of references: 242
Original in: Croatian
Key words: antioxidant capacity, phenolic compounds, elements, contaminants, canonical discriminant activity, red wine
Date of the thesis defence: 13.12.2019.
Reviewers:
1. Ph. D. Karin Kovačević Ganić, Full Professor
2. Ph. D. Vlatka Petravić Tominac, Full Professor
3. Ph. D. Zvonimir Marijanović, Assistant Professor
Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg maršala Tita 14.

SAŽETAK

Vino je proizvod jedinstvenih svojstava jer zbog utjecaja osobitosti sorte, vrste tla, geografske regije, klime, sezonskih varijacija unutar pojedinih godišta, uvjeta proizvodnje i skladištenja, dostiže visok stupanj različitosti kemijskog sastava i organoleptičkih svojstava. U posljednjem desetljeću identificiran je velik broj različitih bioaktivnih tvari u vinu s potencijalnim učinkom na ljudsko zdravlje te, usporedo s tim otkrićima, raste interes javnosti za tzv. funkcionalnom hranom kao i svijest o blagotvornom učinku vina na zdravlje. Budući da ponuda vina premašuje potražnju, svjetsko tržište vina izuzetno je kompetitivno čime raste potreba za proizvodnjom vina koje odražava kulturološke specifičnosti tradicionalne proizvodnje, uzgoj autohtonih sorti kao i naglasak na zdravstveni aspekt crnog vina. Stoga je neophodna detaljna karakterizacija hrvatskih crnih vina s obzirom na sadržaj zdravstveno poželjnih i nepoželjnih tvari u vinima različitog geografskog podrijetla, godišta i sorte, a koja će omogućiti pouzdaniju autentifikaciju vina.

U ovom istraživanju izmjeren je antioksidacijski kapacitet te koncentracije nutraceutičkih (fenolni spojevi, makro-, mikro- i elementi u tragovima) i antinutraceutičkih (toksični elementi, biogeni amini, okratoksin A) komponenata u 110 uzoraka hrvatskih crnih vina sa zaštićenom oznakom izvornosti (ZOI). Istraživanje je obuhvatilo vina sedam sorti (Babić, Cabernet Sauvignon, Frankovka, Merlot, Pinot crni, Plavac mali i Teran) iz pet godišta berbe (2011., 2012., 2013., 2014. i 2015) i sa sedam ZOI (Dalmatinska zagora, Dingač, Hrvatska Istra, Hrvatsko Podunavlje, Sjeverna Dalmacija, Slavonija i Srednja i južna Dalmacija). Jednosmjerna ANOVA s post hoc Tukey HSD testom upotrijebljena je za utvrđivanje razlika među ispitivanim vinima, a multivarijantnim statističkim metodama (analiza glavnih komponenata i kanonička diskriminantna analiza) istražen je potencijal ispitivanih fenolnih spojeva i elemenata za diskriminaciju hrvatskih crnih vina s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe.

Antioksidacijski kapacitet vina te koncentracije pojedinačnih fenola u hrvatskim su vinima ovisne većim dijelom o geografskom podrijetlu vina, a manjim dijelom o karakteristikama proizvodne sorte. Općenito su vina s južnim ZOI bogatija fenolnim spojevima i imaju veći antioksidacijski kapacitet. Najviše koncentracije resveratrola, najistraživanijeg nutraceutika, izmjerene su u vinima proizvedenima od sorte Teran. Vina sa ZOI Dingač isticala su se najvišim koncentracijama ukupnih fenola i najvišim antioksidacijskim kapacitetom.

Elementni sastav vina bio je najvećim dijelom ovisan o geografskom podrijetlu vina. Unatoč velikoj varijabilnosti rezultata, nađene su statistički značajne razlike u koncentracijama

K, Mg, Na, Mn, Zn, Pb i Cd među vinima s različitim ZOI. Koncentracije As, Cd, Cu, Pb i Zn, za koje su Europska Unija i Međunarodna organizacija za lozu i vino propisale maksimalno dopuštene koncentracije, bile su ispod graničnih vrijednosti u svim ispitivanim uzorcima.

Biogeni amini izmjereni su u širokom rasponu koncentracija, a histamin je jedini bio sortno i regionalno specifičan. Više koncentracije histamina izmjerene su u vinima s višim pH-vrijednostima (Plavac mali i Babić) te u vinima proizvedenim od grožđa ubranog u klimatološki nepovoljnoj godini (kraće trajanje osunčavanja, veća količina oborina).

Koncentracije okratoksina A i udio kontaminiranih vina postupno je rastao od sjevera prema jugu. Sva su dalmatinska vina bila kontaminirana, međutim je najviša izmjerena koncentracija iznosila 0,163 µg/L što je više nego deseterostruko niže od maksimalno dopuštene granice (2 µg/kg) u Europskoj Uniji. U vinima je okratoksin A izmjeren u širokom rasponu koncentracija te nisu nađene statistički značajne razlike s obzirom na sortu i geografsko podrijetlo. Međutim, udio kontaminiranih vina upućivao je na sortno specifičnu osjetljivost na infekciju okratoksigenom plijesni i posljedičnu kontaminaciju okratoksinom A. Klimatološki uvjeti utječu na njegovu pojavnost: najviše koncentracije okratoksina A izmjerene su u vinima iz 2014. godine koja je bila najvlažnija godina s najkraćim prosječnim dnevnim trajanjem osunčavanja. Također su sva vina iz navedenog godišta bila kontaminirana s ovim mikotoksinom.

Kanoničkom diskriminacijskom analizom dobiveni su bolji modeli za razlikovanje vina proizvedenih od različitih sorti i s različitim geografskim podrijetlom u odnosu na analizu glavnih komponenata. Fenolni sastav vina imao je visok potencijal za diferencijaciju vina i bio je ovisan o sorti, ali je utjecaj geografskog podrijetla također bio značajan. Učinkoviti fenolni spojevi u diskriminaciji vina bili su: katehin, kvercetin, miricetin, vanilinska i ferulinska kiselina i resveratrol. Elementni sastav vina bio je osobito koristan za regionalnu diskriminaciju vina, međutim, utjecaj sorte na elementni sastav vina nije bio zanemariv. Učinkoviti elementi u diskriminaciji vina bili su K, Na, Al, Cr, Co i As.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, fenolni spojevi, elementi, biogeni amini, okratoksin A, analiza glavnih komponenata, kanonička diskriminacijska analiza, crno vino

SUMMARY

Wine is the product of unique characteristics because its diverse chemical composition and sensory attributes depend on grape variety, soil, geographical region of origin, climate, seasonal variations within vintages, production and storage conditions. A large number of bioactive compounds in wine has been identified within the last decade followed by increased public interest for so called functional food as well as by the awareness of beneficial health effects of wine. Since wine supply exceeds demand, the world wine market is very competitive resulting in need to produce culturally specific traditional wine and wine from autochthonous varieties, with emphasis on health aspect of red wine. Therefore, it was necessary to characterize in detail Croatian red wines made of different varieties, originating from different regions and produced from different vintages according to content of health beneficial and detrimental compounds. This characterization will enable more reliable wine authentication.

This research included the measurements of antioxidant capacity and concentrations of both nutraceutical (phenols, macro-, micro- and trace elements) and antinutraceutical (toxic elements, biogenic amines, ochratoxin A) components in 110 samples of Croatian red wines with protected designation of origin (PDO). Seven varieties (Babić, Blaufränkisch, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot noir, Plavac mali and Teran) from five vintages (2011, 2012, 2013, 2014 and 2015) and seven PDO (Dalmatian inland, Dingač, Croatian Istria, Croatian Podunavlje, Northern Dalmatia, Slavonia and Central and Southern Dalmatia). One-way ANOVA followed by post hoc Tukey HSD was used to determine the differences between investigated wines while multivariate statistical methods (principal components analysis and canonical discriminant analysis) were used to investigate the potential of studied phenols and elements to discriminate wines according to variety, geographic origin and vintage.

Antioxidant capacity and concentrations of individual phenols in Croatian wines were mostly dependent on geographic origin of wines and less on varietal characteristics. Generally, wines with southern PDOs were richer in phenols and had higher antioxidant capacity. The highest concentrations of resveratrol, the most researched nutraceutical compound, were measured in Teran wine. Wines with PDO Dingač had the highest total phenolic content and the highest antioxidant capacity.

The elemental composition of wines was mostly dependent on their geographical origins. In spite of great variability of results, the statistically significant differences between wines with different PDOs were found in K, Mg, Na, Mn, Zn, Pb and Cd concentrations. The

concentrations of As, Cd, Cu, Pb i Zn were below the maximum allowed concentrations set by the European Union and International Organisation of Vine and Wine.

Biogenic amines were measured in wide ranges of concentrations. Histamine was the only varietally and regionally specific amine. Higher histamine concentrations were measured in wines with higher pH values (Plavac mali and Babić) and in wines produced form grapes harvested in climatologically unfavorable year (shorter sun exposure, higher rainfall amount).

Ochratoxin A concentrations and frequency of contaminated wines increased gradually southwards. All Dalmatian wines were contaminated, however, the highest measured concentration was 0,163 µg/L which was more than 10-fold lower than the maximum allowed concentration (2 µg/kg) set by the European Union. Because of high variability of measured concentrations, there were no statistically significant differences in ochratoxin A concentrations between wines made from different grape variety and with different geographical origin. However, the frequency of contamination pointed to variety-specific susceptibility to infection with ochratoxigenic species and consequently to ochratoxin A contamination. The climate conditions had an impact on ochratoxin A concentrations and frequency of contamination: the highest concentrations were measured in wines produced in 2014 which was the most humid year with shortest average sunshine exposure. In addition, all the wines from 2014 were contaminated.

Canonical discriminant analysis produced better models for wine discrimination according to grape variety and geographic origin than principal component analysis. Phenolic composition had high potential for wine differentiation and was variety dependent, although with notable influence of geographic origin. The efficient phenols for wine discrimination were: catechin, quercetin, miricetin, vanillic and ferulic acid and resveratrol. The elemental composition of wines was especially useful for regional wine discrimination, however, the influence of variety was not negligible. The efficient elements for wine discrimination were K, Na, Al, Cr, Co and As.

Key words: antioxidant capacity, phenolic compounds, elements, biogenic amines, ochratoxin A, principal component analysis, canonical discriminant analysis, red wine

Sadržaj

1.0 UVOD 1

2.0 OPĆI DIO 4

2.1. Vino 5

2.1.1. Povijest proizvodnje vina 5

2.1.2. Vino u Republici Hrvatskoj 6

2.1.2.1. Zakonske odredbe……..…….…….……..6

2.1.2.2. Proizvodnja vina i sortna zastupljenost vina na području RH……...…..…..7

2.1.3. Biološki učinci vina 10

2.1.4. Zdravstveni učinci vina 10

2.1.5. Sastav vina 11

2.1.5.1. Voda……..…….…..…12

2.1.5.2. Alkohol…….12

2.1.5.3. Kiseline…….……12

2.1.5.4. Šećeri…….……...13

2.1.5.5. Biološki aktivni spojevi……..…….…….13

2.1.5.6. Utjecaj terroira na kemijski sastav vina……..…….……19

2.1.6. Prehrambena zastupljenost i nutraceutička svojstva odabranih fenolnih spojeva .. 20

2.1.7. Prehrambena zastupljenost i nutraceutička svojstva melatonina 24

2.1.8. Makroelementi, mikroelementi i elementi u tragovima 25

2.1.9. Prirodni kontaminanti (antinutraceutičke komponente) 26

2.2. Instrumentalne tehnike u analizi vina 28

2.2.1. Spektrofotometrijske metode 28

2.2.1.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta…….……....…..29

2.2.1.2. Određivanje ukupnih fenola…….29

2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 30

2.2.3. Atomska apsorpcijska spektrometrija 31

2.2.4. Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom 32
2.3. Multivarijantne statističke metode u analizi vina 33
2.3.1. Analiza glavnih komponenata 33
2.3.2. Kanonička diskriminacijska analiza 34
3.0 MATERIJALI I METODE 35
3.1. Materijali 36
3.1.1. Uzorci 36
3.1.2. Kemikalije 37
3.1.2.1. Antioksidacijski kapacitet 37
3.1.2.2. Ukupni fenoli 38
3.1.2.3. Pojedinačni fenoli 38
3.1.2.4. Melatonin 38
3.1.2.5. Makroelementi, mikroelementi i elementi u tragovima 38
3.1.2.6. Biogeni amini 39
3.1.2.7. Okratoksin A 39
3.1.3. Plinovi 39
3.2. Metode 40
3.2.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta 40
3.2.1.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom 40
3.2.1.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH• metodom 40
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola 40
3.2.3. Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva 41
3.2.4. Određivanje melatonina 42
3.2.5. Određivanje makroelemenata, mikroelemenata i elemenata u tragovima 44
3.2.6. Određivanje biogenih amina 45
3.2.7. Određivanje okratoksina A 46
3.3. Statistička obrada podataka 46
4.0 REZULTATI 48

4.1. Kemijski parametri analiziranih crnih vina 49

4.2. Klimatološki podatci..... 51

4.3. Utjecaj sorte, geografskog podrijetla i godišta berbe na analizirane nutraceutičke i antinutraceutičke komponente u hrvatskim crnim vinima sa zaštićenom oznakom izvornosti 54

4.4. Koeficijenti korelacije među analiziranim nutraceutičkim i antinutraceutičkim komponentama..... 61

4.5. Analiza glavnih komponenata (PCA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranja) hrvatskih crnih vina sa ZOI s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe..... 64

4.6. Kanonička diskriminacijska analiza (CDA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranja) hrvatskih crnih vina sa ZOI s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe..... 68

4.8.Usporedba analiziranih vina s obzirom na tradicionalnu oznaku kvalitete 84

5.0 RASPRAVA..... 85

5.1. Antioksidacijski kapacitet..... 88

5.2. Ukupni fenoli i pojedinačni fenolni spojevi 90

5.3. Melatonin..... 95

5.4. Makroelementi, mikroelementi i elementi u tragovima 96

5.5. Biogeni amini 101

5.6. Okratoksin A..... 104

5.7. Učestalost kontaminacije prirodnim kontaminantima 108

5.8. Međuzavisnost analiziranih nutraceutičkih i antinutraceutičkih komponenata..... 108

5.9. Analiza glavnih komponenata 111

5.10. Kanonička diskriminacijska analiza 114

5.11. Zastupljenost nutraceutičkih i antinutraceutičkih spojeva u vinima s različitom tradicionalnom oznakom kvalitete..... 124

6.0 ZAKLJUČCI 125

LITERATURA..... 129

ŽIVOTOPIS…… ……..……157

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA……..……....158

1.0 UVOD

Vino je prehrambeni proizvod poznat čovjeku više od osam tisuća godina. Kroz povijest se, osim za osobne potrebe, koristilo i u ceremonijalne i religiozne svrhe te kao lijek, a proizvodnja vina i trgovina vinom bile su važne gospodarske grane. U današnje vrijeme, čak 99% svjetskog vina proizvodi se od ploda jedne vrste loze, *Vitis vinifera*, od otprilike stotinu vrsta koje divlje rastu u umjerenim klimatskim zonama Azije, Europe i Sjeverne Amerike. Unatoč tomu što postoji velik broj priznatih sorti koje se upotrebljavaju u proizvodnji vina, činjenica jest da naizgled beskonačne kombinacije boje, okusa i arome vina dugujemo jednoj vrsti loze.

Napredak u području analitičke kemije omogućio je identifikaciju velikog broja manje zastupljenih sastojaka vina, čije se koncentracije kreću od nekoliko ng/L do nekoliko mg/L. Pojedinačno, navedeni spojevi imaju mali ili uopće nemaju učinka na organoleptička svojstva vina, no, zajedno, njihov učinak može biti značajan. Među njima nalaze se i fenoli, vrlo heterogena skupina spojeva kojima se, prvenstveno zbog njihovih antioksidacijskih svojstava, pripisuju pozitivni učinci na ljudsko zdravlje. Umjerena konzumacija crnog vina povezuje se, među ostalim, s antimikrobnim, antivirusnim, protuupalnim, protutumorskim, neuroprotektivnim, kardioprotektivnim i hepatoprotektivnim učincima.

Vino je i izvor esencijalnih elemenata poput bakra, cinka, kalcija, kalija, kobalta, kroma, magnezija, mangana, nikla, selena i željeza. U narodnoj je medicini odavno poznato ispijanje crnog vina zbog koncentracije prisutnog željeza i ˝popravljanja krvne slike˝. Umjerena konzumacija vina doprinosi zadovoljenju dnevnih potreba za navedenim elementima, uz praćenje kvalitete vina u smislu kontrole nad eventualnom prisutnošću toksičnih elemenata, arsena, kadmija i olova, iznad maksimalno dopuštenih koncentracija.

Na sastav vina utječu brojni faktori, poput osobitosti sorte, vrste tla, geografske regije podrijetla, klime, sezonskih varijacija unutar pojedinih godišta te uvjeta proizvodnje i skladištenja. Uz zdravstveno poželjne, zbog spleta utjecaja navedenih čimbenika vino može sadržavati i potencijalno opasne tvari, kao što su biogeni amini i okratoksin A, prirodni kontaminanti koji nastaju djelovanjem mikroorganizama bilo za vrijeme uzgoja loze, bilo za vrijeme proizvodnje i skladištenja vina.

Visoka zastupljenost vina u mediteranskoj prehrani dokazuje da su naši preci, čak i u nedostatku znanstvenih dokaza, znali prepoznati preventivne zdravstvene učinke vina. U novije vrijeme raste interes javnosti za tzv. funkcionalnom hranom kao i svijest o blagotvornom učinku vina na zdravlje. U tom kontekstu, zdravstveni aspekt crnog vina mogao bi biti snažno marketinško oruđe. Stoga je neophodna detaljna karakterizacija hrvatskih crnih vina s obzirom

na koncentraciju zdravstveno poželjnih i nepoželjnih tvari u vinima različitog geografskog podrijetla, godišta i sorte, a koja će omogućiti i pouzdaniju autentifikaciju vina.

2.0 OPĆI DIO

2.1. Vino

Općenito, vino je fermentirani proizvod dobiven od grožđa s volumnim udjelom etanola od 16% ili manjim. Prema Zakonu o vinu iz 2003. godine, vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa. Pogodno grožđe je plod priznatih sorti namijenjenih proizvodnji vina, a za tu proizvodnju upotrebljavaju se sorte koje pripadaju vrsti *Vitis vinifera* (NN 96/2003). Novi Zakon o vinu (NN 32/2019) ne donosi definiciju vina već utvrđuje tj. nabraja proizvode od vinove loze koji se mogu smatrati vinom, među kojima su vino, mlado vino u fermentaciji, pjenušavo vino, vino od prosušenog grožđa itd., a koja moraju odgovarati zahtjevima iz Uredbe EU br. 1308/2013. Uredba EU br. 1308/2013 definira vino kao proizvod dobiven isključivo potpunom ili djelomičnom alkoholnom fermentacijom izmuljanog ili cijelog svježega grožđa ili mošta.

2.1.1. Povijest proizvodnje vina

Najstariji arheološki dokazi o proizvodnji vina nađeni su u Gruziji (6000 god. pr. n. e.) i Iranu (5000 god. pr. n. e.) (Cavalieri i sur., 2003). Stotine, ako ne i tisuće godina eksperimentiranja u kultivaciji loze i tehnologiji proizvodnje vina bile su potrebne kako bi se objasnio nivo sofisticirane i za to vrijeme obimne proizvodnje vina na spomenutim lokacijama. Najstarija poznata vinarija nađena je u spilji u Armeniji, a nalazi u njoj datirani su oko 4100. pr. n. e (Barnard i sur., 2010). Arheolozi su u navedenoj spilji pronašli vinsku prešu, posude za fermentaciju te sjeme vinove loze, sve znakove napredne tehnologije proizvodnje vina. Na Siciliji su pronađene posude za čuvanje vina iz starijeg brončanog doba, prije otprilike 6000 godina (Tanasi i sur., 2017). U tom razdoblju, proizvodnja vina već je bila proširena na cijeli Mediteran, Bliski istok te Mezopotamiju. Napredak u proizvodnji vina tijekom procvata egipatske, potom grčke i rimske civilizacije dostigao je vrhunac između 200. i 400. g. n. e. Sljedećih 1200 do 1400 godina razvoj tehnologije proizvodnje vina je usporio i bio ograničen uglavnom na zapadnjačke redovničke redove (Kennedy i sur., 2006). Otprilike u sedamnaestom stoljeću, otkriće uporabe sumpora u svrhu produljenja trajnosti dalo je novi zamah proizvodnji vina (Soleas, 1997). U osamnaestom stoljeću se razvoj tehnologije vina ubrzao, vjerojatno zbog promjena u trgovačkim odnosima u Europi te su uvedeni novi pojmovi poput godišta vina. U tom razdoblju vino je poprimilo moderan oblik.

Od samih početaka, utjecaj vina na promjenu svijesti imao je religijsku konotaciju te se vino ispijalo u religioznim obredima još kod starih Grka i Rimljana, a u kršćanskim Crkvama i

danas, kao dio euharistijskog prisjećanja na Posljednju večeru. Koliko je bilo važno već u Starom vijeku, dokazuju kultovi posvećeni božanstvima Dionisu u Grčkoj i Bakhu u Rimu. Učestalost prikaza grožđa i vina na starom novcu, hramovima, keramici i mozaicima jasno dokazuje njihovu važnost u ranim civilizacijama cijelog svijeta. Kroz čitavu povijest, vino se konzumiralo i u sasvim svjetovne svrhe, a njegova proizvodnja i prodaja često je imala značajan utjecaj na prihode države i gospodarski rast. Vinifikacija je omogućila ljudima proizvodnju pića s visokim udjelom etanola koje je zbog svojeg učinka na promjenu svijesti, analgetičkih i antiseptičkih svojstava te konzervirajućih učinaka bilo najraširenije medicinsko sredstvo u povijesti. Vino je najstariji poznati lijek jer se već od 2200 g. pr.n.e. upotrebljavalo za, među ostalim, liječenje dermatoloških oboljenja i probavnih poremećaja (Robinson, 2006). Od samog početka civilizacije, ono je bilo važan i nezaobilazan dio ljudske prehrane i kulture općenito, uz kratke prekide poput uspona Puritanaca u Engleskoj u 16. st. i Prohibicije u SAD u 20. st.

2.1.2. Vino u Republici Hrvatskoj

2.1.2.1. Zakonske odredbe

Prema prirodnim uvjetima za uzgoj vinove loze, u Republici Hrvatskoj definirana su zemljopisna područja za uzgoj vinove loze koja se dijele na vinogradarske zone, regije, podregije, vinogorja i vinogradarske položaje. Prema Zakonu o vinu (NN 32/2019), vinogradarska regija je najveća administrativno organizacijska jedinica koja predstavlja zemljopisno područje sa sličnim klimatskim i pedološkim uvjetima, koji zajedno s agrobiološkim čimbenicima utječu na glavna kvalitativna obilježja grožđa, mošta i vina, proizvedenih na tom području. Područje Republike Hrvatske dijeli se na četiri vinogradarske regije, unutar kojih se razlikuje 12 vinogradarskih podregija: Središnja bregovita Hrvatska (sastoji se od pet podregija: Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje-Međimurje), Slavonija i hrvatsko Podunavlje (sastoji se od dvije podregije: Slavonija i Hrvatsko Podunavlje), Hrvatska Istra i Kvarner (sastoji se od dvije podregije: Hrvatska Istra i Hrvatsko primorje) i Dalmacija (sastoji se od tri podregije: Sjeverna Dalmacija, Dalmatinska zagora i Srednja i južna Dalmacija) (NN 74/2012).

U svrhu osiguranja kvalitete i zaštite potrošača, vina u Hrvatskoj mogu dobiti Zaštićenu oznaku izvornosti (ZOI) ili Zaštićenu oznaku zemljopisnog podrijetla (ZOZP), koju dodjeljuje Europska komisija. Vina mogu dobiti oznaku ZOI pod uvjetom da njihova kakvoća i karakteristike, u bitnom ili isključivo, nastaju pod utjecajem posebnih prirodnih i ljudskih čimbenika određene zemljopisne sredine; da grožđe za proizvodnju tih proizvoda potječe

isključivo s tog zemljopisnog područja; da se proizvodnja odvija u tom zemljopisnom području te da grožđe za proizvodnju mora biti od vinskih sorata koje pripadaju vrsti *Vitis vinifera*. Republika Hrvatska ima 16 zaštićenih oznaka izvornosti: Istočna kontinentalna Hrvatska, Hrvatsko Podunavlje, Slavonija, Zapadna kontinentalna Hrvatska, Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje, Zagorje-Međimurje, Primorska Hrvatska, Hrvatska Istra, Hrvatsko primorje, Sjeverna Dalmacija, Dalmatinska zagora, Srednja i južna Dalmacija i Dingač (NN 141/2010). Za vina, koja imaju specifičnu kakvoću, ugled ili druga obilježja koja se pripisuju njegovu zemljopisnu podrijetlu, kod kojih najmanje 85% grožđa (od vinskih sorata koje pripadaju vrsti *Vitis vinifera*, ali i križancima navedene vrste s drugim vrstama iz roda *Vitis*) za proizvodnju potječe s tog zemljopisnog područja na kojem se odvija i proizvodnja, može se zatražiti dodjela Zaštićene oznake zemljopisnog podrijetla (ZOZP) (NN 141/2010).

U Republici Hrvatskoj dopuštena je i uporaba tzv. tradicionalnih izraza za vino, koji mogu biti vezani ili za vino sa ZOI ili ZOZP (npr. vrhunsko vino i kvalitetno vino), ili za postupak proizvodnje, starenja, kakvoće, boju, vrstu mjesta ili poseban događaj iz povijesti povezan s proizvodom sa ZOI ili ZOZP (npr. Prošek, Opolo). Tradicionalni izraz za vino je ugledni naziv koji se minimalno 15 godina koristi u trgovini na državnom području Republike Hrvatske, kako bi se razlikovale posebne kategorije proizvoda od vinove loze iz članka 92. Stavka 1. Uredbe (EU) br. 1308/2013, a u svrhu zaštite legitimnih interesa proizvođača i potrošača, osiguranja nesmetanog poslovanja internog tržišta vinom te promoviranja proizvodnje kvalitetnih proizvoda uz implementaciju nacionalnih mjera politike kvalitete (Uredba EU br. 1308/2013).

2.1.2.2. Proizvodnja vina i sortna zastupljenost vina na području RH

Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, proizvodnja vina u Republici Hrvatskoj kontinuirano opada te je u razdoblju od 2011. do 2016. pala za 46%. S druge strane, uvoz vina naglo raste nakon otvaranja tržišta EU 2013. godine, dok izvoz stagnira (Tablica 1). U razdoblju od 2013. do 2016. godine zabilježen je pad potrošnje vina u Hrvatskoj za 14%, prema podatcima Međunarodne organizacije za lozu i vino (fr. OIV - Organisation International de la vigne et du vin), no, unatoč tomu, Hrvatska je 2017. godine bila na 29. mjestu na svijetu s potrošnjom koja prelazi milion hektolitara godišnje (OIV, State of the vitiviniculture world market, 2018).

Tablica 1. Proizvodnja, uvoz i izvoz vina u Republici Hrvatskoj (prilagođeno prema: Državni zavod za statistiku, 2017).

	2011.	2012.	2013.	2014.	2015.	2016.
Proizvodnja (L)	140.900.000	129.300.000	124.900.000	84.200.000	99.200.000	76.000.000
Uvoz (L)			13.176.401	22.394.714	29.005.954	30.995.170
Izvoz (L)			3.018.516	3.659.251	4.940.138	3.610.935

Klimatološke, geografske, topološke i pedološke karakteristike hrvatskih vinorodnih regija omogućuju uzgoj velikog broja različitih sorti vinove loze i visoke prinose, no različiti tehnološki, politički i socioekonomski faktori uglavnom su doprinijeli izostanku hrvatskih kvalitetnih vina sa svjetskog tržišta vina. Napredak u poljoprivredi, tehnologiji proizvodnje, pakiranju i transportu vina, usporedo s agresivnim marketingom, omogućili su promjene na tržištu vina i fokus proizvodnje značajno pomaknuli na zapadnu i južnu Zemljinu polutku. Budući da ponuda vina premašuje potražnju, svjetsko tržište vina izuzetno je kompetitivno, a Hrvatska, kao i ostale zemlje Središnje i Istočne Europe, nema prednost u jeftinoj radnoj snazi (poput Južne Amerike i Kine), niti u razvijenoj ekonomiji (poput Australije, SAD-a i Zapadne Europe) (Marks, 2011). Stoga bi proizvodnja vina koja odražava kulturološke specifičnosti tradicionalne proizvodnje, uzgoj autohtonih sorti kao i naglasak na zdravstveni aspekt crnog vina mogli biti snažno marketinško oruđe.

Vinova loza se u Hrvatskoj uzgaja u 12 podregija koje se međusobno razlikuju po svojim klimatskim, geografskim, topografskim, geološkim, agroekološkim, ekonomskim i drugim karakteristikama (Pejić i Maletić, 2010). U Nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze, koju vodi i ažurira Ministarstvo poljoprivrede, danas se nalazi 259 sorti, od kojih je njih 147 regionalno preporučeno (NN 53/2014) te može dobiti oznaku ZOI. U sortnoj zastupljenosti Republike Hrvatske prednjače bijele sorte (55%) od kojih je najzastupljenija Graševina (23%), dok se prva među crnim sortama, Plavac mali, nalazi tek na 3. mjestu (8%). Merlot je zastupljen s 4%, a Cabernet Sauvignon s 3%. Crne sorte su većim dijelom zastupljene u priobalnim regijama gdje njihova zastupljenost u odnosu na kontinentalne regije raste od 60% (Cabernet Sauvignon) do čak 90% (Syrah). Osobito je mala zastupljenost crnih sorti u regiji Središnja bregovita Hrvatska. Cabernet Sauvignon i Merlot, koji se zbog velike prilagodljivosti i vina visoke kvalitete uzgajaju na područjima svih hrvatskih vinogradarskih regija, zastupljeni su sa samo 6% odnosno 2% u Središnjoj bregovitoj Hrvatskoj (Lipar i sur., 2015).

Otprilike 140 sorti danas se smatra autohtonim hrvatskim sortama (Maletić i sur., 2009). Unatoč kontinuiranom povećanju površina zasađenih međunarodnim sortama tijekom

posljednjih 50 godina, 14 od 30 vodećih sorti u Hrvatskoj još su uvijek one autohtone, među kojima Plavac mali, Babić i Teran (Pejić i Maletić, 2010). Autohtone su sorte obično superiorne u vitikulturnoj praksi zbog bolje prilagodbe i otpornosti prema različitim patogenima (Pejić i sur., 2000). Štoviše, najnagrađivanija i najcjenjenija vina na hrvatskom tržištu potječu od autohtonih sorti, poput Terana (Slika 1) i Plavca malog (Maletić i sur., 2015).



Slika 1. Plod Terana (izvor: Institut za poljoprivredu i turizam, Poreč).

2.1.3. Biološki učinci vina

S obzirom na veliki broj i varirajuću zastupljenost različitih komponenata vina, postoji ogroman broj njihovih potencijalnih bioloških ciljeva. Dosada su opisani učinci vina na oksidacijski stres, krvožilni sustav (funkciju endotela, glatkog mišićnog tkiva krvnih žila, agregaciju trombocita i krvni tlak) te metabolizam masti i ugljikohidrata.

Oksidacijski stres nastaje uslijed neravnoteže između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa (Sies, 1997), a smatra se značajnim, ako ne i najvažnijim faktorom u nastanku i razvoju mnogih stanja i bolesti poput upale, autoimunih bolesti, katarakte, tumora, Parkinsonove bolesti, kardiovaskularnih bolesti i starenja. Oksidansi su normalni nusprodukti aerobnog metabolizma koji se mogu pojačano stvarati uslijed različitih patofizioloških stanja. Obrana protiv štetnog utjecaja oksidansa može biti enzimska (npr. aktivnost superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze), ali i neeenzimska (kod koje značajnu ulogu imaju molekule male mase među kojima su i fenoli, bioaktivni spojevi koji se mogu pronaći i u vinu). Stoga se antioksidacijski potencijal vina definira kao sposobnost: a) reakcije s reaktivnim kisikovim spojevima (engl. ROS – reactive oxygen species); b) ometanja njihovog nastanka ili c) reguliranja i zaštite procesa obrane od oksidirajućih tvari (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). Veći antioksidacijski učinak crnih u odnosu na bijela vina pripisan je većem udjelu fenola u crnim vinima.

Brojna istraživanja su dokazala protektivnu ulogu fenola u nastanku ateroskleroze, među kojima učinak na povećanje proizvodnje i aktivnosti dušikovog oksida, smanjenje proizvodnje ROS, izravno djelovanje na smanjenje upalnih procesa te sprečavanje adhezije leukocita na stijenke krvnih žila. Alkohol i fenoli u vinu povezani su i sa smanjenjem krvnog tlaka. Fenoli imaju vazorelaksacijska svojstva te utječu na ekspresiju bubrežnih Na^+ kanala što smanjuje reapsorpciju natrija i posljedično djeluje na krvni tlak (Artero i sur., 2015).

Konzumacija crnog vina značajno smanjuje lipoproteine niske gustoće (engl. LDL – low density lipoproteins), trigliceride u krvi kao i nastanak aterosklerotičnih naslaga. Resveratrol u vinu smanjuje koncentraciju šećera u krvi, čuva funkciju β-stanica gušterače i povećava osjetljivost na inzulin.

2.1.4. Zdravstveni učinci vina

U ranim 1990-tim, izvješća o tzv. Francuskom paradoksu popularizirala su koncept ispijanja crnog vina u zdravstveno-preventivne svrhe i potaknula interes znanstvene zajednice za utvrđivanjem i objašnjenjem moguće veze između vina i zdravlja. Francuski paradoks

temelji se na rezultatima epidemioloških studija koje su izvjestile o nižoj incidenciji srčanih bolesti u Francuskoj unatoč visokom postotku zasićenih masti u tradicionalnoj francuskoj prehrani. Kao uzrok navedenom paradoksu predložena je visoka potrošnja vina u Francuskoj koja iznosi više od 75 litara po glavi stanovnika godišnje (Renaud i Gueguen, 1998). Dodatna epidemiološka istraživanja su otkrila smanjenje smrtnosti od čak 20-30% u osoba koje redovito i umjereno konzumiraju vino, u odnosu na osobe koje apstiniraju i osobe koje prekomjerno uživaju u vinu. Kao zbunjujuće čimbenike, neki autori su naveli činjenice da su osobe koje umjereno konzumiraju vino istovremeno i osobe za koje je vjerojatnije da se bave tjelovježbom, da su zdravstveno osviještene te da imaju više obrazovanje i viši socioekonomski status. Unatoč ovim kritikama, postoji velik broj dokaza iz animalnih i humanih istraživanja koje podupiru vezu između redovitog umjerenog konzumiranja vina i zdravlja (Guilford i Pezzuto, 2011). Pod umjerenom konzumacijom vina smatra se 150 mL vina za žene, odnosno 300 mL vina za muškarce prema Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi i Ministarstvu poljoprivrede Sjedinjenih američkih država (engl. USDHHS - U.S. Department of Health and Human Services; engl. USDA - U.S. Department of Agriculture, 2015).

Znanstvena istraživanja potaknuta Francuskim paradoksom dovela su, tijekom više od dva desetljeća, do otkrića velikog broja spojeva s potencijalnim pozitivnim učincima za zdravlje te zaključaka da poželjni kardioprotektivni učinci proizlaze iz kombiniranog, aditivnog ili sinergističkog djelovanja alkohola i drugih sastojaka vina na aterogenezu, koagulaciju i fibrinolizu (Lippi i sur, 2010).

2.1.5. Sastav vina

Glavni sastojci vina su voda i alkohol. Okus i osjećaj punoće vina u ustima potječe uglavnom od spojeva čije koncentracije pojedinačno prelaze 100 mg/L: vode, etanola, organskih kiselina, šećera i glicerola. Manje zastupljene komponente vina kreću se u koncentracijama od 1 ng/L do 10 mg/L te u takvim količinama pojedinačno imaju malu ili uopće nemaju ulogu u organoleptičkoj percepciji vina, ali, kolektivno, njihova uloga može biti značajna (Soleas, 1997).

2.1.5.1. Voda

Voda potječe od grožđanog soka i predstavlja 80-85% ukupne mase vina. Neophodna je za mnoge kemijske reakcije uključene u rast grožđa, fermentaciju i starenje vina. Tvari netopljive u vodi rijetko imaju važnu ulogu u vinu (Soleas, 1997).

2.1.5.2. Alkohol

Najzastupljeniji alkohol u vinu je etanol koji se, pri standardnim uvjetima fermentacije, može akumulirati u vinu do koncentracije od gotovo 16% (v/v), ali najčešće varira u rasponu od 10-13% (v/v) što ovisi o koncentraciji šećera u grožđu, temperaturi i soju kvasca. Za vinarsku praksu najznačajnije su vrste kvasaca iz roda *Saccharomyces*. Etanol je važan za stabilnost, starenje i senzorska svojstva vina. Kako mu koncentracija raste, tako raste i njegovo inhibicijsko djelovanje na većinu mikroorganizama što omogućuje *Saccharomyces cerevisiae,* osobito izdržljivog u nepovoljnim uvjetima poput visokog udjela etanola i organskih kiselina te niskih pH-vrijednosti (Albergaria i Arneborg, 2016), dominaciju u procesu fermentacije. Visoki udio etanola povećava trajnost gotovog proizvoda, djeluje kao ekstrakcijsko sredstvo za tanine i pigmente te utječe na metabolizam kvasaca i sintezu aromatičnih spojeva. Tijekom fermentacije i starenja vina, ovaj alkohol je esencijalan reaktant u proizvodnji hlapljivih komponenata vina (Soleas, 1997).

Ostali manje zastupljeni alkoholi u vinu su: metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol i glicerol. Metanol nastaje enzimskom razgradnjom pektina, stoga pektolitički enzimi, koji se dodaju vinu da potpomognu bistrenje vina, nezaobilazno utječu na povećanje koncentracije metanola. Koncentracija metanola u vinu uglavnom varira 0,1-0,2 g/L. Glicerol je najzastupljenija tvar u vinu nakon vode i etanola, minimalne koncentracije 5 g/L. Za razliku od metanola, viši alkoholi, kao i glicerol, imaju važnu ulogu u formiranju organoleptičkih svojstava vina (Soleas, 1997).

2.1.5.3. Kiseline

Kiseline mogu potjecati iz grožđa, ili nastaju kao produkti alkoholne ili malolaktične fermentacije. U vinu su zastupljene u rasponu od 0,4-1% (w/v), a dijele se na hlapljive i nehlapljive. Octena kiselina je najzastupljenija među hlapljivim kiselinama, a djelomično nastaje u procesu fermentacije djelovanjem kvasaca. Takva, tzv. fiziološka octena kiselina, nalazi se u vinu u rasponu od 0,2-0,4 g/L. Iznad te vrijednosti, octenu kiselinu iz etanola

proizvode bakterije octenog vrenja pa kad njena koncentracija prijeđe 0,7 g/L, smatra se da je vino sumnjive kvalitete. Najzastupljenija od organskih kiselina koje potječu iz grožđa je vinska kiselina, nehlapljiva kiselina koja služi kao baza za mjerenje ukupne kiselosti vina, zatim slijede jabučna i limunska kiselina. Kiseline koje nastaju kao nusprodukt fermentacije su jantarna, mliječna i octena kiselina (Soleas, 1997).

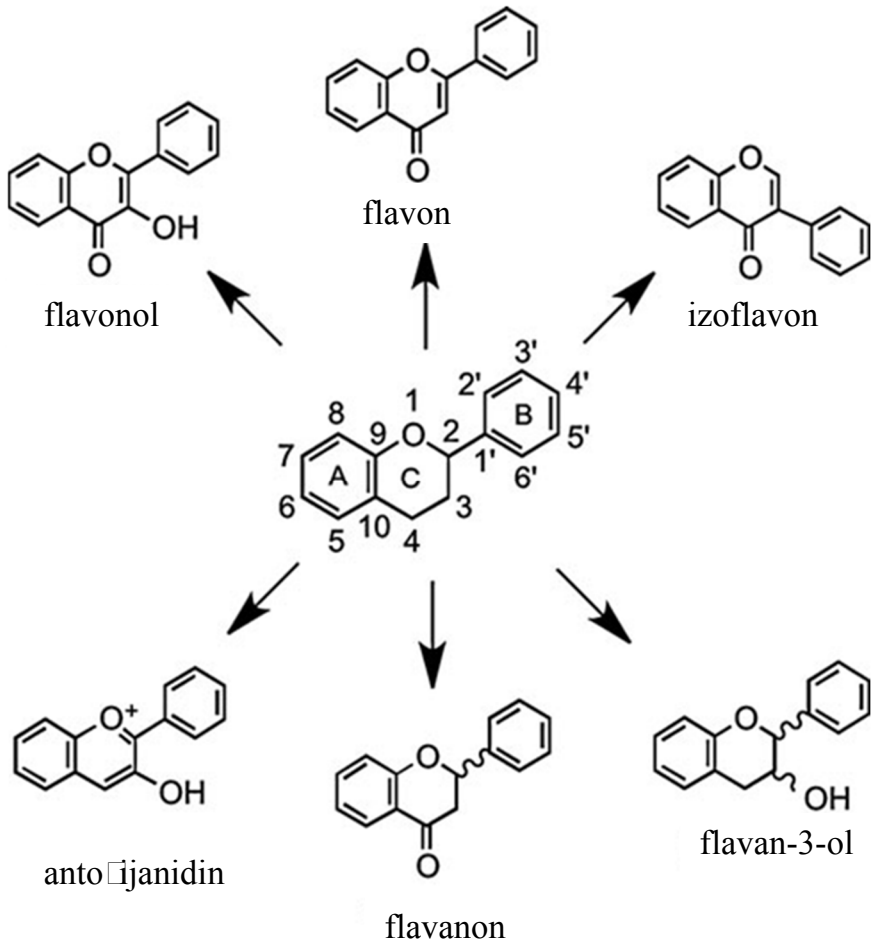
2.1.5.4. Šećeri

Glavni šećeri grožđa su glukoza i fruktoza koji se u zrelom grožđu nalaze u podjednakim koncentracijama. U sortama vrste *Vitis vinifera* rijetko se može naći saharoza, dok sorte drugih vrsta, primjerice *Vitis rotundifolia* i *Vitis labrusca*, mogu sadržavati do 10% (w/v) saharoze. Saharoza se tijekom fermentacije enzimski razgrađuje do fruktoze i glukoze koje se dalje metaboliziraju do etanola, viših alkohola, estera masnih kiselina i aldehida, sve komponenata koje utječu na aromu vina. Tragovi rezidualnog šećera, 0,1%, (w/v), mogu se naći u suhim vinima, a najčešće se radi o pentozama poput arabinoze, ramnoze i ksiloze. Kod slatkih vina udio šećera može biti do 10% (w/v) (Soleas, 1997).

2.1.5.5. Biološki aktivni spojevi

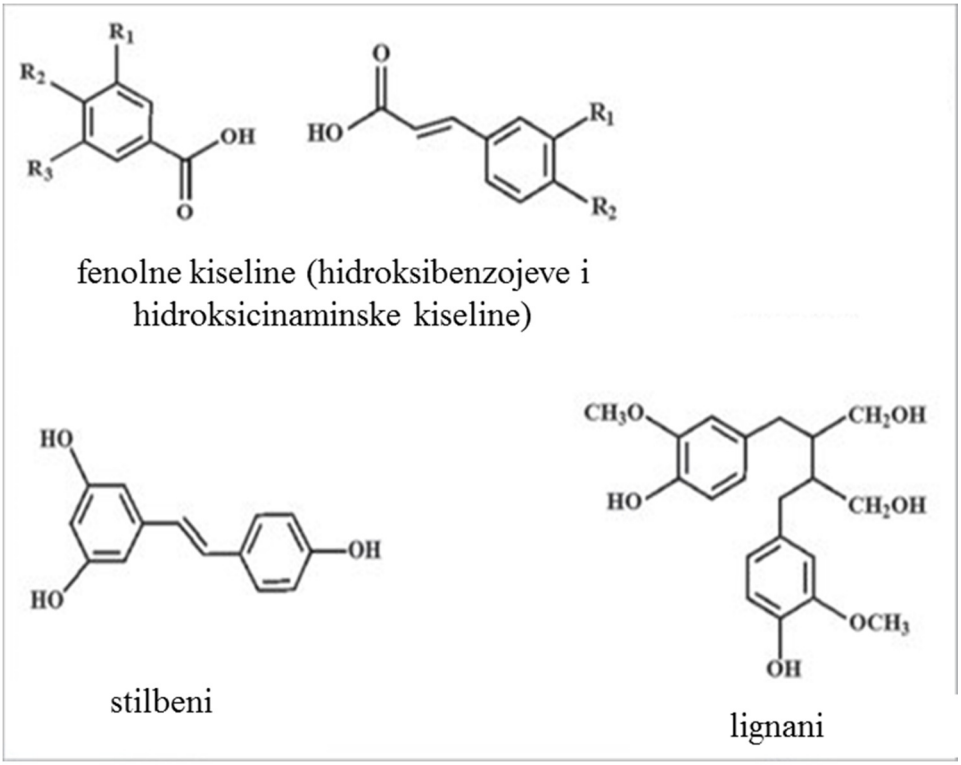
Vino je kompleksan matriks koji sadrži mnoge spojeve od biološkog interesa. Među njima, naročitu pažnju znanstvene zajednice u posljednje vrijeme privlače biljni metaboliti, fenoli. Izrazi fenoli i polifenoli odnose se na sve prirodne sekundarne metabolite koji biogenetski potječu od šikimat-fenilpropanoid-flavonoid sintetskih puteva kojima se proizvode monomerni i polimerni fenoli i polifenoli (Lattanzio i sur., 2006). Fenoli su spojevi koji sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih za benzen. U jestivim biljkama identificirano je više od 8000 fenola, a mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide (Fraga i sur., 2010).

Flavonoidi imaju zajedničku C6-C3-C6 strukturu koja se sastoji od dva aromatska prstena povezana s trećim oksigeniranim heteroprstenom (Slika 2). Flavonoidi se dalje mogu podijeliti na podskupine ovisno o tome s kojim ugljikovim atomom C prstena je povezan B prsten: izoflavoni su fenoli kod kojih je B prsten povezan s ugljikom na položaju 3 C prstena. Kod ostalih je flavonoida B prsten povezan s ugljikom na položaju 2 prstena C, a s obzirom na stupanj oksidacije oksigeniranog heteroprstena, ovi se spojevi mogu dalje podijeliti na flavanole, flavanone, flavone, flavonole i antocijanidine.



Slika 2. Osnovna molekulska struktura i podjela flavonoida (Del Rio i sur., 2013).

Među neflavonidima ističu se stilbeni sa zajedničkom strukturom C6-C2-C6 koja se sastoji od dva aromatska prstena povezana mostom kojeg sačinjavaju dva ugljikova atoma i dvostruka veza. Osim stilbena, u ovu skupinu spadaju još i lignani te jednostavni fenoli: hidroksicinamati i hidroksibenzoati (Slika 3).



Slika 3. Molekulske strukture i podjela neflavonoida (Pandey i Rizvi, 2009).

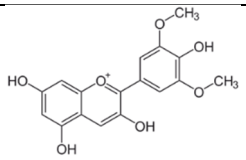
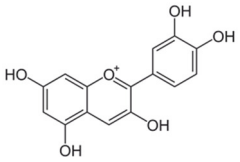
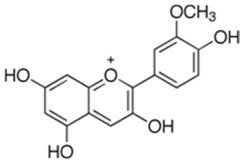
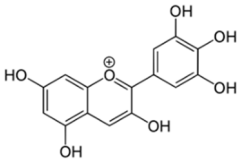
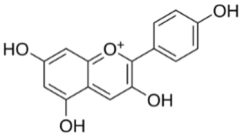
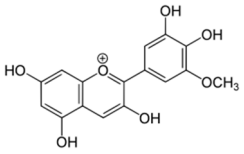
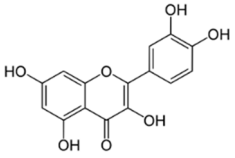
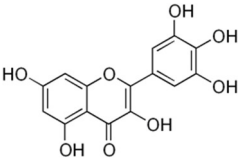
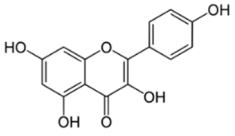
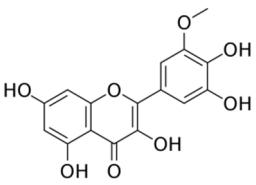
Biljke proizvode fenole kao sekundarne metabolite koji su uključeni u različite procese, poput rasta, lignifikacije, pigmentacije, oprašivanja, ali koji omogućuju i obranu od patogena, biljojeda, kompetitivnih biljaka i okolišnih stresnih učinaka (Duthie i sur., 2003). Biljke se brane od patogena na dva načina: koristeći unaprijed sintetizirane fenolne spojeve s antimikrobnim djelovanjem pohranjene u različitim dijelovima biljke (najčešće u epidermalnim stanicama ili na površini biljke) ili pokretanjem biosintetičkih procesa za proizvodnju navedenih spojeva nakon što je napad patogena već počeo. Čini se da gorki okus fenola djeluje odbijajuće na biljojede i tako štiti biljku od opasnosti da bude pojedena. Također, postoje dokazi da fenolni spojevi utječu na protok organskih i anorganskih nutrijenata u biljkama. Različite vrste topljivih fenola stimuliraju ili inhibiraju germinaciju spora i rast hifa kod saprofitnih gljiva. Kolonizacija mikoriznih gljiva, unos nutrijenata i rast mogu biti smanjeni zbog prisutnosti fenolnih spojeva koje izlučuju kompetitivne biljne vrste. Među okolišnim stresnim učincima, najviše je opisano UV-zaštitno djelovanje flavonoida. Flavonoidi najjače apsorbiraju UV-svjetlost valnih duljina 250-270 nm i 335-360 nm što ih čini dobrim UV-filterima. Na ovaj način sprečavaju mutagenezu i staničnu smrt onemogućujući dimerizaciju timina i fotodestrukciju NADP-a koji imaju apsorpcijski maksimum pri 260 nm (Lattanzio i sur., 2006).

Zdravstveni učinci fenolnih spojeva uglavnom se pripisuju antioksidacijskim svojstvima koja ovise o broju, reaktivnosti i položaju njihovih aromatskih hidroksilnih skupina (Chen i sur., 1996), a antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva smatra se učinkovitijim od djelovanja vitamina C, E i karotenoida (Dai i Mumper, 2010). Međutim, opisana su i druga svojstva fenola, poput sposobnosti interakcije sa staničnim membranama te interakcija s enzimima, transkripcijskim faktorima i receptorima, koja im omogućuju pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje (Fraga i sur., 2010).

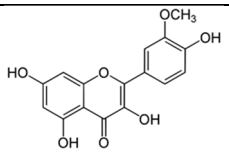
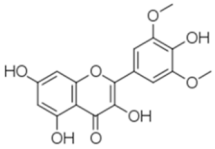
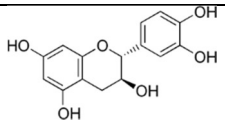
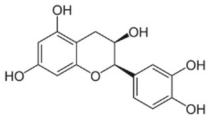
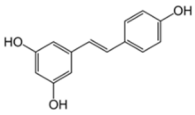
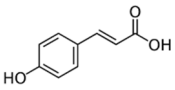
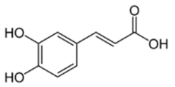
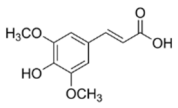
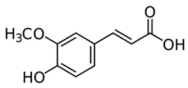
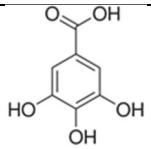
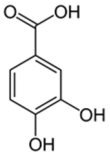
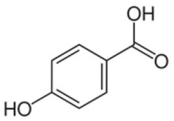
U ljudskoj prehrani najzastupljeniji fenolni spojevi su flavonoidi te se procijenjuje da ih dnevno unosimo do 650 mg. Prosječan unos glavnih flavonoida u prehrani, flavonola (miricetina, kvercetina i kaempferola) te flavona (luteolina i apigenina), iznosi 23 mg/dan, od čega se približno 70% odnosi na kvercetin, 17% na kaempferol i 6% na miricetin (Liu, 2013). Grožđe je jedan od najbogatijih izvora fenola među voćem. Među fenolima grožđa najzastupljeniji biološki aktivni fitonutrijenti su flavonoidi koji se većinom nalaze u kožici ploda. Međutim, procjenjuje se da se 60-70% ukupnih fenola nalazi u sjemenci grožđa. Stoga svaka enološka praksa koja produljuje kontakt mošta i masulja povećava koncentraciju fenola u vinu. Najčešći flavonoidi grožđa su: antocijani (derivati malvidina, cijanidina, peonidina, delfinidina, pelargonidina i petunidina), flavonoli (kvercetin, miricetin, kaempferol, laricitrin, izoramnetin i siringetin), flavanoli (katehin i epikatehin) i proantocijanidini (kondenzirani tanini) (Georgiev i sur., 2014). Među neflavonoidima u grožđu ističe se stilben resveratrol te jednostavni fenoli: hidroksicinamati (derivati *p*-kumarinske, kavene, sinapinske i ferulinske kiseline) i hidroksibenzoati (derivati galne, protokatehinske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline) (Tablica 2). Većina flavonoida, osim katehina, u biljkama se nalaze u obliku glikozida. Međutim, aglikani se lako apsorbiraju kroz stijenku crijeva, dok se glikozidi flavonoida moraju prvo prevesti u svoj aglikanski oblik (Kumar i Pandey, 2013). Vino je najznačajniji izvor aglikanskih flavonoida u ljudskoj prehrani.

U vinu su pronađeni i drugi potencijalno blagotvorni spojevi koji ne potječu iz grožđa, poput vanilinske kiseline, koja u vino prelazi iz hrastova drveta od kojeg su izrađene bačve, te tirosola, hidroksitirosola i melatonina koji nastaju djelovanjem kvasaca tijekom alkoholne fermentacije.

Tablica 2. Kemijska struktura i zastupljenost flavonoida i neflavonoida u grožđu.

Skupina	Podskupina	Primjeri	Kemijska struktura	Zastupljenost u grožđu
Flavonoidi	antocijani	malvidin		kožica
		cijanidin		
		peonidin		
		delfinidin		
		pelargonidin		
		petunidin		
	flavonoli	kvercetin		kožica
		miricetin		
		kaempferol		
		laricitrin		

Tablica 2. (nastavak) Kemijska struktura i zastupljenost flavonoida i neflavonoida u grožđu.

Skupina	Podskupina	Primjeri	Kemijska struktura	Zastupljenost u grožđu
Flavonoidi	flavonoli	izoramnetin		kožica
		siringetin		
	flavanoli	katehin		sjemenka, kožica
		epikatehin		
Neflavonoidi	stilbeni	resveratrol		kožica
	hidroksicinaminske kis.	*p*-kumarinska kis.		kožica, meso
		kavena kis.		
		sinapinska kis.		
		ferulinska kis.		
	hidroksibenzojeve kis.	galna kis.		sjemenka, kožica
		protokatehinska kis.		
		p-hidroksibenzojeva kis.		

2.1.5.6. Utjecaj terroira na kemijski sastav vina

Francuski izraz *terroir* opisuje interaktivni sustav koji uključuje ne samo klimu, tlo i lozu, o kojima ovisi kvaliteta, okus i stil vina, već i socioekonomske uvjete, povijest, vitikulturnu i enološku praksu neke vinorodne regije (van Leeuwen i Seguin, 2006).

Razvoj ploda vinove loze odvija se u nekoliko faza: pupanje (između druge polovice ožujka i druge polovice svibnja), cvjetanje (do druge polovice srpnja) i zrenje (koja završava berbom u rujnu) (Nicholas i sur., 2011). Kemijski sastav grožđa podložan je promjenama klimatskih uvjeta tijekom svake od navedenih faza (prvenstveno temperature, svjetlosti i vlage) te ovisan o svojstvima tla na kojemu se loza uzgaja. Biosinteza tanina započinje prije zrenja i dostiže maksimum u vrijeme početka zriobe, dok sinteza flavonoida započinje prije početka zrenja i nastavlja se tijekom zrenja. Promjene tijekom zrenja uključuju nakupljanje antocijana (u crnom grožđu), komponenata arome, tanina, šećera i minerala (Ivanova i sur., 2011).

Sezona rasta započinje kad temperatura dosegne 10°C, a idealni temperaturni raspon tijekom rasta je 12-22°C (Fraga i sur., 2014; Lorenzo i sur., 2013). Više temperature ubrzavaju metaboličke procese u grožđu i mogu ubrzati berbu. Međutim, temperature iznad 25°C usporavaju fotosintezu, dok se metabolički procesi i nakupljanje šećera mogu zaustaviti na temperaturama iznad 30°C (Mira de Orduña, 2010). Suvišak ili nedostatak vode također imaju važan utjecaj na sastav grožđa. Ukoliko vode ima dovoljno, biljka će trošiti više energije na proizvodnju listova i rast, no u slučaju blagog nedostatka vode, šećer nastao fotosintezom pohranjivat će se u bobicama (Kamsu-Foguem i Flammang, 2014). U slučaju nedostatka vode, smanjuje se volumen bobice i povećava omjer površine i volumena bobice što dovodi do povećanja masenog udjela fenolnih spojeva lociranih u kožici ploda. Unatoč tome što postoje istraživanja o utjecaju nedostatka vode na biosintezu fenolnih spojeva (Ojeda i sur., 2002; Rodriguez-Montealegre i sur., 2006), još je uvijek nejasno da li dostupnost vode ima izravan učinak na biosintezu fenola u grozdu ili, neizravno, na promjene u razvoju bobice. Najčešće istraživani okolišni faktori koji utječu na kvalitetu grožđa su: svjetlost, voda i temperatura. Rezultati istraživanja o njihovom utjecaju na fizikalne i kemijske parametre crnog grožđa sažeti su u Tablici 3.

Tablica 3. Utjecaj okolišnih faktora na fizikalne i kemijske parametre crnog grožđa ovisne o zrenju (Kuhn i sur., 2014).

	Težina/volumen ploda	**°Brix**	**Antocijani**	**Flavonoli**
Nedostatak vode	↓↑=	↑=	↑=↓	=↓
UVB zračenje	↓	=	↑	↑
Niska temperatura	-	↑	↑↓	-
Visoka temperatura	↓	↓	↓	↓=
Izloženost svjetlu	=↑	=↓	↑=	↑

↑ povećava se; ↓ smanjuje se; = bez promjene; - nema literaturnih podataka

Vinova loza može rasti na različitim dobro dreniranim tlima. Tla bogata šljunkom imaju dobru drenažu i brzo se zagrijavaju, što ubrzava zrenje grožđa (van Leeuwen i Seguin, 2006). Tla od ilovače, koja se sastoje od 20-50% gline i 50-80% pijeska su vrlo dobra za uzgoj loze. Vapnenačka tla daju niske prinose, ali visoku kvalitetu grožđa. Općenito, neplodna tla s većim udjelom i većom raznolikošću anorganskih iona utječu na povećanje biosinteze flavonoida (Li i sur., 2011).

2.1.6. Prehrambena zastupljenost i nutraceutička svojstva odabranih fenolnih spojeva

Kvercetin (5,7,3',4'-flavon-3-ol) je jedan od najzastupljenijih flavonoida u ljudskoj prehrani čiji se dnevni unos procjenjuje na 25-50 mg/osobi. Osobito visoke koncentracije ovog flavonola nađene su u luku i kelju (>100 mg/kg), (Formica i Regelson, 1995). Koncentracije kvercetina u vinu kreću se od 0,5-28,5 mg/L u crnom te od 0-1,2 mg/L u bijelom vinu (de Beer i sur., 2002). Kvercetinu se pripisuju kardioprotektivna, antibakterijska i antivirusna svojstva, kao i antioksidacijska, antiproliferacijska, proapoptotična i protuupalna svojstva koja ga čine važnim protutumorskim agensom (Russo i sur., 2012., Gupta i sur., 2016). Navedeni zdravstveni učinci kvercetina povezani su sa sposobnošću moduliranja aktivnosti brojnih enzima uključenih u prijenos signala, stanični rast i biotransformaciju. Snažna antioksidacijska svojstva kvercetina povezuju se i s njegovim neuroprotektivnim i antidijabetičkim učincima. Inhibicijom enzima ksantin oksidaze, kvercetin utječe na sniženje serumskih urata čime se smanjuje rizik razvoja gihta (Gupta i sur., 2016).

Miricetin (3,3',4',5,5',7-heksahidroksiflavon) je, za razliku od kvercetina, manje zastupljen u ljudskoj prehrani, a može ga se naći u bobičastom voću, grejpu, povrću, čaju i crnom vinu. Miricetinu se pripisuju protuupalno, antivirusno, antimikrobno, antioksidacijsko, neuroprotektivno, kardioprotektivno i hepatoprotektivno djelovanje (Angelone i sur., 2011; Semwal i sur., 2016). Ispitivanja su pokazala da miricetin usporuje proces starenja uzrokovanog UVB zračenjem, inhibira enzime uključene u inicijaciju i progresiju tumora te djeluje citotoksično na stanice raka kože, jetre, gušterače i crijeva. Miricetin također inhibira agregaciju trombocita, snižava krvni tlak, modulira imunološki odgovor poticanjem sinteze antitijela, aktivan je protiv paradentoze i reumatoidnog artritisa, te djeluje antialergijski i analgezijski (Semwal i sur., 2016). Koncentracija miricetina u vinu kreće se od 0,2 mg/L do 8,4 mg/L (McDonald i sur., 1998)

Kaempferol (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on) je flavonol široko rasprostranjen među biljkama, a osobito je zastupljen u brokuli, kupusu, kelju i čaju. Procjenjuje se da prosječan dnevni unos kaempferola u ljudskoj prehrani doseže 10 mg (deVries i sur., 1997). Kaempferol pokazuje snažno antioksidacijsko djelovanje smanjujući nivo superoksidnog aniona, hidroksilnog radikala i peroksinitrita. Također, kaempferol inhibira aktivnost enzima uključenih u stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, sprječava peroksidaciju lipida i povećava aktivnost enzima uključenih u odgovor organizma na oksidacijski stres. Dokazano je njegovo protuupalno i protutumorsko djelovanje. Kaempferol također djeluje antivirusno, a u sinergiji s antibioticima i antibakterijski. Istraživanja su pokazala protektivne učinke na kardiovaskularni sustav, antidijabetičku aktivnost i fitoestrogeno djelovanje kaempferola (Calderón-Montaño i sur., 2011).

Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozid) je flavonol osobito zastupljen u heljdi, jabukama i čaju. Dokazano je njegovo antioksidacijsko, citoprotektivno, vazoprotektivno, antikancerogeno, neuroprotektivno, kardioprotektivno, hepatoprotektivno i antimikrobno djelovanje (Ganeshpurkar i Saluja, 2017). Pronađen je i u crnom vinu gdje mu se koncentracije kreću od 0,9-10,3 mg/L (Garaguso i sur., 2015; Sen i Tokatli, 2014).

Katehin ((2~{S},3~{R})-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-2~{H}-kromen-3,5,7-triol) je flavan-3-ol najzastupljeniji u čaju (crnom, zelenom), no može ga se, između ostalog, naći i u kakau, čokoladi, borovnicama, ogrozdu, kiviju, jagodama, jabukama i crnom vinu. Koncentracije katehina u čaju kreću se od 102-418 mg/L, dok se u crnom vinu nalazi u nešto

nižim, al još uvijek značajnim koncentracijama (27-96 mg/L) (Arts i sur., 2000). Farmakološko djelovanje katehina uključuje antikancerogeno, antimutageno, antiproliferativno, protuupalno, antioksidacijsko, kemopreventivno, antidijabetičko, antialergijsko, antihipertenzivno, hipokolesteremično, neuroprotektivno, antitrombogeno i antiangiogeno djelovanje (Sutherland i sur., 2006).

Resveratrol (3,5,4'-trans-trihidroksistilben) pripada skupini stilbena i smatra se najučinkovitijim fenolom u vinu. Za razliku od drugih fenola, koji se mogu naći i u drugim namirnicama, poput katehina u zelenom čaju, voću, povrću i čokoladi, kvercetina u jabukama i luku, te kaempferola u kupusu, resveratrol se u zapadnjačkoj prehrani može naći u značajnim koncentracijama samo u grožđu te, posljedično, u crnom vinu (Biagi i Bertelli, 2015). Resveratrol se u grožđu nalazi u sjemenkama i kožici, ali ne i u mesu ploda. Stoga je njegova koncentracija najveća u crnom vinu gdje su kožica ploda, a često i koštica, u kontaktu s moštom tijekom čitave fermentacije. Koncentracija resveratrola u vinu ovisi o sorti grožđa, geografskom podrijetlu, klimatskim i agronomskim faktorima, stresnim uvjetima za biljku te enološkoj praksi. Među stresnim uvjetima, napad patogena, tretman kemijskim sredstvima prije berbe te UV-zračenje dovode do najznačajnijeg porasta koncentracije resveratrola u grožđu i vinu (Fernandez-Mar i sur., 2012). Koncentracija resveratrola u vinu varira od 0,1 – 14,3 mg/L (Artero i sur., 2015).

Resveratrolu se priprisuju brojni zdravstveno poželjni učinci. Dokazano je protutumorsko djelovanje resveratrola u smislu sprečavanja karcinogeneze u tri faze razvoja tumora: inicijacije (transformacije), promocije (aktivacije) i progresije (Seeram i sur., 2004). Resveratrolu se pripisuje produljenje životnog vijeka različitih organizama što ga čini mogućom djelatnom tvari u liječenju ljudskih bolesti povezanih sa starenjem. Istraživanja su pokazala da ovaj spoj može također štititi od dijabetesa i neurodegenerativnih oštećenja te da ima protuupalni i kardioprotektivni potencijal jer inhibira ekspresiju upalnih medijatora i sprečava adheziju monocita na krvne endotelne stanice (Giovinazzo i Grieco, 2015). Važnost konzumacije vina naglašena je činjenicom da se resveratrol najbolje apsorbira kada je unesen putem vina. Farmakokinetičke studije pokazale su da su koncentracije resveratrola u plazmi bile vrlo niske ili čak ispod granice detekcije nakon oralne administracije velikih doza čistog spoja (do 5 g) u obliku tableta (Brown i sur., 2010). S druge strane, prilikom konzumacije vina postižu se koncentracije do maksimalno 1 μmol/L resveratrola u plazmi (Walle, 2011). Kardioprotektivni učinci resveratrola zapaženi su čak i pri takvim malim koncentracijama (Biagi i Bertelli, 2015).

Ferulinska kiselina (3-metoksi-4-hidroksicinaminska kiselina) je sveprisutna biljna komponenta koja nastaje kao nusprodukt metabolizma fenilalanina i tirozina. Najčešće se nalazi u lišću i sjemenkama, bilo kao slobodna, bilo kao kovalentno vezana za lignin i druge biopolimere. Pronađena je, među ostalim, u pšenici, ječmu, zobi, kavi, rajčicama, šparogama, bobičastom voću, maslinama i citrusima (Graf, 1992). U crnom vinu koncentracija joj se kreće od 0,4 mg/L do 4 mg/L (Garaguso i sur. 2015; Sen i Tokatli, 2014). Antioksidacijski potencijal ferulinske kiseline objašnjen je činjenicom da apsorbira UV-svjetlost čime se katalizira sinteza stabilnog fenoksi radikala i zaustavlja lančana reakcija nastanka slobodnih radikala. Postoje izvješća o njenom antimikrobnom, protuupalnom, antitrombogenom, protutumorskom i kardioprotektivnom učinku. Također štiti od koronarnih bolesti i povećava vijabilnost spermija. Zbog ovih svojstava i niske toksičnosti, uporaba ferulinske kiseline široko je rasprostranjena u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Ou i Kwok, 2004).

Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) pripada skupini hidroksibenzojevih kiselina, a najzastupljenija je u čaju. Galna kiselina je slabo zastupljena u mladim vinima, a nastaje hidrolizom galat estera iz hidrolizirajućih tanina (porijeklom iz hrastovog drveta) i kondenziranih tanina (porijeklom iz koštice grožđa) nakon barem nekoliko mjeseci stajanja. U starijim je vinima galna kiselina stabilna, a koncentracija joj se kreće oko 70 mg/L u crnim i oko 10 mg/L u bijelim vinima (Waterhouse, 2002).

Galna kiselina posjeduje različita terapijska svojstva, uključujući antioksidacijska, protuupalna, antifungalna, antivirusna (Georgiev i sur., 2014), protutumorska (Kaur i sur., 2009), antitrombogena (Lim i sur., 2004), antimelatogena (Kim, 2007) te kardioprotektivna svojstva (Priscilla i Mainzen Prince, 2009).

Vanilinska kiselina (4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina) je oksidirani oblik vanilina koji se koristi kao aroma u prehrambenoj industriji te kao međuprodukt u proizvodnji vanilina iz ferulinske kiseline. Dokazana su antioksidacijska (uklanjanje slobodnih radikala, sprečavanje peroksidacije lipida), kemopreventivna, protuupalna, analgezijska i antimikrobna svojstva vanilinske kiseline (Calixto-Campos i sur., 2015) kao i njeno hepatoprotektivno (Itoh i sur., 2009) i nefroprotektivno djelovanje (Sindhu i sur., 2015). U crnom vinu koncentracije vanilinske kiseline kreću se od 4 do 11 mg/L (La Torre i sur., 2006; Sen i Tokatli, 2014).

Hidroksitirosol (2-(3,4-dihidroksifenil)etanol) i **tirosol** (2-(4-hidroksifenil)etanol) su fenilalkoholi prisutni u maslinovom ulju i vinu. I tirosol i hidroksitirosol smatraju se sekundarnim metabolitima koji nastaju transformacijom aminokiseline (tirozina) djelovanjem kvasaca tijekom alkoholne fermentacije (Garrido i Borges, 2013). U crnom vinu se hidroksitirosol može naći u koncentracijama od 1,7 - 4,2 mg/L. Dokazano je izravno antioksidacijsko (uklanjanje peroksil, hidroksil i ostalih slobodnih radikala, reaktivnih dušikovih vrsta, superoksidnih aniona i sprečavanje nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta) (Cornwell i Ma, 2008) kao i neizravno antioksidacijsko djelovanje hidroksitirosola (aktivacija antioksidacijskih enzima) (Oliveras-Lopez i sur., 2008). Brojne studije potvrđuju kardioprotektivno, protutumorsko, antimikrobno, antidijabetičko i neuroprotektivno djelovanje hidroksitirosola. Tirosol posjeduje antioksidacijska (uklanjanje reaktivnih dušikovih vrsta i superoksidnih aniona), protuupalna, kardioprotektivna i neuroprotektivna svojstva te utječe na nivo LDL u krvi (Fernandez-Mar i sur., 2012). U crnom vinu koncentracija tirosola kreće se od 20 – 45 mg/L (Piñeiro i sur., 2011).

2.1.7. Prehrambena zastupljenost i nutraceutička svojstva melatonina

Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) je indolamin donedavno smatran neurohormonom kojeg proizvodi hipofiza. S vremenom je otkriveno da i velik broj drugih organa, tkiva i stanica sintetizira melatonin, među kojima probavni sustav, spolni sustav, koža i limfociti. Također je detektiran u velikom broju beskralježnjaka, te u bakterijama, gljivama, algama i biljkama (Tan i sur., 2012). Među jestivim biljaka, znatne količine melatonina nađene su u riži, kukuruzu, jagodi, kiviju, bananama, ananasu, jabuci i rajčici. Melatonin je također pronađen u maslinovom ulju, vinu i grožđu. Rodriguez-Naranjo i sur. (2011) su utvrdili da je *Saccharomyces cerevisiae* presudan za stvaranje melatonina u vinu. Dosadašnja istraživanja izvjestila su o širokom rasponu koncentracija melatonina u vinu (Meng i sur., 2017), što je vjerojatno posljedica varijetalnih razlika i razlika u tehnologiji proizvodnje vina, ali također i razlika u metodologiji analize melatonina u vinu.

Dokazano je antioksidacijsko djelovanje (smanjivanje koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta, inhibicija prooksidacijskih enzima, aktivacija antioksidacijskih enzima), protutumorsko djelovanje (inhibicija proliferacije tumorskih stanica), imunomodulacijsko i neuroprotektivno djelovanje melatonina (Fernandez-Mar i sur., 2012).

2.1.8. Makroelementi, mikroelementi i elementi u tragovima

Elementi u vinu nalaze se u širokom rasponu koncentracija: makroelementi, K, Ca, Mg i Na, zastupljeni su u koncentracijama od 10 – 1000 mg/L. U mikroelemente se ubrajaju Al, Cu, Zn, Mn i Fe s koncentracijskim rasponom od 0,1 – 10 mg/L. Elementi u tragovima u vinu su Cd, Co, Cr, Ni, Pb i V s koncentracijama nižim od 0,1 mg/L (Pohl, 2007).

Navedeni elementi potječu od prirodnih, tzv. primarnih, izvora i antropogenih, tzv. sekundarnih, izvora. Elementi iz prirodnih izvora su najzastupljeniji, a potječu iz zemlje na kojoj loza raste i u vino dospijevanju preko grožđa. Njihova koncentracija ovisi o sorti, zrelosti grožđa, vrsti tla i klimatskim uvjetima tijekom rasta loze (Pohl, 2007).

Sekundarni izvori elemenata u vinu su nečistoće koje u vino dospijevaju uslijed antropogenih utjecaja bilo tijekom uzgoja loze (upotreba gnojiva, pesticida i fungicida), zagađenja okoliša i enološke prakse (kontakt vina s materijalima od kojih je napravljena oprema za proizvodnju vina, kao i s bačvama za čuvanje vina) (Pohl, 2007). Upotreba gnojiva, pesticida i fungicida uzrok je povišenim koncentracijama Cu, Zn, Cd, Mn i Pb. Pb i Cd mogu potjecati iz okoliša onečišćenog industrijskim i auto ispustima. Uobičajen izvor Al, Cu, Zn, Cd, Cr i Fe su materijali s kojima vino dolazi u doticaj tijekom proizvodnje i skladištenja. Kontaminacija Al, Ca i Na može potjecati iz enoloških postupaka bistrenja vina tijekom kojih se vinu dodaju flokulanti, poput bentonita (Pohl, 2007; Tariba, 2011).

Ioni Al, Cu, Zn, Mn, Ni i Fe imaju važnu ulogu u oksido-redukcijskim reakcijama u vinu koje utječu na nepoželjne promjene boje, mutnoće, okusa, arome i svježine vina. Cu i Zn su esencijalni elementi za ljudski organizam, ali u suvišku postaju potencijalno toksični (Tariba, 2011). Općenito, umjerena konzumacija vina doprinosi zadovoljenju dnevnih potreba i za drugim esencijalnim elementima, poput Ca, K, Co, Cr, Mg, Mn, Mo, Ni i Fe. S druge strane, As, Cd i Pb su toksični (Pohl, 2007). Stoga je praćenje koncentracije elemenata u vinu neophodno ne samo zbog njihovog utjecaja na boju, aromu, okus i dugoročnu stabilnost vina, već i zbog mogućih zdravstvenih učinaka. Maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) za elemente postavile su Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino te Europska Unija (EU) (Tablica 4).

Profiliranje vina prema koncentraciji prisutnih elemenata (engl. elemental fingerprinting) uspješno se koristi za utvrđivanje zemljopisnog podrijetla vina (Geana i sur., 2013; Kruzlicova i sur., 2013; Šelih i sur., 2014), obzirom da elementi u vinu najvećim dijelom odražavaju elementni sastav tla, čime se omogućuje pouzdanija autentifikacija vina.

Tablica 4. Maksimalno dopuštene koncentracije elemenata u vinu.

Element	Maksimalno dopuštena koncentracija (MDK)	Izvor *	Referenca
As	0,2 mg/L	OIV	International code of oenological practices, 2015
Cd	0,01 mg/L	OIV	International code of oenological practices, 2015
Cu	1 mg/L	OIV	International code of oenological practices, 2015
Pb	0,2 mg/L **	EU	Uredba 2015/1005
Zn	5 mg/L	OIV	International code of oenological practices, 2015

* OIV - fr. Organisation International de la vigne et du vin - Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino; EU - Europska Unija
** za proizvode proizvedene u razdoblju od 2001.-2015.

2.1.9. Prirodni kontaminanti (antinutraceutičke komponente)

Vino je i izvor potencijalno štetnih (antinutraceutičkih) tvari po ljudsko zdravlje, poput biogenih amina i mikotoksina, ponajprije okratoksina A (OTA). Ovi spojevi potječu od mikrobne aktivnosti tijekom rasta grožđa te proizvodnje i skladištenja vina (Ancin-Azpilicueta i sur., 2008; Mariño-Repizo i sur., 2017) .

Biogeni amini (BA) su dušikove baze niske molekularne mase koje najvećim dijelom nastaju dekarboksilacijom odgovarajućih aminokiselina djelovanjem mikroorganizama. U vinu se najčešće nalaze histamin, tiramin, putrescin, kadaverin, spermin i spermidin. Biogeni amini u vinu mogu se naći u rasponu od tragova pa sve do 130 mg/L, a putrescin je obično najzastupljeniji (Soufleros i sur., 1998). Ovi spojevi nastaju tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem kvasaca, te, naročito, tijekom malolaktične fermentacije djelovanjem bakterija mliječne kiseline (Ancin-Azpilicueta i sur., 2008). Koncentracija amina u vinu ovisi o nizu faktora, među kojima su oni povezani s kvalitetom grožđa i oni povezani s tehnikom vinifikacije. U prvoj su kategoriji klima i tlo vinogradarske regije, udio aminokiselina u grožđu (ovisan naročito o upotrebi dušičnih gnojiva) kao i stupanj zrelosti grožđa. U drugu kategoriju ubrajaju se: vrijeme kontakta mošta i kožice grožđa, kao i vrijeme kontakta vina i kvasaca, materijal od kojeg su građene bačve (hrastovo drvo ili nehrđajući čelik) te starenje vina (Landete i sur., 2005; Ferreira and Pinho, 2006; Villamiel i sur., 2008). Zbog utjecaja klime i tla vinogradarske regije na koncentracije biogenih amina u vinu, ovi su kontaminanti predloženi kao markeri geografskog podrijetla vina: sami (Pretti i Vinci, 2016) ili u kombinaciji s ukupnim fenolima (Galgano i sur., 2011) i aminokiselinama (Herbert i sur., 2005).

Histamin i tiramin toksično djeluju na organizam, a metaboliziraju se u jetri djelovanjem dva enzimska kompleksa: monoamin oksidaze (MAO) i diamin oksidaze (DAO). Etanol i acetaldehid, spojevi prisutni u vinu, inhibiraju MAO i DAO, te, stoga, povećavaju toksičnost navedenih amina (ten Brink i sur., 1990). Histamin ima jako vazodilatorno djelovanje što može uzokovati značajan pad krvnog tlaka. Ostali simptomi intoksikacije histaminom su povraćanje, proljev, glavobolje, crvenilo lica, svrbež i upala grla. Tiramin potiče otpuštanje noradrenalina zbog čega ima vazokonstriktorno djelovanje. Osim s posljedičnim povećanjem arterijskog tlaka, tiramin se povezuje i s napadajima migrene (Ancin-Azpilicueta i sur., 2008). S druge strane, poliamini (putrescin, kadaverin, spermin i spermidin) su neophodni za regeneraciju tkiva i rast (Bardocz i sur., 1993). Iako nisu toksični, poliamini mogu inhibirati enzime odgovorne za razgradnju histamina i tiramina te pojačati njihovo toksično djelovanje (Ancin-Azpilicueta i sur., 2008).

Visoka varijabilnost koncentracija biogenih amina u vinu, kao i potencijalni toksični učinci na osjetljive pojedince, uzrok su zabrinutosti u mnogim državama te su uloženi brojni napori za postizanjem bolje kontrole nad stvaranjem biogenih amina u procesu vinifikacije (Costantini i sur., 2009; Del Prete i sur., 2009; Marques i su., 2008). Međutim, Europska Unija (EU) još uvijek nije definirala maksimalno dopuštenu koncentraciju niti za histamin, ni za tiramin. Razlog tome jest nedostatak pouzdanih farmakoloških podataka o kritičnim koncentracijama amina koji stvaraju toksične učinke u različitim populacijama, kao i nedostatak spoznaja o mogućim drugim tvarima u vinu koje mogu otpuštati endogeni histamin (Ancin-Azpilicueta i sur., 2008; Konakovsky i sur., 2011). U nedostatku zakonske regulative, pojedini autori predložili su isticanje koncentracije histamina na etiketi vina kao korisnu smjernicu u donošenju odluke o konzumaciji tog vina za histamin intolerantne osobe (Ancin-Azpilicueta i sur., 2008; Konakovsky i sur., 2011).

Okratoksin A (7-(L-b-fenilalanil-karbonil)-karboksil-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-3*R*-metilizokumarin) je široko rasprostranjeni mikotoksin koji nastaje kao produkt sekundarnog metabolizma nekoliko filamentoznih gljiva iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Pronađen je u različitim namirnicama, uključujući žitarice, vino, grahorice, orašaste plodove, začine, sušeno voće, kavu, mlijeko, pivo, meso i sir. Najznačajniji proizvođač OTA pronađenog u vinu i drugim proizvodima od grožđa je *Aspergillus carbonarius* (el Khoury i Atoui, 2010). Vino je, nakon žitarica, najzastupljeniji izvor OTA u ljudskoj prehrani (JECFA, 2007; SCOOP, 2002).

Koncentracija OTA u vinu ovisi o klimi (osobito o temperaturi i relativnoj vlažnosti u mjesecu prije berbe), o uvjetima uzgoja (uključujući uporabu fungicida), postotku oštećenih

bobica prije maceracije i vrsti maceracije (Mariño-Repizo i sur., 2017). Koncentracija OTA u vinu obrnuto je proporcionalna geografskoj širini vinogradarske regije: niže geografske širine područja uzgoja loze povezane su s većom učestalošću pojave i višim koncentracijama OTA u vinu (Battilani i sur, 2006). Zbog produljenog kontakta između kožice grožđa i mošta, crna vina sadrže veće koncentracije OTA. Ipak, otpuštanje OTA prilikom maceracije nije potpuno i iznosi otprilike 20% (Battilani i sur, 2003), dok fermentacija uzrokuje pad koncentracije OTA vjerojatno zbog adsorpcije OTA na stijenkama kvaščevih stanica (Bejaoui i sur., 2004).

Dokazano je nefrotoksično, neurotoksično, hepatotoksično, teratogeno, imunotoksično i kancerogeno djelovanje OTA (el Khoury i Atoui, 2010). OTA je klasificiran kao mogući humani karcinogen (grupa 2B) (IARC, 1993). Prisutnost OTA u krvi zdravih osoba dokazuje kontinuiranu i široko rasprostranjenu izloženost (Russo i sur., 2016) zbog čega je Europska agencija za sigurnost hrane (engl. EFSA – European Food Safety Agency) 2006. g. utvrdila prihvatljivi tjedni unos (engl. TWI - Tolerable Weekly Intake) od 120 ng OTA/kg tjelesne mase. U EU, maksimalna dozvoljena koncentracija OTA u vinu iznosi 2 μg/kg (Uredba 1881/2006).

2.2. Instrumentalne tehnike u analizi vina

2.2.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija je kvantitativno mjerenje refleksijskih ili transmisijskih osobina tvari kao funkcija valne duljine, a obuhvaća mjerenja u vidljivom (Vis), ultravioletnom (UV) i infracrvenom (IR) dijelu spektra. Apsorpcijom svjetlosti, elektroni u molekuli analita prelaze iz nepobuđenog u pobuđeno stanje. Dio molekule, u kojoj je približno lokaliziran elektronski prijelaz odgovoran za dobivenu spektralnu vrpcu, naziva se kromofor. Intenzitet mjerenog signala u UV/Vis spektru ovisi o tri bitna faktora: koncentraciji analita, duljini puta zrake kroz otopinu (debljini kivete) te efikasnosti kromofora molekule analita da apsorbira svjetlost koja se propušta. Kvantifikacija se temelji na Lambert-Beerovom zakonu, prema kojem je apsorpcija izravno proporcionalna koncentraciji analita i širini kivete:

$$A = - \log_{10}(I_0/I_t) = \varepsilon c l$$

gdje je A apsorbancija, I_0 intenzitet upadnog zračenja, I_t intenzitet propuštenog zračenja, c molarna koncentracija analita, l debljina kivete, a ε je molarni apsorpcijski koeficijent. Molarni apsorpcijski koeficijent je konstanta karakteristična za spoj i prijelaz elektrona koji se odvija prilikom pobude apsorpcijom, a ukoliko je nepoznat, koncentracija nepoznatog analita izračunava se izradom kalibracijske krivulje metodom vanjskog standarda.

2.2.1.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

FRAP metodu (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) razvili su Benzie i Strain (1996). Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo – 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom sudjelovat će u reakciji redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancija pri 595 nm. Rezultati se izražavaju kao mmol/L $FeSO_4$.

DPPH• metoda temelji se na uporabi stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikala. DPPH• radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Prilikom sparivanja nesparenog elektrona DPPH• s vodikom antioksidansa nastaje reducirani oblik DPPH-H pri čemu dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu. Promjena boje u stehiometrijskom je odnosu s brojem sparenih elektrona (Prior i sur., 2005). Rezultati se izražavaju kao mmol/L Trolox ekvivalenta antioksidacijskog kapaciteta (eng. TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity). TEAC se definira kao koncentracija otopine, izražene u mmol/L, u vodi topljivog analoga vitamina E, Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) ekvivalentnog antioksidacijskog kapaciteta kao i 1 mmol/L analiziranog fenolnog spoja.

2.2.1.2. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s odgovarajućim reducirajućim agensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline koja reagira s fenoksid ionom iz uzorka, pri čemu se Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Intenzitet proizašle plave boje proporcionalan je koncentraciji antioksidansa.

2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. HPLC – high performance liquid chromatography) je tehnika u analitičkoj kemiji koja se koristi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata u smjesi. HPLC sustav se sastoji od rezervoara mobilne faze, otplinjača (engl. degaser) mobilne faze, pumpe, autouzorkivača (engl. autosampler) s injektorom, pećnice s kolonom, detektora i računalnog programa za obradu podataka. Mobilna faza se pumpa kroz sustav i sa sobom nosi injektiran uzorak. Komponente uzorka odjeljuju se u kromatografskoj koloni na osnovu njihove različite interakcije sa stacionarnom (punilom u koloni) i mobilnom fazom te detektiraju na detektoru. Najčešći način klasifikacije različitih inačica ove tehnike zasniva se na mehanizmu retencije, tj. na načinu interakcije između analita i stacionarne faze. Prema ovom principu, tekućinska kromatografija može se podijeliti na adsorpcijsku, razdjelnu, kromatografiju isključenjem na osnovi veličine čestica (engl. size-exclusion chromatography), afinitetnu i ionsko-izmjenjivačku kromatografiju. Razdjelna kromatografija (engl. partition chromatography) je najčešće upotrebljavana HPLC tehnika u prehrambenoj industriji, a zasniva se na kompeticiji za neutralne analite između tekuće mobilne faze i neutralne tekuće stacionarne faze. Zbog nestabilnosti tekuće stacionarne faze, prava razdjelna kromatografija se u praksi rijetko koristi. Umjesto toga, razvijene su tzv C_{18} kolone u kojima se dugački alkilni lanci ponašaju poput tekućine. Drugim riječima, proces razdvajanja se smatra razdjelnim kada otopljena tvar – analit prelazi iz obujma jedne faze u obujam druge faze te je unutar svake faze molekula otopljene tvari u potpunosti okružena molekulama jedne faze.

Kod razdjelne kromatografije, zadržavanje analita ovisi o međudjelovanju otopljenih komponenti i stacionarne faze koja može biti posljedica stvaranja vodikovih veza, van der Waalsovih veza te elektrostatskih i hidrofobnih interakcija, kao i kombinacije istih. S obzirom na navedeno, razdjelna kromatografija se može provesti: kao kromatografija s normalnom fazom (engl. normal phase chromatography) i kao kromatografija s obrnutom fazom (engl. reversed phase chromatography). Kod kromatografije s normalnom fazom razdvajanje se odvija između stacionarne faze (npr. silikagela) koja je polarnija od mobilne faze (npr. n-heksana). U takvim će se procesima polarne molekule jače vezati za stacionarnu fazu pa će se manje polarne komponente brže eluirati iz kolone. Kod kromatografija s obrnutom fazom punilo je na bazi silikata s vezanim n-alkilnim (nepolarnim) lancima koji stupaju u interakciju s uzorkom. Mobilna faza je polarnija od stacionarne, a obično uključuje smjesu vode i nekog organskog otapala (npr. metanola ili acetonitrila). U takvim će se procesima nepolarne molekule jače

vezati za stacionarnu fazu pa će se polarne komponente brže eluirati iz kolone. Kromatografija s obrnutom fazom našla je široku primjenu u farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji, zaštiti okoliša i forenzici: u analizi antibiotika, steroida, aminokiselina, proteina, ugljikohidrata, lipida, umjetnih sladila, konzervansa, antioksidansa, boja, aflatoksina, pesticida, herbicida, droga i njihovih metabolita.

Detektori, koji se upotrebljavaju u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti, mogu se podijeliti na selektivne detektore, koji mjere fizikalna ili kemijska svojstva analita, te na univerzalne detektore koji mjere razliku između fizikalnog svojstva mobilne faze koja sadrži otopljeni analit u odnosu na čistu mobilnu fazu. Apsorpcijski detektori (engl. absorption detectors), detektori fluorescencije (engl. fluorescence detectors), elektrokemijski detektori (engl. electrochemical detectors) i maseni spektrometri (engl. mass spectrometry detectors) su selektivni detektori, dok se u univerzalne ubrajaju detektori refrakcijskog indeksa (engl. refractive index detectors) i detektori raspršenja svjetlosti (engl. light scattering detectors).

Maseni spektrometar je detektor koji omogućuje razdvajanje iona na osnovu omjera njihove mase i naboja (m/z). Da bi se uzorak mogao analizirati, analite u njemu potrebno je ionizirati. Ionizacija se može provesti na različite načine, primjerice bombardiranjem elektronima. Proces ionizacije može dovesti do raspada molekule na manje ionizirane fragmente. Ovi ioni zatim se ubrzavaju u elektromagnetskom polju te se razdvajaju tako što ioni istog omjera mase i naboja (m/z) jednako skreću s početne putanje te se na taj način odvajaju od iona drugih omjera mase i naboja. Kvadrupolni filteri masa selektivno stabiliziraju ili destabiliziraju putanju iona te tako u određenom vremenu omogućuju prolaz iona samo određenog omjera mase i naboja kroz filter. Nakon prolaska kroz filter, ioni udaraju u detektor koji mjeri naboj ili struju koja nastaje kada ion prođe uz ili udari u površinu detektora. Rezultati se prikazuju u obliku spektra relativne učestalosti detektiranih iona kao funkcije odnosa mase i naboja. Osim kvantifikacije, ovaj detektor omogućuje i pouzdanu identifikaciju atoma i molekula bilo usporedbom pronađene mase s poznatim masama, bilo usporedbom pronađenog fragmentacijskog uzorka s poznatim tipičnim fragmentacijskim uzorcima.

2.2.3. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija (engl. AAS – atomic absorption spectrometry) je analitička tehnika za kvantitativno određivanje kemijskih elemenata koja se temelji na apsorpciji svjetlosti slobodnih atoma. Apsorpcijom svjetlosti, elektroni u atomima analita prelaze iz nižeg u više energetsko stanje. Selektivnost metode omogućena je specifičnošću

valne duljine apsorbirane svjetlosti (količine apsorbirane svjetlosti) za određeni prijelaz elektrona u određenom elementu tj. valna duljina apsorbirane svjetlosti karakteristična je za pojedini element. Kvantifikacija elemenata provodi se uporabom Lambert-Beerovog zakona kojim se apsorbancija (omjer intenziteta svjetlosti bez prisutnosti analita i intenziteta svjetlosti uz prisutnost analita) dovodi u vezu s koncentracijom analita. Prije analize, uzorke je potrebno atomizirati, tj. atome u uzorku prevesti u slobodno plinovito stanje. Najčešće upotrebljavani atomizatori su plameni i elektrotermalni atomizatori. Plameni atomizatori za atomizaciju koriste visoku toplinu plamena (2300°C za plamen nastao gorenjem acetilena u zraku). To su najčešće upotrebljavani i vrlo robustni atomizatori, nešto slabije osjetljivosti u odnosu na elektrotermalne atomizatore. Tekući uzorak se aspirira, raspršuje u sitne kapljice i uvodi u plamen. Toplina plamena odgovorna je za sušenje, vaporizaciju i atomizaciju uzorka. Tipično mjerno područje za plamene atomske apsorpcijske spektrometre (engl. FAAS – flame atomic absorption spectrometry) je od nekoliko stotina μg/L do nekoliko stotina mg/L.

2.2.4. Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom

Maseni spektrometar s induktivno spregnutom plazmom (engl. ICP MS – inductively coupled plasma mass spectrometer) je selektivna i osjetljiva tehnika koja omogućuje istovremenu detekciju i kvantifikaciju svih elemenata u periodnom sustavu osim onih koji sačinjavaju atmosferske plinove (O, C, N) te onih koji se ne mogu ionizirati argonom (He, Ne i F) (Meija i Caruso, 2004). Osnovne komponente ICP MS-a su: sustav za stvaranje sitnih kapljica (engl. nebuliser), sustav za odvajanje najsitnijih kapljica (engl. spray chamber), sustav za stvaranje plazme (engl. plasma torch), konusne pregrade koje odvajaju dio sustava pod vakuumom od sustava u kojem je atmosferski pritisak (engl. interface cones), komora pod vakuumom (engl. vacuum chamber), ionski optički sustav, analizator masa i detektor. Tekući uzorak pumpa se u nebulizer, gdje se uz pomoć argona raspršuje u sitne kapljice, nakon čega se krupnije kapljice odvajaju u tzv. spray chamber i odlaze u otpad, dok se sitne kapljice transportiraju u tzv. plasma torch. Plasma torch se sastoji od koncentrično postavljenih kvarcnih cijevi u kojima se proizvodi plazma pri visokim temperaturama (7000-10000 K). Plazma se stvara tangencijalnim djelovanjem magnetskog polja na argon, koji protiče kroz plasma torch, što dovodi do njegove ionizacije. Nastala plazma predstavlja ionski izvor koji razgrađuje uzorak do njegovih sastavnih elemenata te ih potom ionizira. Ioni se prolaskom kroz maseni spektrometar odvajaju u elektromagnetskom polju s pomoću kvadrupolnih filtara na osnovu omjera mase i naboja. Udarom u detektor, koji se najčešće sastoji od metalnih dinoda, ioni se

pretvaraju u elektrone koji se u kaskadi udara u dinode multipliciraju i prevode u električni signal koji se potom obrađuje pomoću računalnog programa. ICP MS odlikuje se velikim dinamičkim rasponom (ovisno o elementu) od nekoliko ng/L do više desetaka mg/L.

2.3. Multivarijantne statističke metode u analizi vina

Proizvodnja vina složen je proces koji zahtijeva pomno praćenje kemijskih i fizikalnih svojstava kako sirovine, tako i gotovog proizvoda. Sprječavanje patvorenja vina, potvrda geografskog podrijetla grožđa te praćenje procesnih parametara važni su zadatci u laboratoriju za kontrolu kvalitete vina. Suvremene instrumentalne analitičke tehnike omogućuju prikupljanje velikog broja podataka po jednom uzorku tj. stvaranje velikih skupova podataka. Za analizu odnosa između velikog broja varijabli upotrebljavaju se multivarijantne statističke metode.

2.3.1. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata (engl. PCA – principal component analysis) je najčešće upotrebljavana multivarijantna metoda kojom se matriks opservacija međusobno vjerojatno koreliranih varijabli transformira u novi set nekoreliranih varijabli, tzv. glavnih komponenata. Drugim riječima, PCA stvara linearne kombinacije varijabli kojima se opisuje originalni matriks podataka (Cozzolino i sur., 2009), tzv. glavne komponente. Projekcijom podataka na glavne komponente dobivaju se njihove koordinate, tzv. score podataka. PCA maksimizira varijancu score-ova, a minimizira tzv. rezidualnu varijancu. Prva glavna komponenta je ona kojom se obuhvaća najviše varijabilnosti u setu podataka, dok svaka sljedeća također obuhvaća najviše varijabilnosti u setu podataka, pod uvjetom da je okomita na prethodne komponente. Značajnost svake komponente može se odrediti pomoću svojstvene vrijednosti (eigenvrijednosti) korelacijskog matriksa seta podataka: veća eigenvrijednost označava značajniju glavnu komponentu.

Za potrebe karakterizacije vina, PCA smanjuje multidimenzionalnost seta podataka stvarajući manji broj glavnih komponenata i otkriva moguće grupiranje uzoraka obzirom na sortu, godište berbe i geografsko podrijetlo.

2.3.2. Kanonička diskriminacijska analiza

Kanonička diskriminacijska analiza (engl. CDA – canonical discriminant analysis) je multivarijantna statistička metoda za smanjivanje multidimenzionalnosti seta podataka. CDA omogućuje utvrđivanje onih varijabli iz niza varijabli koje rade razliku među više od dviju prirodno formiranih grupa. Cilj analize je formiranje tzv. kanoničkih diskriminacijskih funkcija koje najbolje razdvajaju grupe, a od kojih je svaka neovisna o ostalima tj. njihovi doprinosi razlikovanju grupa se međusobno ne preklapaju. Kanonička diskriminacijska funkcija je linearna kombinacija kvantitativnih varijabli iz originalnog seta koji ima s jedne strane jednu klasifikacijsku (grupnu) zavisnu varijablu u tri ili više razina, a s druge strane nekoliko nezavisnih kvantitativnih varijabli. Nastale kanoničke diskriminacijske funkcije imaju najveću moguću višestruku korelaciju sa zavisnim varijablama (grupama). Koeficijenti u linearnoj kombinaciji izvornih varijabli su tzv. kanonički koeficijenti koji izražavaju doprinos svake pojedine varijable diskriminacijskoj funkciji tj. što je veći koeficijent, to je veći doprinos određene varijable razlikovanju grupa (Matthew i sur., 1994).

Za potrebe klasifikacije vina, CDA smanjuje multidimenzionalnost seta podataka stvarajući manji broj novih varijabli (linearnih funkcija originalnih varijabli) koje najbolje razdvajaju vina obzirom na unaprijed definirane grupe: sortu, regiju, ZOI i godište berbe.

3.0 MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Komercijalni uzorci crnog vina u staklenim bocama od 0,75 L, svi sa zaštićenom oznakom izvornosti (ZOI), kupljeni su na tržištu Republike Hvatske. Ukupno je prikupljeno 110 uzoraka vina proizvedenih od 7 sorti (3 autohtone i 4 internacionalne), iz 5 godišta berbe (2011.-2015.) i sa 7 ZOI. Sadržaj etanola prema informacijama s etiketa kretao se u rasponu od 11 do 16% (v/v). Uzorcima su dodijeljene oznake od 3 znaka: prvi znak označava sortu, drugi godinu berbe, a treći ZOI. Lista oznaka prikazana je u Tablici 5. Klasifikacija vina prema sorti, godištu berbe i ZOI prikazana je u Tablici 6.

Tablica 5. Lista oznaka za uzorke vina.

Sorta	**Oznaka**	**Godina berbe**	**Oznaka**	**ZOI**	**Oznaka**
Babić	B	2011.	1	Dalm. zagora	Z
Cabernet Sauvignon	C	2012.	2	Dingač	Č
Frankovka	F	2013.	3	Hrv. Istra	I
Merlot	M	2014.	4	Hrv. Podunavlje	P
Pinot crni	N	2015.	5	Sj. Dalmacija	D
Plavac mali	P			Slavonija	S
Teran	T			Sr. i j. Dalmacija	J

Tablica 6. Klasifikacija uzoraka vina prema sorti, regiji, ZOI i godištu berbe.

Sorta	Regija	ZOI	Godište berbe	Br. uzoraka po godištu
Babić	Primorska Hrvatska	Sj. Dalmacija	1-2-3-4-5	1-1-2-1-1
Cabernet Sauvignon	Ist. kont. Hrvatska	Hrv. Podunavlje	3-4-5	2-1-2
Cabernet Sauvignon	Ist. kont. Hrvatska	Slavonija	4-5	2-1
Cabernet Sauvignon	Primorska Hrvatska	Hrv. Istra	1-2-3-4-5	2-1-3-1-3
Cabernet Sauvignon	Primorska Hrvatska	Sj. Dalmacija	2	1
Cabernet Sauvignon	Primorska Hrvatska	Dalm. zagora	3	1
Frankovka	Ist. kont. Hrvatska	Hrv. Podunavlje	2-3-5	1-1-1
Frankovka	Ist. kont. Hrvatska	Slavonija	2-3-5	3-1-2
Merlot	Ist. kont. Hrvatska	Hrv. Podunavlje	1-2-3-4-5	1-1-1-1-2
Merlot	Ist. kont. Hrvatska	Slavonija	2-5	1-2
Merlot	Primorska Hrvatska	Hrv. Istra	2-3-4-5	1-5-1-2
Merlot	Primorska Hrvatska	Sj. Dalmacija	3	1
Merlot	Primorska Hrvatska	Dalm. zagora	3-4-5	2-1-2
Merlot	Primorska Hrvatska	Sr. i j. Dalmacija	1-4-5	1-1-1
Pinot crni	Ist. kont. Hrvatska	Hrv. Podunavlje	2-5	2-2
Pinot crni	Ist. kont. Hrvatska	Slavonija	2-3	1-1
Plavac mali	Primorska Hrvatska	Sr. i j. Dalmacija	3-4-5	7-9-11
Plavac mali	Primorska Hrvatska	Dingač	3-5	3-2
Teran	Primorska Hrvatska	Hrv. Istra	1-2-3-4-5	1-2-2-1-4

3.1.2. Kemikalije

3.1.2.1. Antioksidacijski kapacitet

- natrijev acetat trihidrat, p.a. – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- željezov(III) klorid, p.a. – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- željezov(II) sulfat heptahidrat, p.a. - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- metanol (MeOH), p.a. – Merck, Darmstadt, Njemačka
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.2.2. Ukupni fenoli

- natrijev karbonat, p.a. - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Folin-Ciocalteu-ov reagens – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.2.3. Pojedinačni fenoli

- metanol (MeOH), nivo čistoće: za HPLC – Merck, Darmstadt, Njemačka
- tetrahidrofuran (THF), nivo čistoće: za HPLC – Merck, Darmstadt, Njemačka
- trifluoroctena kiselina (TFA), nivo čistoće: za HPLC – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- kloridna kiselina, p.a. – Merck, Darmstadt, Njemačka
- etil-acetat (EtAc), p.a. – Merck, Darmstadt, Njemačka
- galna kiselina – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- trans-resveratrol, ≥99% – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- miricetin – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- kvercetin – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- kaempferol – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- hidroksitirosol – Extrasynthese, Genay, Francuska
- tirosol - Extrasynthese, Genay, Francuska
- katehin - Extrasynthese, Genay, Francuska
- vanilinska kiselina - Extrasynthese, Genay, Francuska
- ferulinska kiselina - Extrasynthese, Genay, Francuska
- rutin - Extrasynthese, Genay, Francuska

3.1.2.4. Melatonin

- acetonitril (AcN), nivo čistoće: za LC MS – Merck, Darmstadt, Njemačka
- metanol (MeOH), nivo čistoće: za LC MS – Merck, Darmstadt, NJemačka
- mravlja kiselina, nivo čistoće: za LC MS
- melatonin – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.2.5. Makroelementi, mikroelementi i elementi u tragovima

- nitratna kiselina, Suprapur – Merck, Darmstadt, Njemačka
- multielementna standardna otopina – Perkin Elmer, Waltham, MA, SAD

- deionizirana voda - Siemens UltraClear (Siemens Water Technologies Corp, Warrendale, PA, SAD).

3.1.2.6. Biogeni amini

- acetonitril (AcN), nivo čistoće: za HPLC – Merck, Darmstadt, Njemačka
- perklorna kiselina, p.a. – Merck, Darmstadt, Njemačka
- aceton, p.a. – Merck, Darmstadt, Njemačka
- natrijev hidroksid, p.a. – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- natrijev hidrogenkarbonat, p.a. – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- otopina NH_3, 25% - Kemika, Zagreb
- putrescin – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- kadaverin – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- histamin – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- tiramin – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- dansil klorid – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- 1,7- diaminoheptan – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.2.7. Okratoksin A

- acetonitril (AcN), nivo čistoće: za HPLC – Merck, Darmstadt, Njemačka
- octena kiselina (HAc), p.a. – Merck, Darmstadt, Njemačka
- natrijev klorid, p.a. - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- natrijev hidrogenkarbonat, p.a. – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- polietilen glikol 8000 (PEG 8000) – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- okratoksin A, 10 µg/mL u acetonitrilu – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.3. Plinovi

- argon 6.0 – Messer, Austrija
- acetilen – Messer, Austrija

3.2. Metode

Ukupni SO_2, pH-vrijednost i etanol određeni su metodama opisanim u službenom glasilu Europske unije (EU) (European Commission Regulation (EC) No 2676/1990).

pH-vrijednosti izmjerene su Mettler Toledo MP220 pH-metrom (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD). Spektrofotometrijska mjerenja izvršena su PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis spektrofotometrom (PerkinElmer Instruments, Waltham, MA, SAD).

3.2.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.2.1.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Vino je razrijeđeno destiliranom vodom u omjeru 1:50. FRAP reagens pripremljen je neposredno prije analize dodatkom 50 mL acetatnog pufera (0,3 mol/L Na-acetat, pH 3,6), 5 mL otopine TPTZ (10 mmol/L) i 5 mL otopine $FeCl_3$ (20 mmol/L), (omjer 10:1:1). U reakcijsku posudu je redom otpipetirano 480 µL destilirane vode, 160 µL razrijeđenog uzorka vina i 4160 µL FRAP reagensa. U slijepu probu je umjesto uzorka dodana destilirana voda. Nakon miješanja te termostatiranja 5 minuta na 37 °C, izmjerena je apsorbancija pri 595 nm (Benzie i Strain, 1996; Muselík et al., 2007).

Kalibracijski pravac izrađen je uz pomoć $FeSO_4 \times 7H_2O$ kao referentnog materijala u rasponu od 0,125 to 2,000 mmol/L.

3.2.1.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH• metodom

DPPH• metoda je provedena prema Radovanović i sur. (2010) uz modifikaciju. Vino je razrijeđeno destiliranom vodom u omjeru 1:50. U reakcijsku posudu otpipetirano je 1880 µL metanola, 50 µL razrijeđenog uzorka vina i 120 µL metanolne otopine DPPH• (1 mmol/L). Reakcijske posude stajale su u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Kalibracijski pravac izrađen je pomoću Trolox-a kao referentnog materijala, u rasponu od 0 do 0,21 mmol/L TEAC.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola je provedeno prema metodi koju su opisali Yoo i sur. (2011) uz modifikaciju. Vino je razrijeđeno s destiliranom vodom u omjeru 1:5. Folin-Ciocalteu

reagens je razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:2 neposredno prije mjerenja. U reakcijsku posudu otpipetirano je 40 µL razrijeđenog uzorka vina, 3160 µL destilirane vode i 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon miješanja, dodano je 600 µL otopine Na_2CO_3 (200 g/L). Slijepa proba pripremljena je na isti način, uz dodatak destilirane vode umjesto uzorka. Nakon inkubacije na 40 °C tijekom 30 minuta, izmjerena je apsorbancija pri 765 nm.

Kalibracijski pravac izrađen je pomoću galne kiseline kao referentnog materijala u rasponu od 0 do 500 mg/L ekvivalenata galne kiseline (eng. GAE – gallic acid equivalent).

3.2.3. Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva

Koncentracije galne kiseline, kaempferola, kvercetina, miricetina, rutina, trans-resveratrola, hidroksitirosola, tirosola, katehina, vanilinske i ferulinske kiseline određene su visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (eng. HPLC – high performance liquid chromatography), pomoću HPLC Thermo Ultimate 3000 System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) (Slika 4) opremljenog UV/Vis detektorom s mogućnošću istovremenog mjerenja apsorpcije svjetlosti 4 različite valne duljine. Uzorci su analizirani nakon ekstrakcije tekuće-tekuće s etil-acetatom (Vrček i sur., 2011). Vino je zakiseljeno s 0,1 mol/L HCl do pH-vrijednosti 2,0. Zatim je 5 mL zakiseljenog vina ekstrahirano s 3 puta po 5 mL etil-acetata u lijevku za odjeljivanje. Organski ekstrakti odvojeni su od vodene faze, spojeni i upareni do suhog na rotacijskom uparivaču (HEI-VAP, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Njemačka). Suhi ekstrakt otopljen je u 1 mL metanola, a alikvot od 10 µL injektiran je u HPLC. Za separaciju je korištena kromatografska kolona Lichrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5 µm) s pretkolonom Lichrospher 100 (4x4 mm, 5 µm) (Santa Clara, CA, SAD) uz mobilnu fazu sastavljenu od dvije komponente: (A) H_2O : THF : TFA (98 : 2 : 0,1) i (B) MeOH : THF : TFA (98 : 2 : 0,1). Spojevi su odijeljeni na kromatografskoj koloni uz gradijentno eluiranje: 17 % B 0-2 min; 17-25 % B 2-7 min; 25-35 % B 7-15 min; 35-50 % B 15-22 min; 50-90 % B 22-27 min; 90-100 % B 27-30 min; 100 % B 30-37 min; 100-17 % B 37-47 min, pri protoku od 1 mL/min i stalnoj temperaturi od 25°C. Vanilinska kiselina je detektirana pri valnoj duljini od 250 nm, galna kiselina, katehin, hidroksitirosol i tirosol pri valnoj duljini od 280 nm, ferulinska kiselina i trans-resveratrol pri 305 nm, a kaempferol, kvercetin, miricetin i rutin pri 370 nm. Traženi spojevi identificirani su usporedbom njihovog retencijskog vremena s retencijskim vremenom čistog standarda i kvantificirani su metodom vanjskog standarda.



Slika 4. Visokodjelotvorni tekućinski kromatograf (HPLC) ThermoUltimate 3000 (vlastita fotografija).

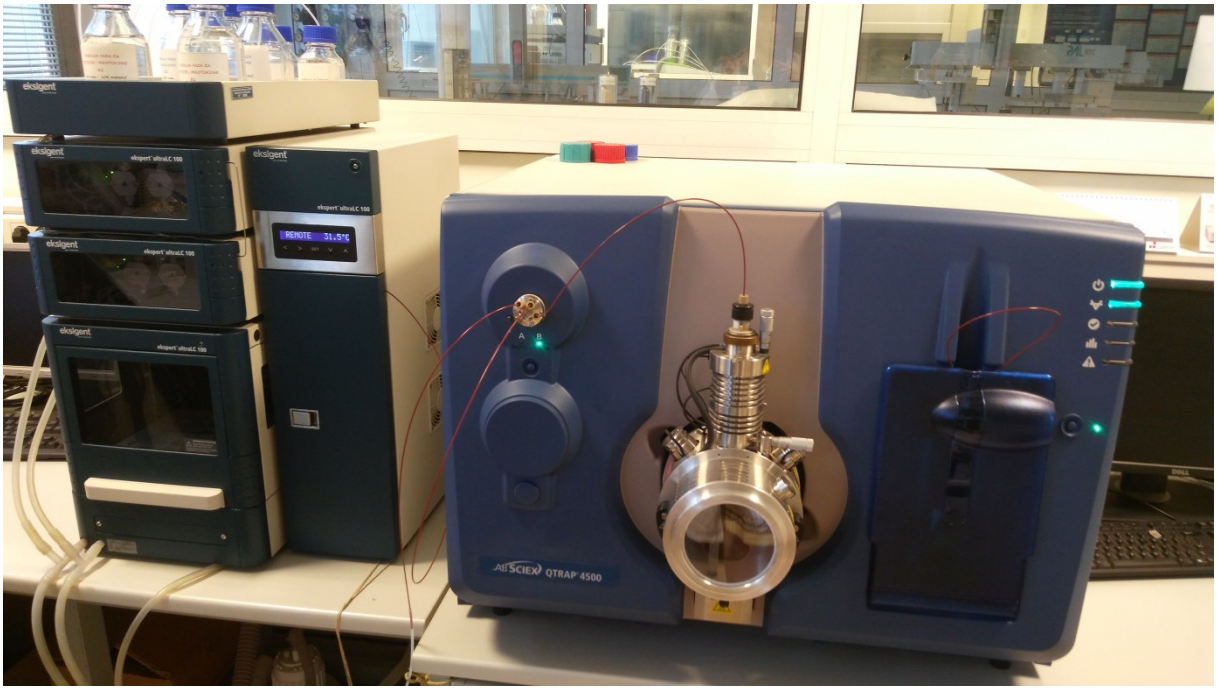
3.2.4. Određivanje melatonina

Melatonin je analiziran pomoću sustava tekućinskog kromatografa Eksigent Ekspert UltraLC 110 (ABSciex, Framingham, MA, SAD) i tandem masenog spektrometra s elektrosprej ionizacijom (engl LC/ESI-MS/MS – liquid chromatography/electrospray ionisation-tandem mass spectrometer) AB Sciex 4500 (ABSciex, Framingham, MA, SAD) (Slika 5). Uzorci vina razrijeđeni su u smjesi metanol:voda (50:50) u omjeru 1:5, a volumen od 20 µL injektiran je u tekućinski kromatograf (Kocadağlı i sur., 2014). Za separaciju je korištena kromatografska kolona Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm, 2,6 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) pri stalnoj temperaturi od 40 °C. Mobilna faza u sastavu: A) 0,1 % mravlja kiselina u vodi i B) acetonitril korištena je za eluiranje melatonina uz gradijent: 10 % B 0-2 min; 10-40 % B 2-3 min; 40-90 % B 3-8,5 min; 90 % B 8,5-9,5 min; 90-10 % B 9,5-10,5 min; 10 % B 10,5-12 min, uz protok 0,15 mL/min. Parametri masenog detektora navedeni su u Tablici 7 (Stürtz i sur., 2011).

Tablica 7. Parametri MS detektora za analizu melatonina.

MS parametar	Vrijednost
Ionizacija	pozitivna
Napon ionskog spreja (engl. ion spray potential)	-5500 V
Plinska zavjesa (engl. curtain gas)	35 psi
Temperatura plina za sušenje (engl. dry gas) (N_2)	350°C
Protok N_2	6 L/min
GS1	60
GS2	60
Napon razbijanja skupina (engl. declustering potential)	20 V
Ulazni napon (engl. entrance potential)	10 V
Raspršivač (engl. nebulizer)	20 psi
Raspon skeniranja m/z	150,00-800,00

Praćenje višestrukih reakcija (engl. MRM – multiple reaction monitoring) je primjenjeno kod praćenja iona prekursora i iona produkata u prvom i trećem kvadrupolu. Praćeni su prijelazi melatonina 233,2/216,2; 233,2/174,1 i 233,2/159,1, uz odgovarajuće kolizijske energije: +14 V; +18 V i +35 V. Prijelaz 233,2/174,1 korišten je za kvantifikaciju melatonina; prijelaz 233,2/159,1 korišten je za potvrdu identifikacije melatonina; prijelaz 233,2/216,2 korišten je za kvantifikaciju izomera melatonina (triptofan etilestera).



Slika 5. Tekućinski kromatograf s tandem masenim spektrometrom (LC MS MS) ABSciex 4500 (vlastita fotografija).

3.2.5. Određivanje makroelemenata, mikroelemenata i elemenata u tragovima

Mikroelementi i elementi u tragovima analizirani su pomoću masenog spektrometra s induktivno spregnutom plazmom NexION 300X (PerkinElmer Instruments, Waltham, MA, SAD) (Slika 6), dok su makroelementi analizirani atomskim apsorpcijskim spektrometrom s plamenom tehnikom AAS800 (PerkinElmer Instruments, Waltham, MA, SAD). Uzorci su prethodno razoreni u mikrovalnoj pećnici Anton Paar Multiwave 3000 (Anton Paar GmbH, Graz, Austrija) opremljenoj s teflonskim tlačnim posudama. 2,5 mL vina i 2,5 mL koncentrirane HNO_3 otpipetirano je u teflonske posude te, nakon razaranja u mikrovalnoj peći i hlađenja, kvantitativno prebačeno u tikvice od 50 mL i nadopunjeno deioniziranom vodom do oznake. Teflonske posude su prethodno isprane s HNO_3, a svo korišteno plastično i stakleno posuđe potopljeno je u HNO_3 najmanje 24 h te zatim temeljito isprano deioniziranom vodom kako bi se izbjegla kontaminacija. Uvjeti razaranja u mikrovalnoj pećnici te analize na instrumentu prikazani su u Tablicama 8 i 9 (Geana i sur., 2013). Elementi su kvantificirani metodom vanjskog standarda. Kalibracijski pravci su se sastojali od najmanje 6 kalibracijskih točaka (ICP MS), odnosno 5 kalibracijskih točaka (FAAS) dobivenih analizom multi-elementne standardne otopine pripremljene u istom kiselom matriksu.

Tablica 8. Program razaranja uzoraka vina u mikrovalnoj peći.

Korak	**Snaga**	**Vrijeme rampe (min)**	**Tlak (psi)**	**Temperatura (°C)**	**Vrijeme zadržavanja (min)**
1.	600	10	800	180	20
2.	Hlađenje 15 min				

Tablica 9. Parametri za određivanje mikroelemenata i elemenata u tragovima u vinu.

a) Parametri instrumenta		**b) Parametri obrade podataka**	
RF snaga	1,6 kW	Način mjerenja	Peak hopping
Protok argona:		Br. točaka po vršku	20
nebulizer	1 L	Br. skenova po replikatu	1
plasma	18 L	Br. replikata po uzorku	3
		Trajanje mjerenja po izotopu (ms)	50



Slika 6. Maseni spektrometar s induktivno-spregnutom plazmom (ICP-MS) PerkinElmer NexION 300x (vlastita fotografija).

3.2.6. Određivanje biogenih amina

Koncentracije biogenih amina (histamina, kadaverina, putrescina i tiramina) određene su pomoću HPLC-a nakon derivatizacije s dansil kloridom (Preti i sur., 2015). Derivatizacija je neophodna jer biogeni amini nemaju zadovoljavajuću apsorpciju ni u vidljivom, niti u UV dijelu spektra, a također ne fluoresciraju. Alikvot od 50 µL derivatiziranog uzorka injektiran je u HPLC Thermo Ultimate 3000 System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Za separaciju je korištena kromatografska kolona Lichrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5 µm) s pretkolonom Lichrospher 100 (4x4 mm, 5 µm) (Santa Clara, CA, SAD) uz mobilnu fazu sastavljenu od dvije komponente: (A) H_2O i (B) AcN. Upotrijebljen je gradijent komponenti mobilne faze: 50 % B 0-3 min; 50-90 % B 3-23 min; 90 % B 23-26 min; 90-50 % B 26-30 min; 50 % B 30-40 min, pri konstantnom protoku od 1,2 mL/min i temperaturi od 25 °C. UV/Vis detekcija apsorpcije svjetlosti postavljena je na 254 nm. Biogeni amini su identificirani i kvantificirani na isti način kao i pojedinačni fenolni spojevi.

3.2.7. Određivanje okratoksina A

OTA je određen pomoću HPLC-a s fluorescentnom detekcijom Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) nakon pročišćavanja na imunoafinitetnoj koloni (Visconti i sur., 1999). Uzorak od 10 mL vina razrijeđen je s 10 mL destilirane vode koja je sadržavala 1% (w/v) PEG i 5% (w/v) $NaHCO_3$, promiješan i filtriran kroz filter sa staklenim vlaknima (MN-GF1, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). 10 mL razrijeđenog uzorka (koji odgovara volumenu od 5 mL vina) pročišćen je na imunoafinitetnoj koloni OchraTest (Vicam, Waters, Milford, MA, SAD) uz protok od otprilike 1 kap u sekundi. Kolona je isprana prvo s 5 mL otopine koja je sadržavala NaCl (2,5 %, w/v) i $NaHCO_3$ (0,5 %, w/v), a zatim s 5 mL destilirane vode, uz protok od 1-2 kapi u sekundi. OTA je eluiran s 2 mL metanola. Eluirani je ekstrakt uparen do suhog u struji dušika pri 50 °C, rekonstituiran u 250 µL mobilne faze te je alikvot od 100 µL injektiran u HPLC. Za separaciju je korištena kromatografska kolona Lichrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5 µm) s pretkolonom Lichrospher 100 (4x4 mm, 5 µm) (Santa Clara, CA, SAD). Mobilna faza sastojala se od AcN : H_2O : octena kiselina (99 : 99 : 2), protok je bio 1 mL/min. Valna duljina ekscitacije bila je 333 nm, a emisije 460 nm. OTA je identificiran usporedbom njegovog retencijskog vremena s retencijskim vremenom čistog standarda te kvantificiran metodom vanjskog standarda.

3.3. Statistička obrada podataka

Deskriptivna statistika uključivala je izračun srednje vrijednosti, standardne devijacije, varijance, raspona i koeficijenta varijacije za sve analizirane parametre. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) uz post-hoc Tukey HSD test upotrebljena je za utvrđivanje razlike između sorti, godišta berbe i zaštićenih oznaka izvornosti po svim istraživanim parametrima. Razlike između vina podijeljenih s obzirom na tradicionalne oznake kvalitete ispitane su s t-testom. Među analiziranim parametrima provedena je korelacijska analiza te izračunat Pearsonov koeficijent korelacije. Analiza glavnih komponenti (PCA) provedena je kako bi se istražilo te objasnilo grupiranje uzoraka ovisno o njihovom antioksidacijskom kapacitetu, koncentraciji ukupnih fenola, resveratrola, kvercetina, miricetina, kaempferola, hidroksitirosola, tirosola, katehina, vanilinske kiseline, ferulinske kiseline, rutina, makro- i mikroelemenata te elemenata u tragovima u odnosu na sortu, zaštićenu oznaku izvornosti (ZOI) i godište berbe. Kanonička diskriminacijska analiza (CDA) provedena je kako bi se utvrdilo koje varijable prave razlike među unaprijed definiranim grupama: sortama, geografskim regijama, ZOI i godištima berbe,

tj kako bi se definirale nove varijable, tzv. kanoničke diskriminacijske funkcije koje najbolje opisuju razlike među grupama. Vjerojatnost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Statistica 10.0 (Stat-Soft, Tulsa, OK, SAD) korištena je za sve statističke izračune.

4.0 REZULTATI

4.1. Kemijski parametri analiziranih crnih vina

Tablica 10. Osnovni parametri (etanol, SO_2, pH-vrijednost), antioksidacijski kapacitet, ukupni fenoli, pojedinačni fenolni spojevi, kontaminanti i elementi u analiziranim crnim vinima.

	Srednja vrijednost	**Minimum – maximum**	**Varijanca**	**Standardna devijacija**	**Koeficijent varijacije**
Osnovni parametri:					
etanol[a]	13,1	10,9 – 15,8	1	0,9	6,9
SO_2[b]	82,8	16,0 – 286,0	2391	48,9	59,1
pH-vrijednost	3,5	3,0 – 3,9	0	0,2	4,6
jabučna kiselina[b]	215,5	n.d. – 1927	73895	271,8	126,1
mliječna kiselina[b]	1800	519 - 3982	432930	658,0	36,6
Antioksidacijski kapacitet:					
DPPH•[c]	10,5	3,3 – 21,4	13	3,6	34,2
FRAP[d]	24,8	13,0 – 48,6	50	7,0	28,4
Ukupni fenoli[e]	1969	522 – 3631	317495	563	28,6
Flavan-3-ol:					
katehin[b]	38,7	15,5 – 73,1	169	13	33,5
Flavonoli:					
kvercetin[b]	5,4	0,4 – 15,4	13	3,6	66,0
miricetin[b]	3,4	0,5-10,0	4	2,1	60,0
rutin[b]	1,0	0,04 – 3,0	0	0,7	62,4
kaempferol[b]	0,3	0,02 – 1,1	0	0,2	73,6
Hidroksibenzojeve kis.:					
galna kiselina[b]	41,9	12,6 – 87,5	179	13,4	31,9
vanilinska kiselina[b]	8,2	0,6 – 16,5	10	3,2	38,7
Hidroksicinaminska kis.:					
ferulinska kiselina[b]	2,7	0,6 – 6,1	2,5	1,1	19,5
Stilben:					
resveratrol[b]	1,9	0,1 – 4,4	1	0,8	43,8
Feniletanoidi:					
tirosol[b]	42,5	19,6 – 66,6	100	10	23,5
hidroksitirosol[b]	2,8	0,9 – 4,8	1	0,7	26,7
Biogeni amini:					
putrescin[b]	14,1	2,4 – 35,2	58	7,6	54,3
histamin[b]	5,3	0,2 – 21,2	27	5,2	98,7
tiramin[b]	3,6	0,2-21,1	20	4,4	122,7
kadaverin[b]	2,2	0,25 – 7,5	2	1,4	64,6
triptofan etilester[f]	431	26 – 1568	87018	295	68,5

Tablica 10. (nastavak) Osnovni parametri (etanol, SO_2, pH-vrijednost), antioksidacijski kapacitet, ukupni fenoli, pojedinačni fenolni spojevi, kontaminanti i elementi u ispitivanim crnim vinima.

	Srednja vrijednost	**Minimum – maximum**	**Varijanca**	**Standardna devijacija**	**Koeficijent varijance**
Okratoksin A[f]	0,040	0,003 – 0,163	0	0,036	92,1
Makroelementi:					
K[b]	1056	449 – 1898	80764	284	26,9
Ca[b]	130	49,3 – 846	21933	148,1	113,7
Mg[b]	111	35,3 – 176,8	648	25,5	22,9
Na[b]	18,7	2,7 – 79,9	146	12,1	64,6
Mikroelementi:					
Fe[f]	4187	706 – 13245	6781797	2604	62,2
Mn[f]	2092	373 – 5195	1155472	1075	51,4
Al[f]	1020	20,7 – 4731	791461	890	87,3
Zn[f]	520	124 – 1370	74972	274	52,7
Cu[f]	187	7,4 – 843	29535	172	91,7
Elementi u tragovima:					
Ni[f]	43,4	4,9 – 136	868	29,5	67,9
Pb[f]	28,1	0,5 – 151	1091	33,0	117,5
Cr[f]	18,0	1,0 – 66,1	139	11,8	65,5
V[f]	5,2	2,5 – 36,5	39	6,2	120,5
Co[f]	3,1	1,0 – 14,9	9	3,0	96,9
Se[f]	1,6	1,0 – 7,8	2	1,2	76,7
As[f]	1,5	0,5 – 7,7	3	1,7	115,0
Cd[f]	0,5	0,3 – 3,0	0	0,5	113,2

[a] izražen u % v/v
[b] izražen u mg/L
[c] izražen kao mmol/L TEAC
[d] izražen kao mmol/L $FESO_4$
[c] izražen kao mg GAE/L
[f] izražen u µg/L

4.2. Klimatološki podatci

Tablica 11. Prosječne godišnje temperature, prosječno dnevno trajanje osunčavanja i ukupna godišnja količina oborina za godine 2011.-2015. izražene prema ZOI (prilagođeno prema podatcima Državnog hidrometeorološkog zavoda).

	Godina berbe	**Dalm. zagora**	**Dingač**	**Sjev. Dalmacija**	**Sred. i j. Dalmacija**	**Hrv. Istra**	**Hrv. Podunavlje**	**Slavonija**
Prosječna temperatura (°C)	2011.	14,0	16,3	16,2	17,7	14,3	11,7	11,6
	2012.	14,1	16,2	16,1	17,5	14,4	12,3	12,4
	2013.	13,6	16,1	15,9	17,4	14,3	12,1	11,9
	2014.	14,1	16,1	16,5	17,6	15,1	12,8	12,6
	2015.	13,9	16,1	16,3	17,7	14,7	12,6	12,5
Prosječno dnevno trajanje osunčavanja (h)	2011.	7,3	7,6	7,7	7,6	7,4	5,9	5,6
	2012.	7,1	7,5	7,3	7,5	7,2	6,4	6,0
	2013.	6,4	7,3	6,9	7,4	6,5	5,5	5,1
	2014.	5,7	6,5	6,7	6,5	5,9	5,2	4,8
	2015.	7,0	7,4	7,1	7,7	6,7	6,0	5,5
Ukupna količina oborina (mm)	2011.	738	733	508	679	550	422	433
	2012.	789	1311	921	878	711	599	640
	2013.	1328	1887	1187	1202	1026	773	738
	2014.	1450	1606	1365	1330	1254	809	963
	2015.	1061	1262	948	970	615	686	766

Tablica 12. Prosječne mjesečne temperature, prosječno dnevno trajanje osunčavanja i ukupna količina oborina za vegetacijske mjesece (travanj – rujan) godina 2011.-2015., izražene prema ZOI (prilagođeno prema podatcima Državnog hidrometeorološkog zavoda).

		Prosječna mjesečna temperatura (°C)						**Prosjek dnevnog trajanja osunčavanja/mjesec (h)**						**Ukupna količina oborina/mjesec (mm)**					
ZOI	Godina	T4	T5	T6	T7	T8	T9	S4	S5	S6	S7	S8	S9	O4	O5	O6	O7	O8	O9
Dalm. zagora	2011.	14,2	17,6	21,5	22,7	24,2	22,1	8,0	8,7	9,2	9,5	11,5	9,5	29,2	58,5	103,1	136,5	32,4	31,7
	2012.	12,3	16,0	23,5	26,0	25,8	19,8	5,4	8,1	10,8	11,9	11,6	7,2	126,1	62,6	39,4	42,8	0,0	153,9
	2013.	13,5	15,6	19,7	24,2	24,5	17,9	7,3	6,4	9,4	11,0	10,7	7,6	108,5	118,3	153,6	26,3	53,1	95,6
	2014.	12,9	15,4	21,0	21,8	21,5	17,3	4,8	7,2	7,8	8,3	9,7	5,8	164,7	54,4	118,4	82,3	62,8	295,3
	2015.	12,2	17,6	21,3	25,7	23,6	19,3	6,8	7,8	9,7	11,5	9,1	8,5	54,1	94,0	129,2	53,4	100,4	54,3
Dingač	2011.	14,8	19,3	24,3	24,1	25,7	23,9	8,3	9,2	10,8	11,0	11,9	9,0	36,5	68,9	0,3	107,0	0,0	6,4
	2012.	13,6	18,4	24,4	26,8	26,1	21,4	5,9	9,1	12,2	11,9	11,7	8,2	225,8	56,9	25,6	3,5	0,0	191,9
	2013.	15,2	18,1	22,5	26,4	25,5	20,2	8,5	8,1	11,6	12,2	11,1	8,6	221,6	108,0	36,9	0,0	68,5	68,8
	2014.	14,1	17,0	22,6	23,4	23,9	19,5	5,6	7,8	9,3	9,8	11,6	7,4	99,6	67,3	86,7	137,7	16,4	325,9
	2015.	13,4	18,9	23,4	27,4	25,8	21,6	7,1	8,6	10,6	12,7	10,5	8,3	69,2	38,5	32,2	6,4	188,0	64,5
Sjeverna Dalmacija	2011.	15,0	19,0	23,5	24,4	25,4	23,5	8,1	10,4	10,9	10,9	12,2	9,1	11,9	24,3	44,1	43,6	0,0	19,9
	2012.	13,8	17,6	23,8	27,0	26,1	21,1	5,2	9,6	11,5	12,2	11,8	6,7	111,3	39,8	27,5	14,0	0,6	259,8
	2013.	14,7	17,4	21,7	25,9	24,9	20,5	8,4	7,1	11,3	12,3	11,1	8,2	79,2	134,2	80,4	0,9	54,6	123,6
	2014.	14,9	17,4	22,4	23,7	24,0	19,9	7,0	8,5	10,4	10,0	10,6	6,9	69,8	40,2	49,8	341,3	61,1	239,7
	2015.	18,6	23,2	27,3	25,6	21,1	16,3	7,4	8,2	11,6	12,4	10,1	8,1	28,1	116,9	8,9	10,1	85,3	85,9
Srednja i južna Dalmacija	2011.	16,5	19,9	24,8	25,7	27,4	25,5	8,4	9,0	9,9	10,7	11,9	9,1	13,9	93,2	29,5	103,2	0,8	14,5
	2012.	14,5	19,0	25,6	28,7	28,2	23,2	5,9	9,1	11,5	11,7	11,7	8,0	148,1	60,1	14,3	4,7	0,0	89,2
	2013.	16,3	19,1	23,1	26,9	27,0	22,2	8,7	8,0	11,1	11,9	11,0	8,7	86,4	87,5	40,4	0,8	19,7	74,4
	2014.	15,5	18,2	23,6	24,6	25,6	21,0	5,8	8,0	9,2	9,8	11,3	7,3	118,2	62,1	111,2	101,4	40,4	195,7
	2015.	14,4	20,1	24,1	28,8	27,5	23,1	7,4	9,0	10,9	12,4	10,3	8,4	59,2	50,2	43,7	7,2	70,7	79,8

4: travanj; 5: svibanj; 6: lipanj; 7: srpanj; 8: kolovoz; 9: rujan

Tablica 12. (nastavak) Prosječne temperature, prosječno dnevno trajanje osunčavanja i ukupna količina oborina za vegetacijske mjesece (travanj – rujan) godina 2011.-2015., izražene prema ZOI (prilagođeno prema podatcima Državnog hidrometeorološkog zavoda).

		Prosječna mjesečna temperatura (°C)						**Prosjek dnevnog trajanja osunčavanja/mjesec (h)**						**Ukupna količina oborina/mjesec (mm)**					
ZOI	Godina	T4	T5	T6	T7	T8	T9	S4	S5	S6	S7	S8	S9	O4	O5	O6	O7	O8	O9
Hrvatska Istra	2011.	13,6	17,9	22,1	23,3	24,1	21,7	8,1	11,8	9,7	10,6	11,4	9,0	22,7	48,0	52,6	134,8	0,0	44,8
	2012.	12,6	16,6	23,2	26,1	25,1	20,0	6,5	9,4	11,1	11,8	11,2	6,4	56,0	102,5	18,6	2,2	3,8	145,6
	2013.	13,5	16,6	21,0	24,7	23,7	19,3	6,9	7,0	11,3	11,7	10,8	7,6	33,1	78,4	73,7	10,5	112,0	80,2
	2014.	14,0	16,4	21,8	22,3	22,4	18,2	5,9	8,1	10,1	8,3	9,9	6,3	75,0	70,7	45,9	154,3	84,7	145,1
	2015.	12,4	17,9	22,5	26,5	24,4	19,7	8,1	8,3	11,2	12,1	10,2	6,8	20,4	44,5	83,9	25,5	59,9	50,9
Hrvatsko Podunavlje	2011.	13,2	16,7	20,2	22,2	23,0	20,3	6,8	8,5	9,9	8,5	10,2	8,7	19,4	81,2	49,9	73,9	4,6	15,9
	2012.	12,5	16,9	22,5	24,8	24,1	18,9	6,1	8,1	10,7	10,7	11,4	6,5	45,5	93,7	67,9	47,8	4,0	32,3
	2013.	13,1	16,7	20,0	22,9	22,9	15,9	7,8	6,6	8,8	11,8	9,3	5,6	44,9	119,0	63,2	36,5	32,9	129,0
	2014.	13,2	16,1	20,5	21,9	20,8	17,0	5,6	7,8	9,4	8,8	8,2	4,2	81,3	161,4	91,0	66,4	54,3	68,9
	2015.	12,1	17,8	20,8	24,6	23,7	17,9	7,9	7,6	9,7	10,7	9,3	6,0	12,9	113,4	17,1	25,6	105,8	41,1
Slavonija	2011.	13,1	16,3	20,6	22,6	23,2	20,0	6,2	7,8	8,7	8,6	9,8	8,1	17,7	43,8	47,4	108,7	18,2	10,6
	2012.	12,4	16,1	22,4	25,3	24,5	18,3	5,6	7,0	10,1	10,4	11,1	6,0	74,3	98,8	66,6	20,9	10,5	48,5
	2013.	13,2	16,6	20,0	22,1	23,0	15,6	7,4	6,2	8,1	10,5	9,1	5,5	43,3	82,5	68,9	86,5	57,5	83,8
	2014.	12,8	15,7	20,0	21,7	20,6	16,5	4,7	6,8	8,6	8,5	7,7	3,7	119,0	134,1	78,3	76,2	131,4	112,6
	2015.	11,6	17,7	20,7	24,9	23,5	17,6	6,9	7,1	9,2	10,8	8,7	5,3	28,2	143,0	26,3	15,2	78,5	71,1

4: travanj; 5: svibanj; 6: lipanj; 7: srpanj; 8: kolovoz; 9: rujan

4.3. Utjecaj sorte, geografskog podrijetla i godišta berbe na analizirane nutraceutičke i antinutraceutičke komponente u hrvatskim crnim vinima sa zaštićenom oznakom izvornosti

Tablica 13. Antioksidacijski kapacitet*, ukupni fenoli** te koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/L) i triptofan etilestera (μg/L) izraženi po sortama.

		Babić	Cabernet Sauvignon	Frankovka	Merlot	Pinot crni	Plavac mali	Teran
DPPH•	Sr. vrij.	10,9 AB	9,9 AB	8,5 A	9,4 A	7,8 A	12,5 B	10,8 AB
	Std. dev.	4,9	2,9	2,6	2,5	2,1	3,7	4,7
	Min.-max.	6,9-20,5	5,2-16,2	3,3-11,8	5,7-13,4	6,0-11,5	7,4-21,4	5,4-19,6
FRAP	Sr. vrij.	20,5 A	23,8 A	23,3 A	23,2 A	21,2 A	29,2 A	22,8 A
	Std. dev.	3,4	3,7	4,8	6,7	4,9	8,5	6,8
	Min.-max.	16,6-24,7	18,0-31,4	13,0-28,7	14,6-44,7	13,6-27,3	16,9-48,6	13,6-34,0
ukupni fenoli	Sr. vrij.	1677 A	1831 A	1639 A	1883 A	1854 A	2396 B	1653 A
	Std. dev.	351	415	459	436	373	566	707
	Min.-max.	1095-2109	1050-2606	877-2275	1071-2847	1381-2506	1706-3631	522-2495
katehin	Sr. vrij.	48,5 A	34,4 A	31,9 A	34,8 A	47,9 A	42,9 A	39,1 A
	Std. dev.	7,8	12,4	9,6	13,7	13,5	11,2	14,4
	Min.-max.	42,0-63,2	15,5-58,9	18,9-46,6	16,0-66,0	38,7-73,1	25,1-62,4	25,7-67,1
kvercetin	Sr. vrij.	8,0 A	5,2 AB	2,2 B	6,7 A	1,9 B	5,4 AB	5,9 AB
	Std. dev.	4,3	3,4	1,2	4,3	0,8	2,8	3,2
	Min.-max.	0,8-13,5	0,4-12,8	0,9-4,5	0,7-15,4	0,5-2,7	1,3-11,1	2,1-11,6
miricetin	Sr. vrij.	4,8 AB	3,9 ABC	1,8 CD	3,9 AB	1,2 D	2,7 ACD	5,3 B
	Std. dev.	2,2	2,4	1,0	1,9	0,7	1,2	2,5
	Min.-max.	1,7-7,4	0,8-9,1	0,6-3,7	0,8-7,7	0,5-2,2	0,7-5,2	2,4-10,0
rutin	Sr. vrij.	0,7 A	1,2 AB	1,2 AB	1,4 B	0,8 AB	0,8 AB	1,2 AB
	Std. dev.	0,2	0,7	0,7	0,9	0,3	0,4	0,6
	Min.-max.	0,5-1,0	0,1-2,6	0,1-1,9	0,04-3,0	0,4-1,2	0,1-1,6	0,3-2,2
kaempferol	Sr. vrij.	0,3 A	0,3 A	0,3 A	0,3 A	0,2 A	0,4 A	0,3 A
	Std. dev.	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1
	Min.-max.	0,1-0,8	0,1-1,0	0,1-0,4	0,02-0,8	0,1-0,3	0,1-1,1	0,1-0,4
galna kiselina	Sr. vrij.	46,8 A	43,8 A	38,1 A	39,5 A	35,2 A	46,3 A	35,3 A
	Std. dev.	11,4	14,2	13,3	14,6	13,5	11,4	12,3
	Min.-max.	31,4-63,9	12,6-74,5	24,5-62,8	15,9-87,5	22,1-57,4	21,9-73,8	12,7-49,8
vanilinska kiselina	Sr. vrij.	9,5 AB	8,0 AC	10,5 AB	8,7 AB	12,3 B	6,2 C	7,9 AC
	Std. dev.	1,0	3,0	2,5	3,1	2,2	2,5	3,5
	Min.-max.	8,3-11,2	3,5-14,8	7,7-14,8	3,6-15,5	10,0-15,8	0,6-11,4	5,2-16,5
ferulinska kiselina	Sr. vrij.	3,1 A	2,8 A	3,3 A	3,1 A	2,6 A	2,6 A	2,2 A
	Std. dev.	0,8	1,2	1,8	1,0	1,1	1,0	0,6
	Min.-max.	2,2-4,5	0,6-5,8	1,8-6,1	1,1-5,6	1,6-4,6	1,0-4,6	1,3-2,8
resveratrol	Sr. vrij.	1,8 A	1,8 A	1,6 A	2,1 AB	2,2 AB	1,5 A	2,7 B
	Std. dev.	0,4	0,7	0,6	0,8	1,0	0,8	1,0
	Min.-max.	1,2-2,3	1,1-3,2	0,7-2,9	0,8-4,1	1,0-4,0	0,1-3,5	1,5-4,4
tirosol	Sr. vrij.	41,3 A	44,4 A	44,7 A	42,9 A	39,0 A	42,4 A	39,2 A
	Std. dev.	4,4	8,8	12,4	9,0	8,2	11,5	11,5
	Min.-max.	35,8-48,6	29,8-62,2	26,6-61,5	19,6-58,9	28,5-47,8	22,3-66,6	21,6-50,0
hidroksitirosol	Sr. vrij.	3,4 AB	2,5 A	2,4 A	2,9 AB	2,4 A	2,8 AB	3,5 B
	Std. dev.	0,3	0,6	0,7	0,8	0,6	0,7	0,6
	Min.-max.	2,9-3,6	1,2-3,7	1,4-3,7	0,9-4,4	1,6-3,5	1,8-4,3	2,7-4,8
triptofan etilester	Sr. vrij.	623 A	375 AB	222 B	354 AB	316 AB	550 A	506 AB
	Std. dev.	479	255	198	242	220	282	352
	Min.-max.	241-1568	26-979	32-628	26-905	72-546	141-1303	222-1122

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.
*DPPH• izražen kao mmol/L TEAC; FRAP izražen kao mmol/L $FeSO_4$; ** izražen kao mg GAE/L

Tablica 14. Antioksidacijski kapacitet*, ukupni fenoli** te koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/L) i triptofan etilestera (μg/L) izraženi po ZOI.

		Dalm. zagora	Dingač	Sj. Dalmacija	Sr. i južna Dalmacija	Hrv. Istra	Hrv. Podunavlje	Slavonija
DPPH•	Sr. vrij.	10,8 ABC	16,4 C	10,5 ABC	11,5 BC	10,1 AB	8,3 A	9,2 AB
	Std. dev.	2,4	3,6	1,7	3,7	3,7	1,8	2,7
	Min.-max.	8,1-13,4	10,0-18,7	8,6-13,2	6,9-21,4	5,2-19,6	6,0-11,1	3,3-13,1
FRAP	Sr. vrij.	25,1 A	40,0 B	24,2 A	25,8 A	22,4 A	21,4 A	26,2 A
	Std. dev.	5,1	5,0	3,4	7,7	5,3	4,3	6,8
	Min.-max.	19,6-33,8	34,8-45,8	19,4-29,4	16,6-48,6	13,6-34,0	13,0-32,6	15,1-44,7
ukupni fenoli	Sr. vrij.	2106 ABC	2717 C	1868 ABC	2231 BC	1788 AB	1787 AB	1864 AB
	Std. dev.	556	632	498	561	510	234	579
	Min.-max.	1334-2847	1805-3361	1095-2451	1414-3631	522-2606	1381-2430	877-2583
katehin	Sr. vrij.	36,2 AB	40,0 AB	48,1 B	42,6 B	32,6 A	39,0 AB	38,6 AB
	Std. dev.	12,5	7,3	6,2	12,8	11,6	12,9	16,0
	Min.-max.	17,4-54,1	33,3-51,0	42,0-58,9	16,0-63,2	15,5-67,1	20,5-66,0	18,9-73,1
kvercetin	Sr. vrij.	8,8 A	8,6 A	6,2 AC	5,5 AC	7,0 A	3,3 BC	1,8 B
	Std. dev.	4,6	2,2	2,8	3,1	3,7	2,1	1,0
	Min.-max.	4,1-15,4	5,3-11,1	0,8-8,6	1,3-13,5	1,3-14,0	0,5-8,4	0,4-3,7
miricetin	Sr. vrij.	4,5 AB	4,1 ABC	4,0 ABC	3,8 ABC	5,0 B	2,3 AC	2,0 C
	Std. dev.	1,8	1,1	1,9	1,5	2,3	1,5	1,1
	Min.-max.	3,1-7,7	2,4-5,2	1,7-7,4	0,7-6,7	1,7-10,0	0,5-5,9	0,6-4,8
rutin	Sr. vrij.	1,2 AB	1,1 AB	0,8 A	0,8 A	1,3 B	0,9 AB	1,4 B
	Std. dev.	1,0	0,5	0,3	0,5	0,7	0,6	0,7
	Min.-max.	0,04-2,7	0,6-1,6	0,5-1,4	0,1-3,0	0,2-2,6	0,1-2,2	0,4-3,0
kaempferol	Sr. vrij.	0,4 AB	0,6 B	0,3 AB	0,3 AB	0,4 AB	0,2 A	0,2 A
	Std. dev.	0,2	0,4	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1
	Min.-max.	0,1-0,8	0,2-1,0	0,1-0,4	0,1-1,1	0,1-1,0	0,02-0,3	0,1-0,4
galna kiselina	Sr. vrij.	47,5 A	48,9 A	50,4 A	43,9 A	37,6 A	35,4 A	46,0 A
	Std. dev.	21,8	4,4	8,4	13,6	13,8	7,9	12,7
	Min.-max.	29,4-87,5	45,4-54,8	38,5-63,1	18,5-73,8	12,6-74,5	22,1-50,2	21,3-62,8
vanilinska kiselina	Sr. vrij.	9,4 ABC	5,1 A	10,9 B	6,7 A	7,2 AC	9,6 BC	11,2 B
	Std. dev.	2,4	1,7	2,8	2,6	2,7	2,3	3,5
	Min.-max.	5,5-12,4	3,8-8,0	8,3-14,8	0,6-11,4	3,5-16,5	5,8-14,8	4,8-15,8
ferulinska kiselina	Sr. vrij.	3,8 A	3,5 A	3,0 A	2,5 A	2,6 A	3,0 A	2,8 A
	Std. dev.	1,0	0,7	0,6	1,0	1,1	1,2	1,3
	Min.-max.	2,2-4,9	3,0-4,6	2,2-4,0	1,0-4,5	0,6-5,8	1,6-6,1	1,8-5,6
resveratrol	Sr. vrij.	2,0 AB	1,5 A	1,7 AB	1,6 A	2,2 B	2,1 AB	1,7 AB
	Std. dev.	0,5	0,8	0,3	0,7	0,9	0,8	0,8
	Min.-max.	1,4-2,9	0,1-2,3	1,2-2,1	0,3-3,5	1,2-4,4	1,1-4,0	0,7-4,1
tirosol	Sr. vrij.	38,3 A	46,0 A	42,4 A	41,2 A	42,9 A	40,0 A	48,8 A
	Std. dev.	12,6	10,7	4,2	11,1	9,8	8,6	8,2
	Min.-max.	19,6-52,5	33,7-60,2	35,8-48,6	22,3-66,6	21,6-62,2	26,6-58,9	36,0-61,5
hidroksitirosol	Sr. vrij.	2,9 A	3,5 A	3,1 A	2,7 A	2,9 A	2,7 A	2,6 A
	Std. dev.	0,8	0,6	0,6	0,7	0,9	0,5	0,8
	Min.-max.	2,0-4,0	2,8-4,1	2,3-3,6	1,0-4,3	0,9-4,8	1,6-3,7	1,4-4,1
triptofan etilester	Sr. vrij.	411 AB	943 C	623 AC	458 A	452 A	332 AB	194 B
	Std. dev.	287	231	478	228	306	206	133
	Min.-max.	121-824	701-1303	271-1568	32-1070	26-1122	26-628	32-502

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.
*DPPH• izražen kao mmol/L TEAC; FRAP izražen kao mmol/L $FeSO_4$; ** izražen kao mg GAE/L

Tablica 15. Antioksidacijski kapacitet*, ukupni fenoli** te koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/L) i triptofan etilestera (μg/L) izraženi po godištu berbe.

		2011.	2012.	2013.	2014.	2015.
DPPH•	Sr. vrij.	14,0 A	11,0 AB	11,0 AB	8,6 B	9,9 AB
	Std. dev.	5,4	2,8	4,0	2,0	3,3
	Min.-max.	7,7-20,5	6,1-15,8	5,7-21,4	5,2-13,1	3,3-20,0
FRAP	Sr. vrij.	24,4 A	25,4 A	25,1 A	22,8 A	25,0 A
	Std. dev.	7,1	7,6	7,2	4,4	7,6
	Min.-max.	16,6-32,6	13,6-44,7	13,0-48,6	17,1-35,5	13,6-45,8
ukupni fenoli	Sr. vrij.	1940 A	1822 A	2034 A	1867 A	2022 A
	Std. dev.	378	594	606	427	588
	Min.-max.	1410-2489	877-2812	1047-3631	1050-2834	522-3543
katehin	Sr. vrij.	30,0 A	36,7 A	37,1 A	37,3 A	42,8 A
	Std. dev.	12,6	11,9	12,9	14,0	12,5
	Min.-max.	16,0-46,4	18,9-62,0	15,5-73,1	21,5-66,0	22,9-67,1
kvercetin	Sr. vrij.	8,9 A	4,4 B	6,7 AB	3,9 B	4,9 AB
	Std. dev.	3,4	3,0	3,9	2,0	3,5
	Min.-max.	5,3-13,5	0,5-10,9	0,9-14,0	0,8-6,9	0,4-15,4
miricetin	Sr. vrij.	5,4 A	3,1 AB	4,0 AB	2,4 B	3,1 AB
	Std. dev.	2,5	1,8	2,3	1,2	1,9
	Min.-max.	1,8-9,1	0,5-6,1	0,8-10,0	0,8-5,4	0,5-9,4
rutin	Sr. vrij.	1,8 A	1,2 AB	0,9 B	0,7 B	1,2 AB
	Std. dev.	1,0	0,7	0,6	0,4	0,6
	Min.-max.	0,5-3,0	0,4-3,0	0,1-2,4	0,04-1,2	0,1-2,7
kaempferol	Sr. vrij.	0,3 A	0,3 A	0,4 A	0,2 A	0,3 A
	Std. dev.	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3
	Min.-max.	0,1-0,6	0,1-1,1	0,1-1,0	0,1-0,5	0,02-1,0
galna kiselina	Sr. vrij.	38,3 A	43,7 A	43,6 A	42,0 A	40,2 A
	Std. dev.	17,1	15,5	10,9	12,7	14,3
	Min.-max.	12,6-63,9	15,9-74,5	23,6-70,1	12,7-55,0	21,2-87,5
vanilinska kiselina	Sr. vrij.	7,4 A	9,9 A	7,8 A	8,0 A	7,9 A
	Std. dev.	2,4	3,2	3,4	3,0	3,0
	Min.-max.	5,5-11,3	4,8-16,5	0,6-15,8	3,1-14,8	3,8-15,5
ferulinska kiselina	Sr. vrij.	3,3 A	2,7 A	2,8 A	2,3 A	2,9 A
	Std. dev.	1,5	1,2	1,0	1,0	1,1
	Min.-max.	1,6-5,8	1,0-5,3	0,6-6,1	1,1-4,4	1,1-5,6
resveratrol	Sr. vrij.	1,9 A	1,8 A	2,0 A	1,9 A	1,8 A
	Std. dev.	1,0	0,7	1,0	0,6	0,8
	Min.-max.	1,2-3,7	0,7-3,2	0,1-4,4	1,1-3,0	0,8-4,2
tirosol	Sr. vrij.	47,0 A	46,6 A	41,6 AB	35,9 B	43,3 AB
	Std. dev.	8,6	10,8	8,2	8,7	10,6
	Min.-max.	38,1-62,2	27,7-61,5	26,6-60,2	21,6-52,5	19,6-66,6
hidroksitirosol	Sr. vrij.	3,2 A	3,0 A	2,9 A	2,7 A	2,7 A
	Std. dev.	0,4	0,7	0,8	0,8	0,7
	Min.-max.	2,8-3,7	1,6-4,1	0,9-4,8	1,8-4,0	1,0-4,0
triptofan etilester	Sr. vrij.	116 A	251 A	450 AB	421 AB	544 B
	Std. dev.	116	262	332	286	229
	Min.-max.	26,0-284	31,7-871	94,3-1568	126-1070	181-1122

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.
*DPPH• izražen kao mmol/L TEAC; FRAP izražen kao mmol/L $FeSO_4$; ** izražen kao mg GAE/L

Tablica 16. Koncentracije elemenata izraženih po sortama (µg/L).

		Babić	Cabernet Sauvignon	Frankovka	Merlot	Pinot crni	Plavac mali	Teran
K*	Sr. vrij.	1069 A	1066 A	1104 A	962 A	1034 A	1124 A	1038 A
	Std. dev.	215	316	350	313	219	263	201
	Min.-max.	735-1393	604-1827	535-1555	449-1547	797-1256	582-1898	808-1335
Mg*	Sr. vrij.	110,5 A	106,4 A	148,4 B	103,9 A	105,8 A	115,3 A	97,1 A
	Std. dev.	12,1	25,1	17,0	26,3	11,7	19,8	29,2
	Min.-max.	86,3-118,6	70,8-167,8	123,5-176,8	35,3-150,1	91,1-121,7	67,4-153,0	70,6-169,0
Ca*	Sr. vrij.	81,5 A	108,6 A	111,8 A	100,6 A	78,9 A	177,3 A	179,5 A
	Std. dev.	15,3	75,7	74,5	80,9	12,4	217,5	220,6
	Min.-max.	59,3-103,1	49,3-408,6	59,1-283,9	55,9-491,8	61,0-92,3	49,9-845,6	58,2-670,6
Na*	Sr. vrij.	14,3 A	22,8 A	17,1 A	21,4 A	23,1 A	14,5 A	18,1 A
	Std. dev.	6,0	15,8	8,5	13,1	16,3	9,2	8,1
	Min.-max.	2,7-19,9	8,8-79,9	5,7-28,3	4,0-59,6	9,9-55,4	5,1-47,0	6,5-29,7
Fe	Sr. vrij.	4438 A	4760 A	2783 A	4057 A	4506 A	3658 A	6007 A
	Std. dev.	3506	2553	1337	2271	2410	2405	3793
	Min.-max.	1072-10911	706-8959	1006-4590	1156-9769	1352-8268	893-10499	1160-13245
Mn	Sr. vrij.	1485 AB	2276 A	3440 C	2324 A	2436 AC	1265 B	2686 AC
	Std. dev.	345	607	1023	932	890	823	1318
	Min.-max.	869-1890	672-3160	2162-4638	373-4515	1482-3855	509-5079	976-5195
Al	Sr. vrij.	910 A	801 A	557 A	1105 A	972 A	1130 A	1383 A
	Std. dev.	1184	491	328	936	413	1123	831
	Min.-max.	21-3200	147-2019	135-958	62-4089	476-1694	194-4731	401-3049
Zn	Sr. vrij.	528 A	580 A	467 A	537 A	240 A	550 A	464 A
	Std. dev.	135	351	210	251	107	274	286
	Min.-max.	383-735	183-1297	261-837	124-947	137-444	204-1370	131-1077
Cu	Sr. vrij.	149 A	165 A	104 A	249 A	222 A	185 A	153 A
	Std. dev.	69	156	119	211	293	154	101
	Min.-max.	21,4-218	7,4-517	8,7-361	8,3-843	7,7-783	25,4-689	77,4-385
Ni	Sr. vrij.	18,6 A	40,5 AB	66,6 B	48,5 AB	50,3 AB	34,7 AB	52,9 AB
	Std. dev.	7,7	21,6	27,8	30,0	45,5	31,0	17,4
	Min.-max.	4,9-25,5	11,9-83,9	26,7-102,2	11,2-123,1	8,0-132,0	6,1-136	18,6-78,1
Pb	Sr. vrij.	37,8 A	23,5 A	10,2 A	38,2 A	40,5 A	23,8 A	26,9 A
	Std. dev.	42,6	29,0	7,1	45,7	50,5	18,6	29,0
	Min.-max.	2,3-102,6	0,5-100,0	1,9-22,5	0,5-150,8	2,1-131,5	0,5-77,6	0,5-93,6
Cr	Sr. vrij.	16,5 A	16,1 A	14,6 A	17,2 A	15,1 A	22,1 A	16,2 A
	Std. dev.	9,0	9,3	4,3	9,9	4,4	16,8	8,9
	Min.-max.	3,7-28,1	1,0-44,2	7,9-22,6	1,0-42,6	9,0-22,7	1,0-66,1	1,0-31,1
V	Sr. vrij.	3,1 A	3,8 A	7,2 A	5,5 A	2,9 A	4,9 A	8,5 A
	Std. dev.	1,4	2,4	7,4	5,7	1,0	6,9	11,0
	Min.-max.	2,5-6,0	2,5-9,9	2,5-21,3	2,5-27,8	2,5-5,0	2,5-32,9	2,5-36,5
Co	Sr. vrij.	2,0 A	3,1 AB	2,2 A	3,2 AB	1,4 A	2,9 A	6,3 B
	Std. dev.	1,2	3,1	1,0	2,5	1,0	3,5	3,8
	Min.-max.	1,0-3,9	1,0-14,9	1,0-3,3	1,0-9,9	1,0-3,5	1,0-12,1	1,0-13,8
Se	Sr. vrij.	1,5 AB	1,5 AB	1,0 A	1,2 A	1,3 AB	2,3 B	1,3 AB
	Std. dev.	0,7	1,0	0	0,5	0,6	1,8	1,1
	Min.-max.	1,0-2,5	1,0-4,5	1,0-1,0	1,0-3,2	1,0-2,6	1,0-7,8	1,0-4,5
As	Sr. vrij.	0,8 A	1,0 A	0,5 A	1,7 A	1,1 A	2,1 A	1,6 A
	Std. dev.	0,7	1,4	0	1,8	0,7	2,3	1,1
	Min.-max.	0,5-2,1	0,5-6,0	0,5-0,5	0,5-6,9	0,5-2,3	0,5-7,7	0,5-3,9
Cd	Sr. vrij.	0,4 A	0,5 A	0,3 A	0,4 A	1,0 A	0,5 A	0,4 A
	Std. dev.	0,3	0,5	0,2	0,5	1,1	0,6	0,3
	Min.-max.	0,3-0,8	0,3-2,3	0,3-0,7	0,3-2,8	0,3-3,0	0,3-2,8	0,3-1,3

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.
* Izražen u mg/L

Tablica 17. Koncentracije elemenata izraženih po ZOI (µg/L).

		Dalm. zagora	Dingač	Sj. Dalmacija	Sr. i južna Dalmacija	Hrv. Istra	Hrv. Podunavlje	Slavonija
K*	Sr. vrij.	711 A	1396 E	1276 CDE	1053 BCD	989 ABC	926 AB	1305 E
	Std. dev.	170	369	228	236	258	204	227
	Min.-max.	497-944	863-1898	984-1547	562-1569	449-1419	535-1331	993-1827
Mg*	Sr. vrij.	107 AB	132 BC	96,7 A	110 AB	97,6 A	118 ABC	134 C
	Std. dev.	23,4	15,3	21,2	22,5	26,2	15,5	24,9
	Min.-max.	80,0-141	112-153	70,8-118	35,3-150	66,1-169	91,1-148	96,3-177
Ca*	Sr. vrij.	90,7 A	84,9 A	83,5 A	179 A	131 A	99,4 A	111 A
	Std. dev.	19,5	24,2	15,4	217	144	99,1	58,6
	Min.-max.	63,6-122	55,2-119	59,3-103	49,9-846	49,3-671	55,9-492	59,1-284
Na*	Sr. vrij.	16,3 A	12,1 A	15,6 A	14,4 A	17,7 A	33,7 B	15,9 A
	Std. dev.	7,8	7,7	2,3	9,2	8,1	17,2	7,8
	Min.-max.	8,3-29,7	6,3-25,2	13,8-19,9	2,7-47,0	6,5-35,7	9,9-80,0	4,0-28,3
Fe	Sr. vrij.	3775 A	3319 A	5629 A	3766 A	5004 A	4194 A	3318 A
	Std. dev.	2726	1883	3465	2538	3008	1905	2151
	Min.-max.	1156-8179	1740-6301	1734-10912	893-10499	706-13245	1352-9769	1006-8268
Mn	Sr. vrij.	1543 AB	1837 ABC	1616 ABC	1165 A	2575 C	2227 BC	3564 D
	Std. dev.	456	1813	713	492	942	380	680
	Min.-max.	722-2044	955-5079	672-2876	373-2355	976-5195	1482-3212	2459-4638
Al	Sr. vrij.	910 A	504 A	1004 A	1278 A	1093 A	1038 A	491 A
	Std. dev.	722	261	1124	1236	629	719	416
	Min.-max.	62,2-1692	194-838	104-3200	20,7-4731	147-3049	473-3579	135-1694
Zn	Sr. vrij.	762 A	419 AB	480 AB	579 AB	495 AB	379 B	567 AB
	Std. dev.	128	127	164	275	306	238	282
	Min.-max.	569-911	303-590	300-735	204-1370	124-1297	137-1145	201-1035
Cu	Sr. vrij.	231 A	144 A	237 A	213 A	193 A	85,0 A	226 A
	Std. dev.	209	129	174	193	144	111	209
	Min.-max.	40,1-614	45,6-362	140-590	21,4-843	20,9-567	7,4-458	14,2-783
Ni	Sr. vrij.	29,3 A	19,7 A	24,3 A	37,7 A	52,0 A	29,5 A	79,2 B
	Std. dev.	19,5	9,8	6,3	32,3	22,4	17,9	26,9
	Min.-max.	11,2-63,5	6,1-32,8	15,2-34,5	4,9-136	18,6-118,0	8,0-74,0	41,1-132
Pb	Sr. vrij.	56,7 A	22,9 AB	65,3 A	24,7 AB	33,4 AB	9,7 B	22,1 AB
	Std. dev.	49,4	32,3	44,2	17,8	40,0	12,2	33,7
	Min.-max.	4,5-123	0,5-77,6	2,3-103	0,5-78,2	0,5-151	1,8-52,5	1,8-132
Cr	Sr. vrij.	13,1 A	19,5 A	17,0 A	21,9 A	19,2 A	13,0 A	15,1 A
	Std. dev.	2,9	13,6	7,5	17,0	10,4	5,3	5,0
	Min.-max.	10,6-17,8	8,0-37,2	9,7-28,1	1,0-66,1	1,0-44,2	1,0-22,7	7,9-25,3
V	Sr. vrij.	2,5 A	2,5 A	3,1 A	5,9 A	6,0 A	3,8 A	6,4 A
	Std. dev.	0	0	1,4	8,0	7,1	2,9	6,2
	Min.-max.	2,5-2,5	2,5-2,5	2,5-6,0	2,5-32,9	2,5-36,5	2,5-12,9	2,5-21,3
Co	Sr. vrij.	2,3 A	1,3 A	2,4 A	3,1 A	4,7 A	2,6 A	1,9 A
	Std. dev.	1,5	0,6	1,2	3,7	3,8	1,3	1,0
	Min.-max.	1,0-4,4	1,0 -2,4	1,0-3,9	1,0-12,1	1,0-14,9	1,0-5,8	1,0-3,7
Se	Sr. vrij.	1,7 A	1,8 A	1,5 A	2,2 A	1,4 A	1,2 A	1,2 A
	Std. dev.	1,0	0,7	0,7	1,8	1,0	0,5	0,6
	Min.-max.	1,0-3,1	1,0-2,5	1,0-2,5	1,0-7,8	1,0-4,5	1,0-2,6	1,0-3,3
As	Sr. vrij.	0,9 A	2,0 A	1,8 A	2,0 A	1,5 A	1,2 A	0,6 A
	Std. dev.	0,8	2,5	2,6	2,3	1,4	1,1	0,4
	Min.-max.	0,5-2,5	0,5-6,3	0,5-6,9	0,5-7,7	0,5-6,0	0,5-3,9	0,5-1,5
Cd	Sr. vrij.	1,2 A	0,7 AB	0,6 AB	0,4 B	0,4 B	0,5 AB	0,5 AB
	Std. dev.	1,1	1,0	0,2	0,5	0,3	0,6	0,4
	Min.-max.	0,3-2,8	0,3-2,4	0,3-0,8	0,3-2,8	0,3-1,6	0,3-3,0	0,3-1,6

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.

* Izražen u mg/L

Tablica 18. Koncentracije biogenih amina (mg/L) i okratoksina A (µg/L) izraženih po sortama.

		Babić	Cabernet Sauvignon	Frankovka	Merlot	Pinot crni	Plavac mali	Teran
putrescin	Sr. vrij.	6,5 A	6,5 A	5,5 A	5,2 A	3,3 A	6,0 A	4,7 A
	Std. dev.	2,2	2,6	2,1	3,6	1,4	3,4	2,2
	Min.-max.	3,5-9,1	3,4-14,1	3,3-9,6	1,0-13,4	2,0-5,8	1,5-14,0	1,8-9,2
histamin	Sr. vrij.	3,8 A	2,1 AB	2,0 AB	1,0 B	0,9 B	3,0 A	2,2 AB
	Std. dev.	2,5	2,2	1,5	1,1	1,2	2,5	1,6
	Min.-max.	0,9-7,1	0,1-8,5	0,4-4,6	0,2-3,8	0,1-3,3	0,1-7,1	0,1-4,4
tiramin	Sr. vrij.	1,5 A	1,5 A	2,4 A	0,7 A	0,5 A	1,9 A	1,5 A
	Std. dev.	1,2	1,7	2,9	1,0	0,3	2,1	1,2
	Min.-max.	0,1-3,5	0,1-5,9	0,1-8,4	0,1-3,5	0,1-0,9	0,1-8,0	0,1-3,6
kadaverin	Sr. vrij.	0,8 A	0,9 A	0,9 A	0,8 A	0,6 A	1,0 A	0,9 A
	Std. dev.	0,4	0,5	0,6	0,6	0,3	0,6	0,8
	Min.-max.	0,2-1,3	0,3-2,2	0,2-2,0	0,1-2,7	0,2-1,0	0,3-3,0	0,3-3,0
okratoksin A	Sr. vrij.	0,055 AB	0,023 A	0,032 A	0,021 A	0,028 A	0,072 B	0,021 A
	Std. dev.	0,025	0,017	0,027	0,023	0,026	0,043	0,010
	Min.-max.	0,015-0,094	0,004-0,066	0,003-0,079	0,003-0,106	0,008-0,079	0,009-0,163	0,010-0,039

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.

Tablica 19. Koncentracije biogenih amina (mg/L) i okratoksina A (µg/L) izraženih po ZOI.

		Dalm. Zagora	Dingač	Sj. Dalmacija	Sr. i Južna Dalmacija	Hrv. Istra	Hrv. Podunavlje	Slavonija
putrescin	Sr. vrij.	9,3 A	6,8 AB	5,6 AB	5,8 AB	4,6 B	6,3 AB	4,3 B
	Std. dev.	4,8	4,0	2,1	3,2	2,2	2,6	2,6
	Min.-max.	3,6-14,1	3,9-13,8	3,5-9,1	1,5-14,1	1,0-10,2	2,5-12,4	1,2-9,6
histamin	Sr. vrij.	0,9 A	4,2 B	4,3 B	2,4 AB	1,8 AB	1,1 A	2,3 AB
	Std. dev.	1,4	3,0	2,1	2,3	1,9	1,0	1,8
	Min.-max.	0,1-3,6	1,0-7,1	1,0-7,1	0,1-6,9	0,1-8,5	0,1-3,3	0,3-5,6
tiramin	Sr. vrij.	0,6 A	2,5 A	2,0 A	1,6 A	1,0 A	1,0 A	2,6 A
	Std. dev.	0,8	3,2	1,3	1,8	1,0	1,1	2,8
	Min.-max.	0,1-2,0	0,1-6,4	0,8-3,5	0,1-8,1	0,1-3,6	0,1-3,4	0,1-8,4
kadaverin	Sr. vrij.	0,8 A	0,8 A	0,7 A	1,0 A	0,8 A	0,7 A	1,0 A
	Std. dev.	0,4	0,3	0,4	0,6	0,6	0,3	0,6
	Min.-max.	0,2-1,4	0,6-1,1	0,2-1,3	0,1-3,0	0,1-3,0	0,2-1,2	0,2-2,0
okratoksin A	Sr. vrij.	0,020 A	0,095 C	0,065 BC	0,061 BC	0,020 A	0,028 AB	0,023 AB
	Std. dev.	0,011	0,025	0,031	0,044	0,015	0,025	0,019
	Min.-max.	0,007-0,036	0,062-0,124	0,025-0,106	0,009-0,163	0,003-0,068	0,003-0,079	0,003-0,060

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.

Tablica 20. Koncentracije biogenih amina (mg/L) i okratoksina A (µg/L) izraženih po godištu berbe.

		2011.	2012.	2013.	2014.	2015.
putrescin	Sr. vrij.	5,2 A	5,6 A	6,0 A	6,2 A	5,2 A
	Std. dev.	1,3	3,2	3,4	3,4	2,8
	Min.-max.	3,4-6,9	1,2-13,5	1,0-14,1	1,8-14,1	1,6-13,4
histamin	Sr. vrij.	1,3 A	2,0 A	2,0 A	3,4 A	1,9 A
	Std. dev.	1,6	2,0	2,1	2,7	1,8
	Min.-max.	0,1-4,4	0,1-5,8	0,1-7,1	0,1-8,5	0,1-7,1
tiramin	Sr. vrij.	0,8 A	2,0 A	1,4 A	2,0 A	1,1 A
	Std. dev.	0,7	2,6	1,8	1,6	1,4
	Min.-max.	0,2-1,8	0,1-8,4	0,1-6,4	0,1-5,7	0,1-5,9
kadaverin	Sr. vrij.	0,6 A	0,8 A	0,8 A	0,8 A	1,1 A
	Std. dev.	0,3	0,6	0,5	0,4	0,6
	Min.-max.	0,2-1,0	0,2-2,0	0,1-2,2	0,1-1,7	0,3-3,0
okratoksin A	Sr. vrij.	0,019 A	0,027 A	0,045 A	0,051 A	0,039 A
	Std. dev.	0,020	0,035	0,035	0,045	0,035
	Min.-max.	0,03-0,057	0,003-0,138	0,003-0,124	0,010-0,163	0,006-0,141

Rezultati su obrađeni jednosmjernom ANOVA-om. Različita velika slova u istom retku označavaju statistički različite rezultate prema post hoc Tukey HSD testu.

Tablica 21. Udio kontaminiranih vina izraženih s obzirom na sortu, ZOI, godište berbe i tradicionalnu oznaku kvalitete.

		Kadaverin	Putrescin	Histamin	Tiramin	Okratoksin A
% kontaminiranih	Ukupno (n=110)	100	100	88,2	82,7	92,8
% kontaminiranih po sorti	Babić (n=6)	100	100	100	83,3	100
	Cab. Sauvignon (n=20)	100	100	100	90,0	100
	Frankovka (n=9)	100	100	100	88,9	77,8
	Merlot (n=27)	100	100	74,1	81,5	77,8
	Pinot crni (n=6)	100	100	100	83,3	100
	Plavac mali (n=32)	100	100	87,5	78,1	100
	Teran (n=10)	100	100	80,0	80,0	100
% kontaminiranih po ZOI	Dalm. zagora (n=6)	100	100	66,7	83,4	100
	Dingač (n=5)	100	100	100	80,0	100
	Sj. Dalmacija (n=6)	100	100	100	100	100
	Sr. i j. Dalmacija (n=32)	100	100	83,3	76,7	100
	Hrv. Istra (n=29)	100	100	86,1	82,8	96,6
	Hrv. Podunavlje (n=18)	100	100	88,9	83,3	83,3
	Slavonija (n=14)	100	100	100	92,9	78,6
% kontaminiranih po godištu	2011. (n=6)	100	100	83,3	100	83,3
	2012. (n=15)	100	100	94,1	88,2	70,6
	2013. (n=33)	100	100	84,8	81,8	93,9
	2014. (n=17)	100	100	93,3	100	100
	2015. (n=39)	100	100	87,2	71,8	100
% kontaminiranih po kvaliteti	Kvalitetno vino (n=69)	100	100	89,9	84,1	95,7
	Vrhunsko vino (n=41)	100	100	85,4	80,5	87,8

4.4. Koeficijenti korelacije među analiziranim nutraceutičkim i antinutraceutičkim komponentama

Tablica 22. Pearsonovi koeficijenti korelacije među vrijednostima antioksidacijskih testova, ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih spojeva

	DPPH•	**FRAP**	**ukupni fenoli**	**katehin**	**kvercetin**	**miricetin**	**rutin**	**kaempferol**	**galna kiselina**	**vanilinska kiselina**	**ferulinska kiselina**	**resveratrol**	**tirosol**	**hidroksitirosol**
DPPH•	1,000													
FRAP	0,623	1,000												
ukupni fenoli	0,561	0,725	1,000											
katehin	0,158	0,229	0,259	1,000										
kvercetin	0,355	0,181	0,165	-0,176	1,000									
miricetin	0,239	0,109	0,029	-0,183	0,766	1,000								
rutin	0,078	0,204	0,037	-0,084	0,308	0,395	1,000							
kaempferol	0,277	0,210	0,126	-0,171	0,663	0,415	0,251	1,000						
galna kiselina	0,424	0,512	0,408	0,330	0,059	-0,094	-0,113	0,017	1,000					
vanilinska kiselina	-0,066	0,005	-0,089	0,562	-0,281	-0,191	0,036	-0,235	0,247	1,000				
ferulinska kiselina	0,123	0,153	0,075	0,054	0,151	0,256	0,296	0,144	-0,107	0,151	1,000			
resveratrol	-0,008	-0,007	-0,051	0,099	0,135	0,337	0,010	-0,010	-0,010	0,179	0,194	1,000		
tirosol	0,279	0,364	0,271	0,077	-0,011	0,133	0,348	0,008	0,190	0,058	0,243	-0,121	1,000	
hidroksitirosol	0,260	0,218	0,159	0,030	0,285	0,332	0,107	0,114	0,081	-0,020	0,226	0,206	0,108	1,000

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

Tablica 23. Pearsonovi koeficijenti korelacije među koncentracijama makro- i mikroelemenata te elemenata u tragovima

	K	**Mg**	**Ca**	**Na**	**Fe**	**Mn**	**Al**	**Zn**	**Cu**	**Ni**	**Pb**	**Cr**	**V**	**Co**	**Se**	**As**	**Cd**
K	1,000																
Mg	0,183	1,000															
Ca	0,099	-0,096	1,000														
Na	0,107	0,027	-0,009	1,000													
Fe	0,009	-0,126	0,434	0,065	1,000												
Mn	0,129	0,205	-0,075	0,154	0,081	1,000											
Al	0,021	-0,077	0,197	0,096	0,500	-0,058	1,000										
Zn	0,047	0,002	0,278	-0,027	0,217	-0,061	0,107	1,000									
Cu	0,128	-0,094	0,022	-0,127	0,169	-0,003	0,037	0,145	1,000								
Ni	0,274	0,018	0,135	0,015	0,145	0,400	0,131	0,241	0,134	1,000							
Pb	0,113	-0,288	0,113	-0,093	0,454	-0,063	0,311	0,350	0,407	0,321	1,000						
Cr	0,123	0,135	0,219	-0,017	0,186	-0,082	0,390	0,251	0,010	0,261	0,245	1,000					
V	0,060	0,063	0,447	0,028	0,439	0,076	0,436	0,272	0,057	0,289	0,161	0,305	1,000				
Co	0,082	-0,193	0,441	0,083	0,526	0,156	0,532	0,328	-0,027	0,307	0,340	0,380	0,469	1,000			
Se	0,170	-0,017	0,371	-0,023	0,194	-0,215	0,180	0,111	-0,024	0,061	0,090	0,271	0,169	0,292	1,000		
As	0,282	0,000	0,258	0,241	0,341	0,061	0,641	0,116	0,228	0,103	0,280	0,393	0,360	0,515	0,354	1,000	
Cd	-0,180	-0,048	0,006	-0,107	0,026	-0,079	0,063	-0,090	-0,010	-0,010	0,211	0,123	-0,044	-0,042	0,274	0,100	1,000

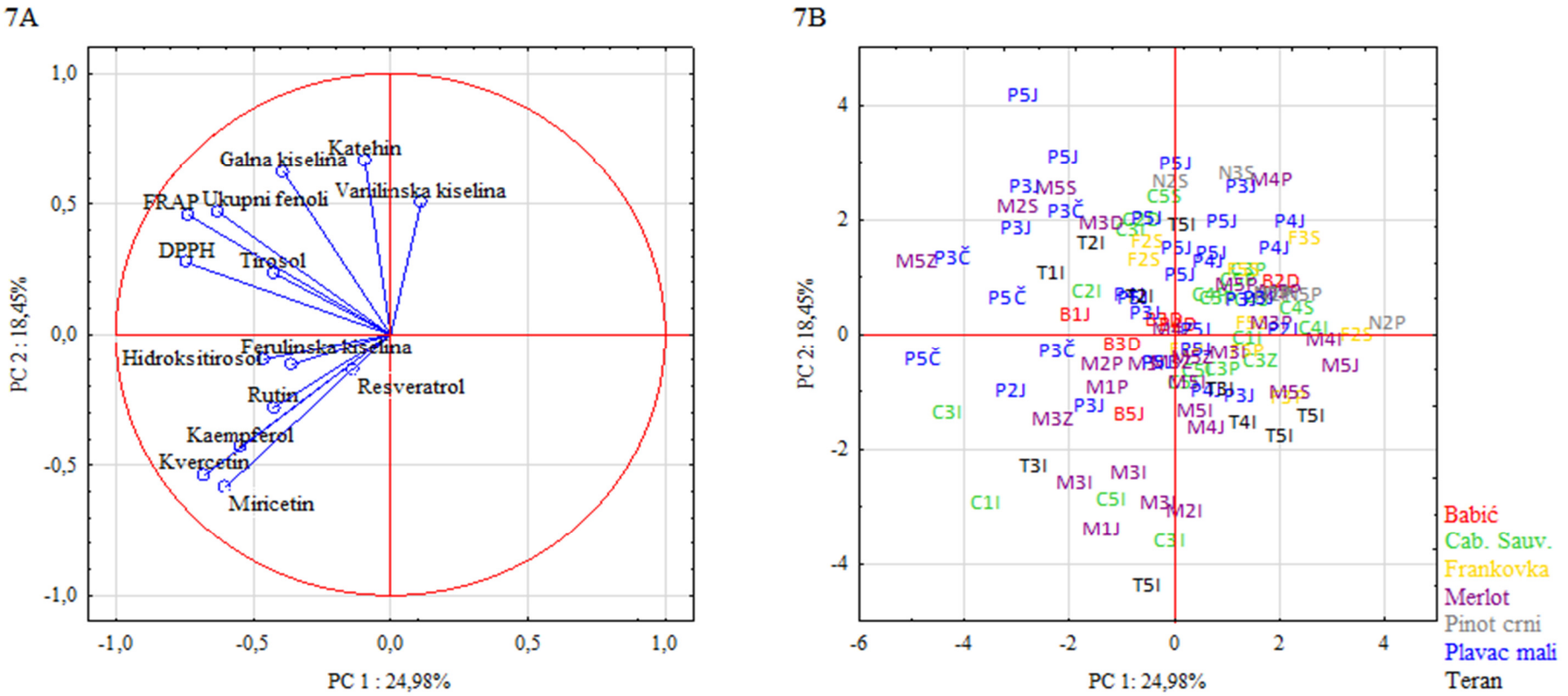
Crvenom bojom označeni su statistički značajni koeficijenti korelacije ($p < 0,05$)

Tablica 24. Pearsonovi koeficijenti korelacije među volumnim postotkom etanola, koncentracijom SO_2 (konzervansa), pH-vrijednosti, koncentracijama jabučne i mliječne kiseline te koncentracijama kontaminanata nastalih mikrobiološkom aktivnošću

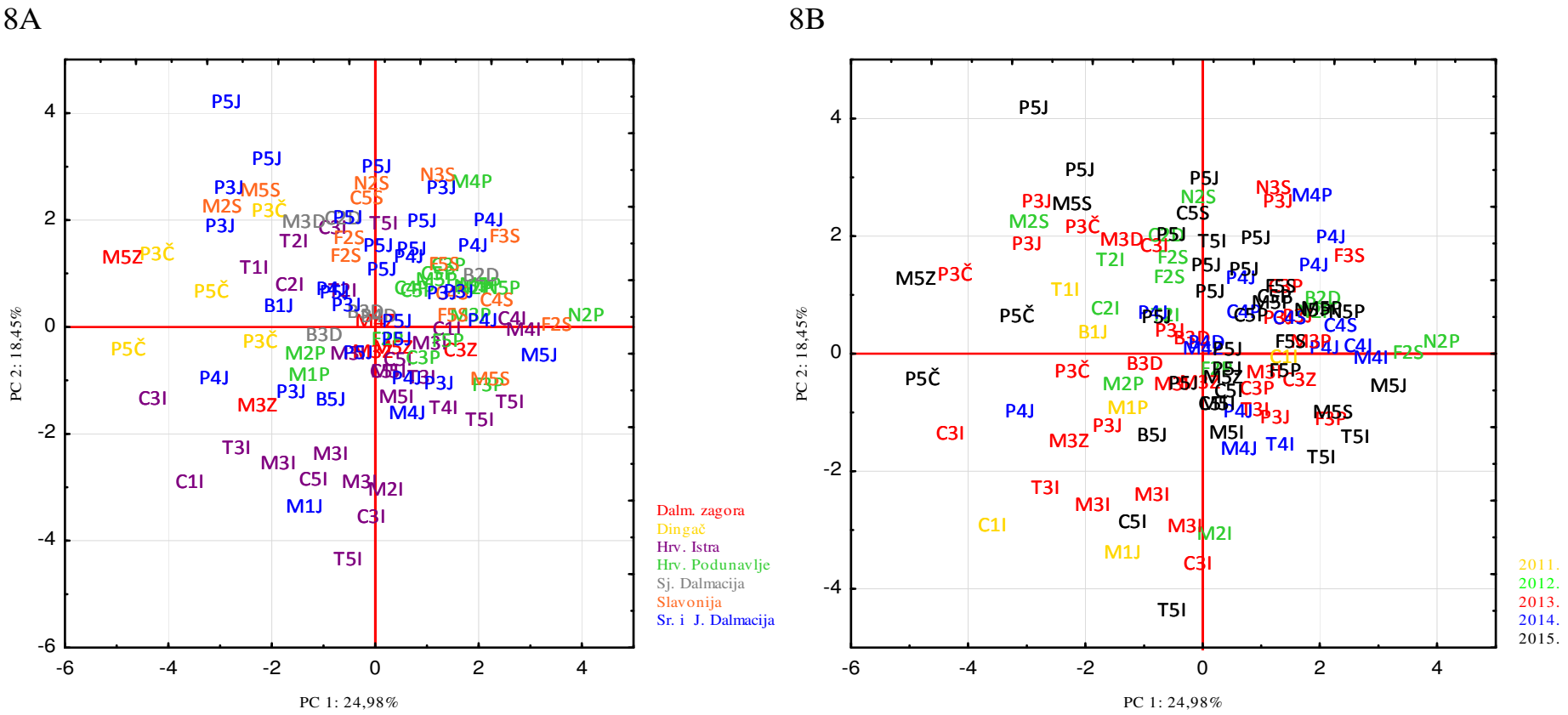
	etanol	**SO_2**	**pH**	**jabučna kiselina**	**mliječna kiselina**	**putrescin**	**histamin**	**kadaverin**	**tiramin**	**okratoksin A**
etanol	1,000									
SO_2	-0,212	1,000								
pH	0,126	-0,101	1,000							
jabučna kiselina	0,024	0,201	-0,312	1,000						
mliječna kiselina	-0,357	-0,148	0,430	-0,315	1,000					
putrescin	-0,055	-0,062	-0,151	0,075	-0,017	1,000				
histamin	-0,189	-0,105	0,304	-0,328	0,156	0,362	1,000			
kadaverin	0,038	0,102	0,037	0,100	0,000	-0,038	0,059	1,000		
tiramin	-0,121	-0,022	0,300	-0,140	0,302	0,410	0,605	-0,004	1,000	
okratoksin A	-0,044	0,035	0,365	-0,042	-0,004	0,065	0,281	-0,008	0,261	1,000

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

4.5. Analiza glavnih komponenata (PCA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranja) hrvatskih crnih vina sa ZOI s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe

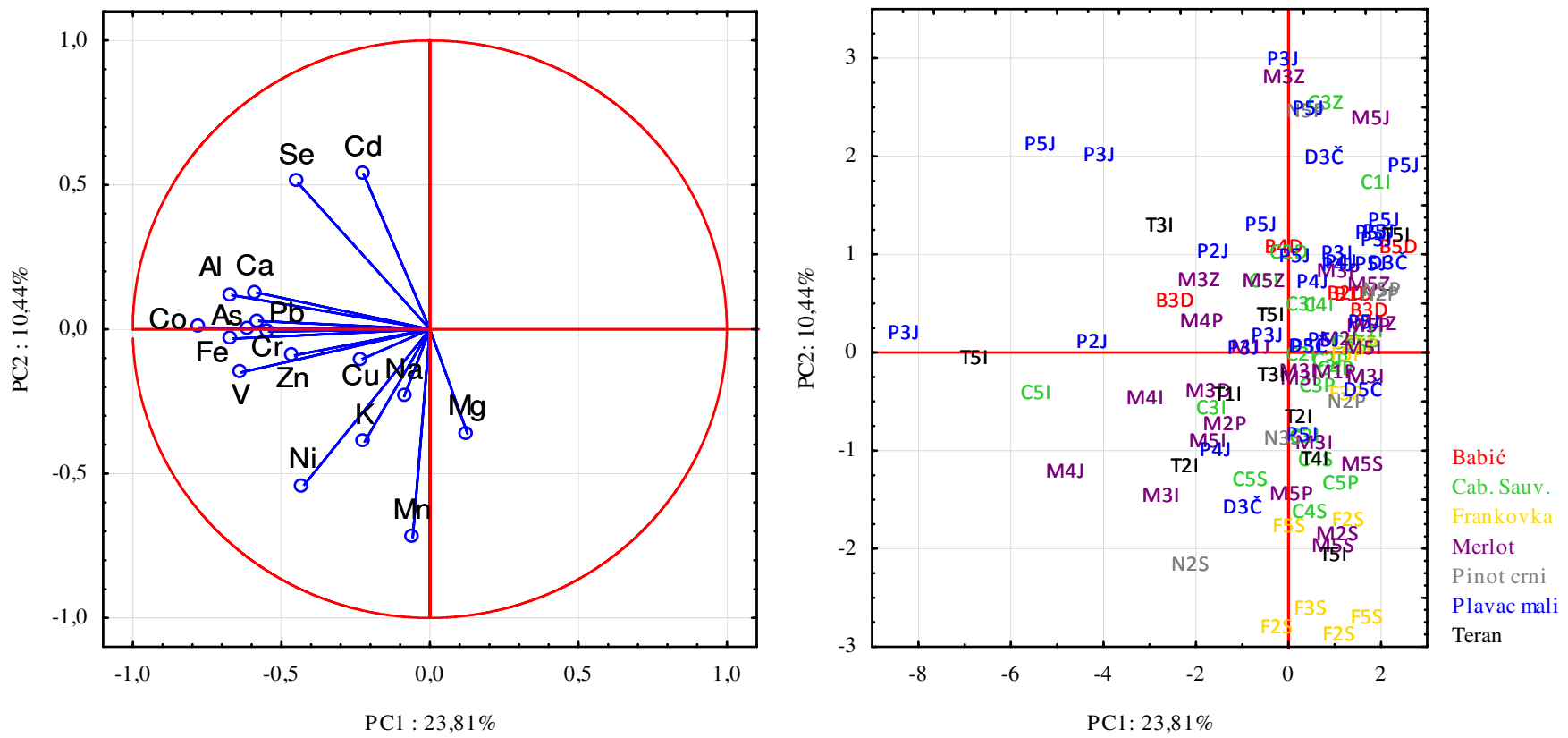


Slika 7. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija varijabli (antioksidacijski kapacitet, ukupni fenoli i pojedinačni fenoli) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (7A); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na sorte) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (7B). Različite sorte označene su različitim bojama, oznake uzoraka objašnjene su u Tablici 5.

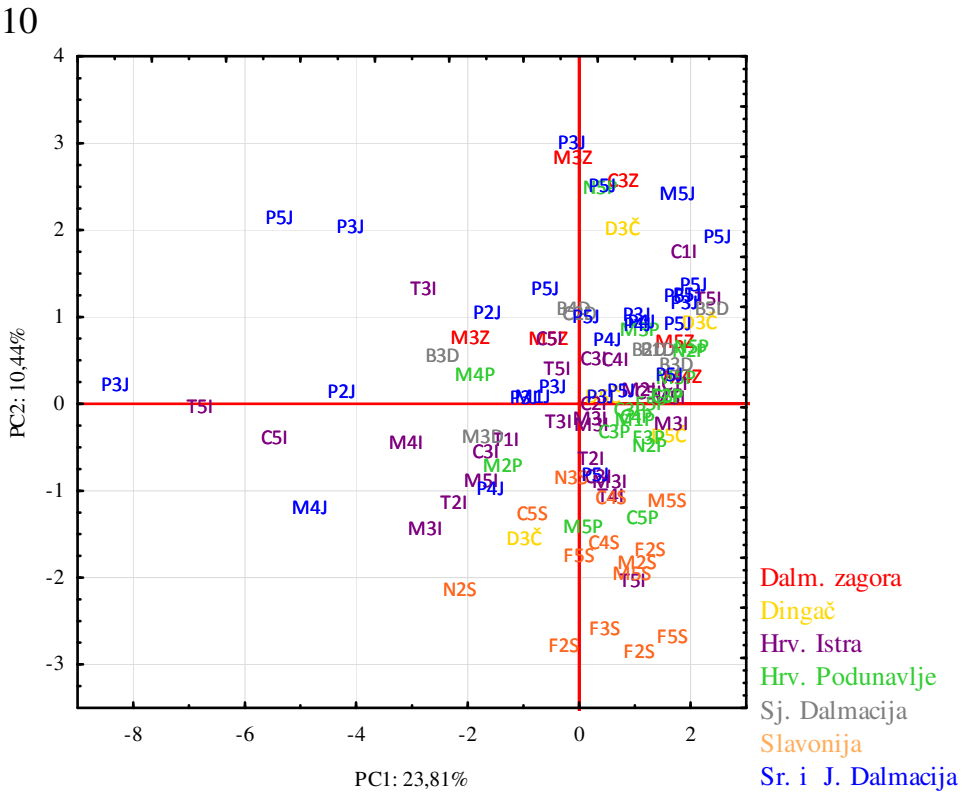


Slika 8. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na ZOI) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (8A); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na godište berbe) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (8B). Različite ZOI, odnosno godišta berbe označeni su različitim bojama, oznake uzoraka objašnjene su u Tablici 5.

9A 9B



Slika 9. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija varijabli (elemenata) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (9A); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na sorte) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (9B). Različite sorte označene su različitim bojama, oznake uzoraka objašnjene su u Tablici 5.



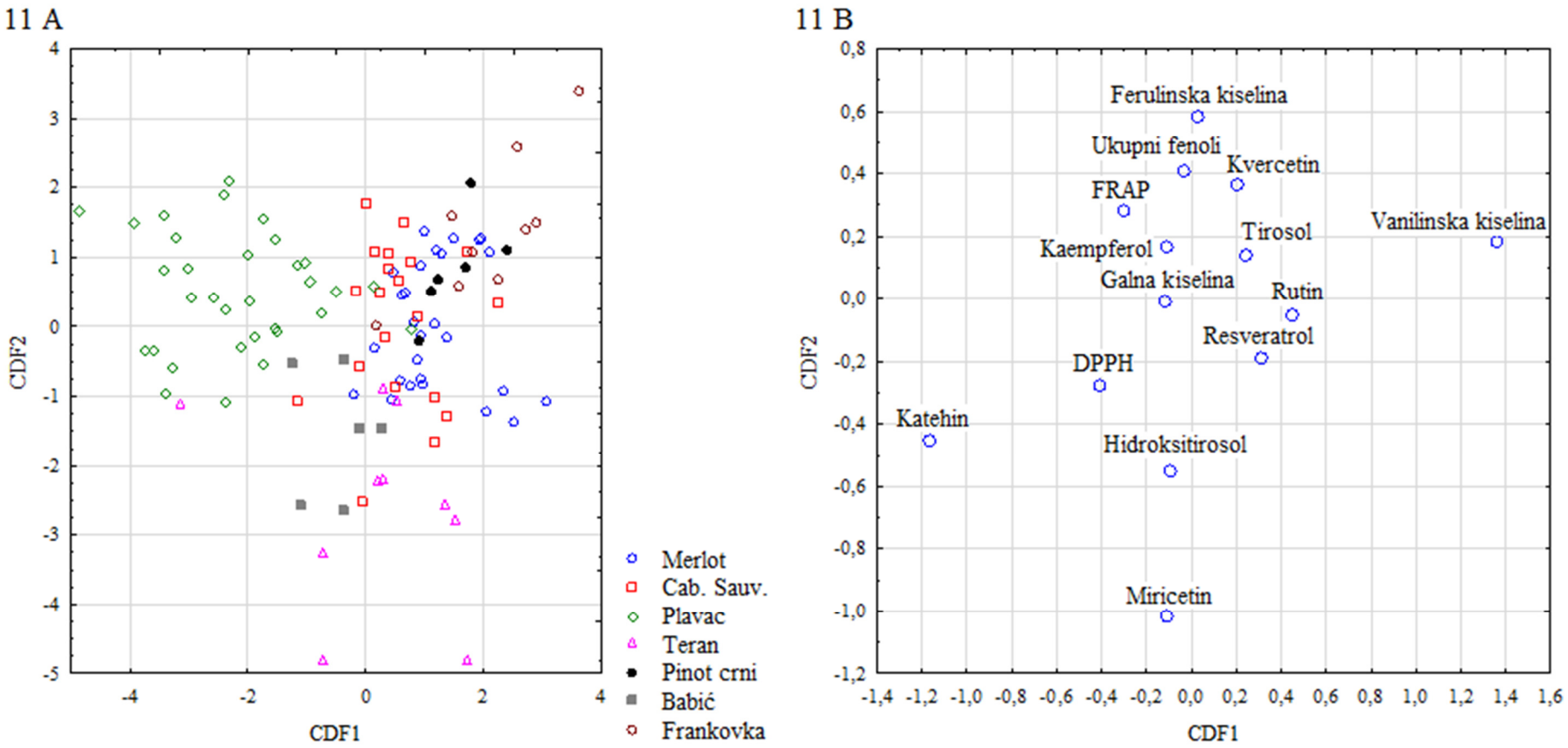
Slika 10. Analiza glavnih komponenata (PCA): projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na ZOI) na faktorsku ravninu PC1xPC2. Različite ZOI označene su različitim bojama, oznake uzoraka objašnjene su u Tablici 5.

4.6. Kanonička diskriminacijska analiza (CDA) za utvrđivanje sličnosti (grupiranja) hrvatskih crnih vina sa ZOI s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe

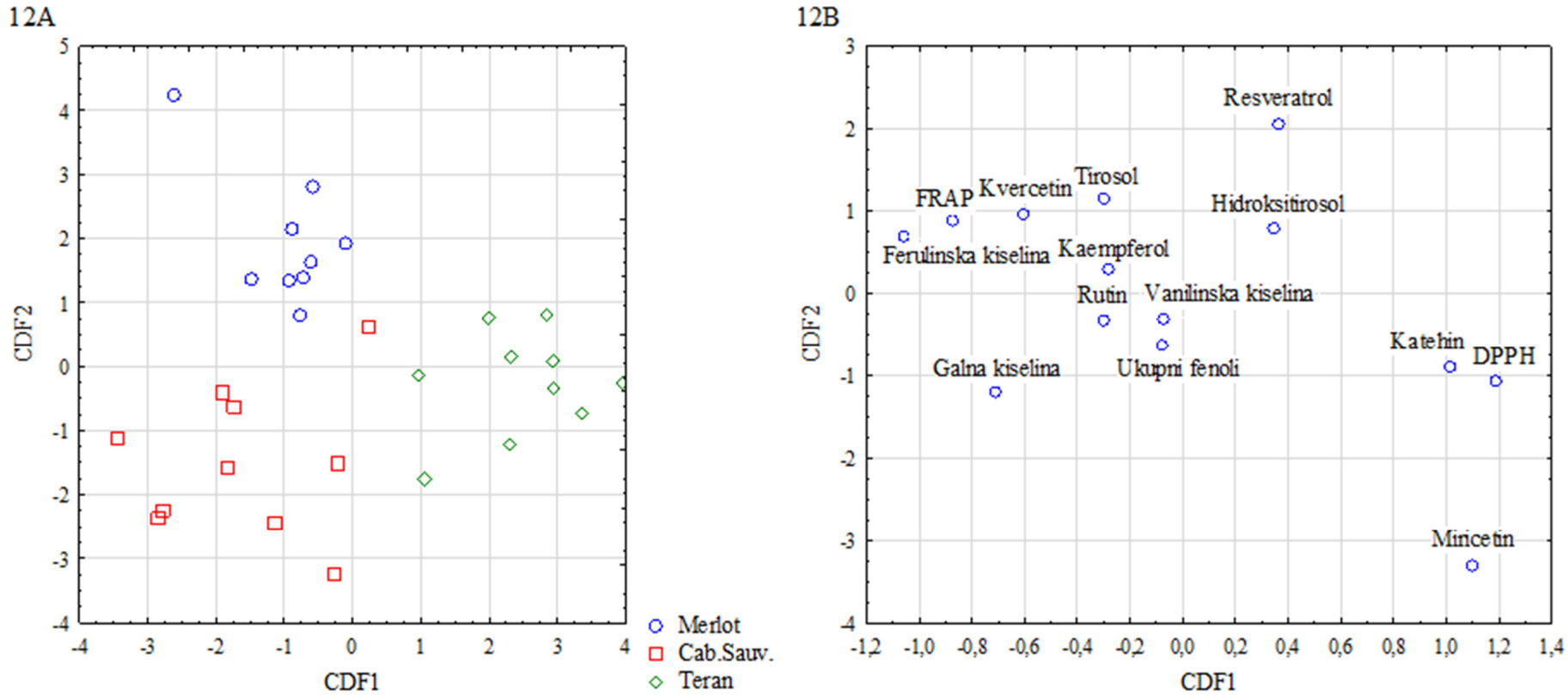
Tablica 25. Kanonička diskriminacijska analiza (nezavisne varijable: rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta te koncentracija ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih spojeva)

	Kanonička diskriminacijska funkcija	**Svojstvena vrijednost (eigenvrijednost)**	**Kanonička korelacija**	**Wilksov lambda**	**Značajnost p**	**Postotak varijance**
Ukupno	CDF1(S)	2,49	0,84	0,06	<0,001	55
	CDF2(S)	1,08	0,72	0,21	<0,001	24
	CDF3(S)	0,37	0,52	0,44	0,002	8
	CDF1(R)	1,10	0,72	0,28	<0,001	61
	CDF2(R)	0,71	0,65	0,58	<0,001	39
	CDF1(Z)	1,96	0,81	0,09	<0,001	55
	CDF2(Z)	0,74	0,65	0,26	<0,001	20
	CDF3(Z)	0,39	0,53	0,46	0,005	11
	CDF1(G)	0,59	0,61	0,38	<0,001	52
	CDF2(G)	0,25	0,45	0,61	0,131	22
	CDF3(G)	0,20	0,41	0,77	0,323	18
Merlot, Cab. Sauv. i Teran u Istri	CDF1(S/I)	3,63	0,89	0,07	0,003	62
	CDF2(S/I)	2,22	0,83	0,31	0,044	38
Merlot po regijama	CDF1(M/R)	1,59	0,78	0,16	0,047	53
	CDF2(M/R)	1,38	0,76	0,42	0,051	47
Merlot po ZOI	CDF1(M/Z)	1,85	0,81	0,06	0,081	42
	CDF2(M/Z)	1,43	0,77	0,17	0,087	33
	CDF3(M/Z)	0,69	0,64	0,42	0,094	13
Plavac po godištima	CDF1(P/G)	1,98	0,82	0,13	0,015	54
	CDF2(P/G)	1,68	0,79	0,37	0,053	46

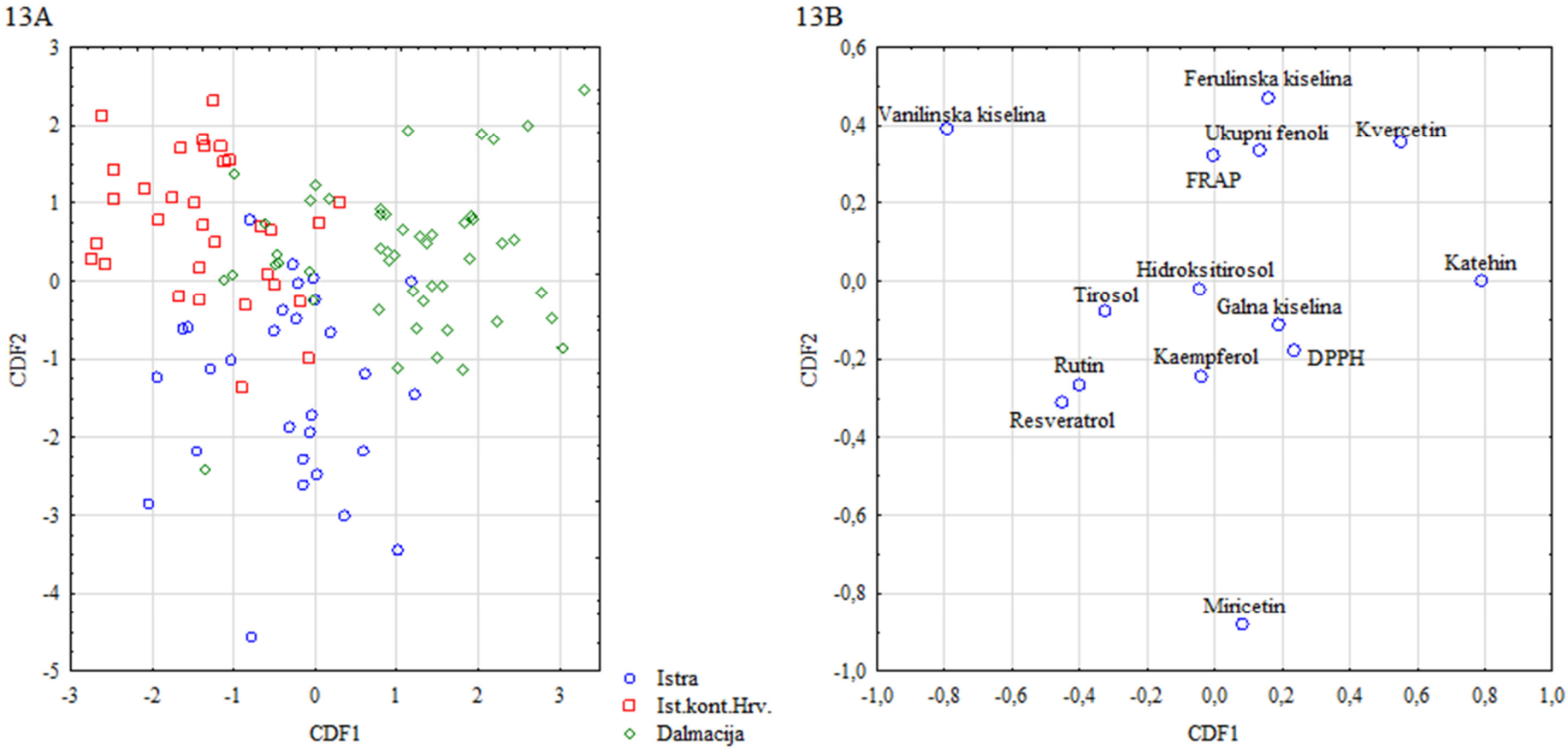
(S) – sorta; (R) – regija; (Z) – ZOI; (G) – godište berbe; (S/I) – različite sorte u Istri; (M/R) – Merlot u različitim regijama; (M/Z) – Merlot u različitim ZOI; (P/G) – Plavac u različitim godištima berbe



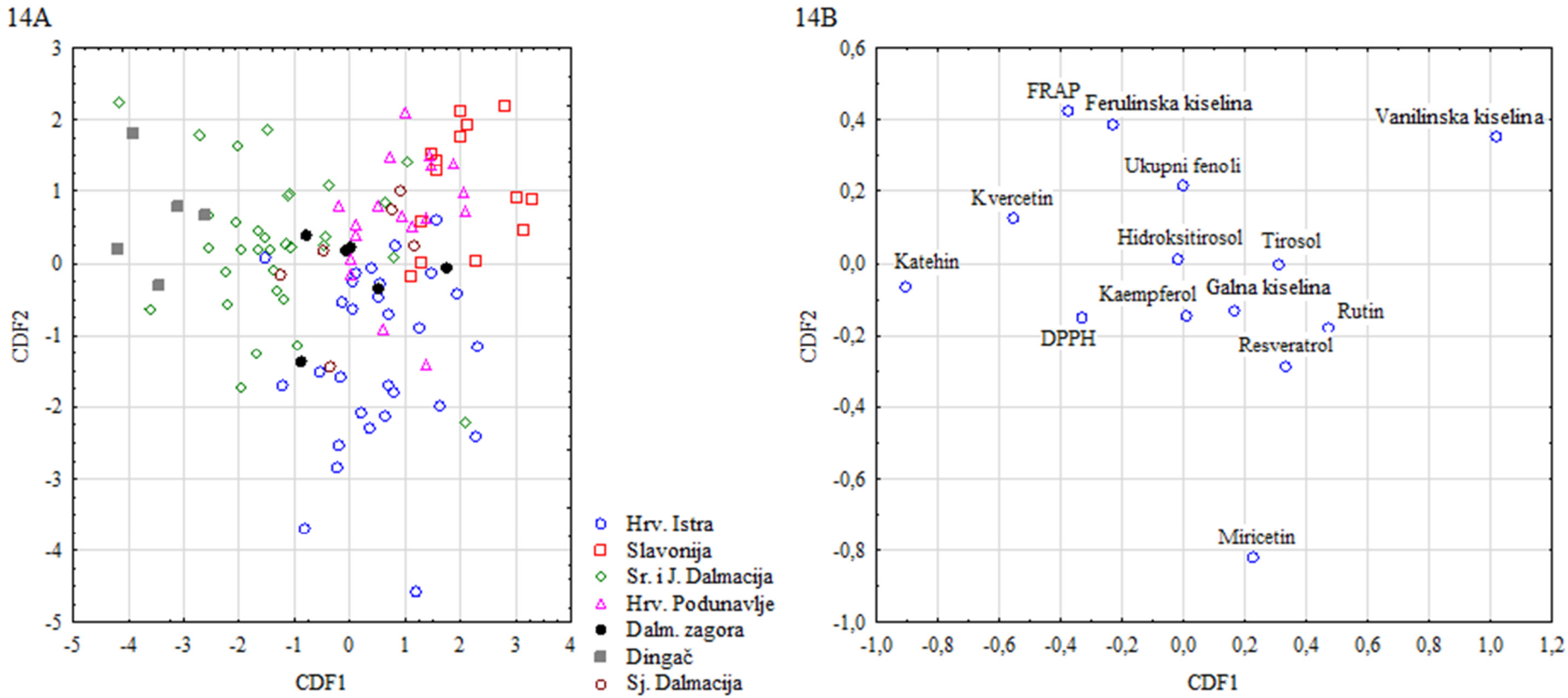
Slika 11. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na sortu (11A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (11B)



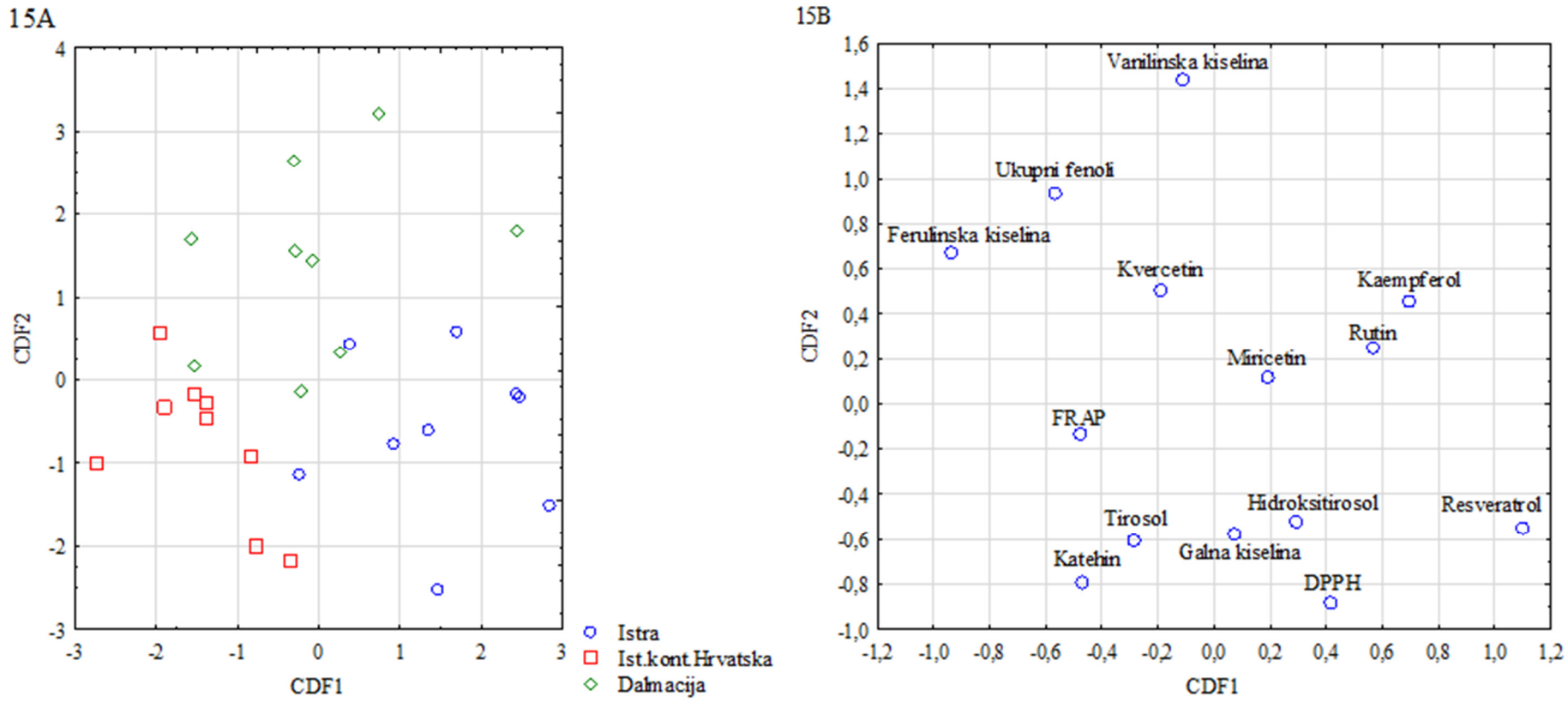
Slika 12. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na sortu u regiji Istra (12A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (12B)



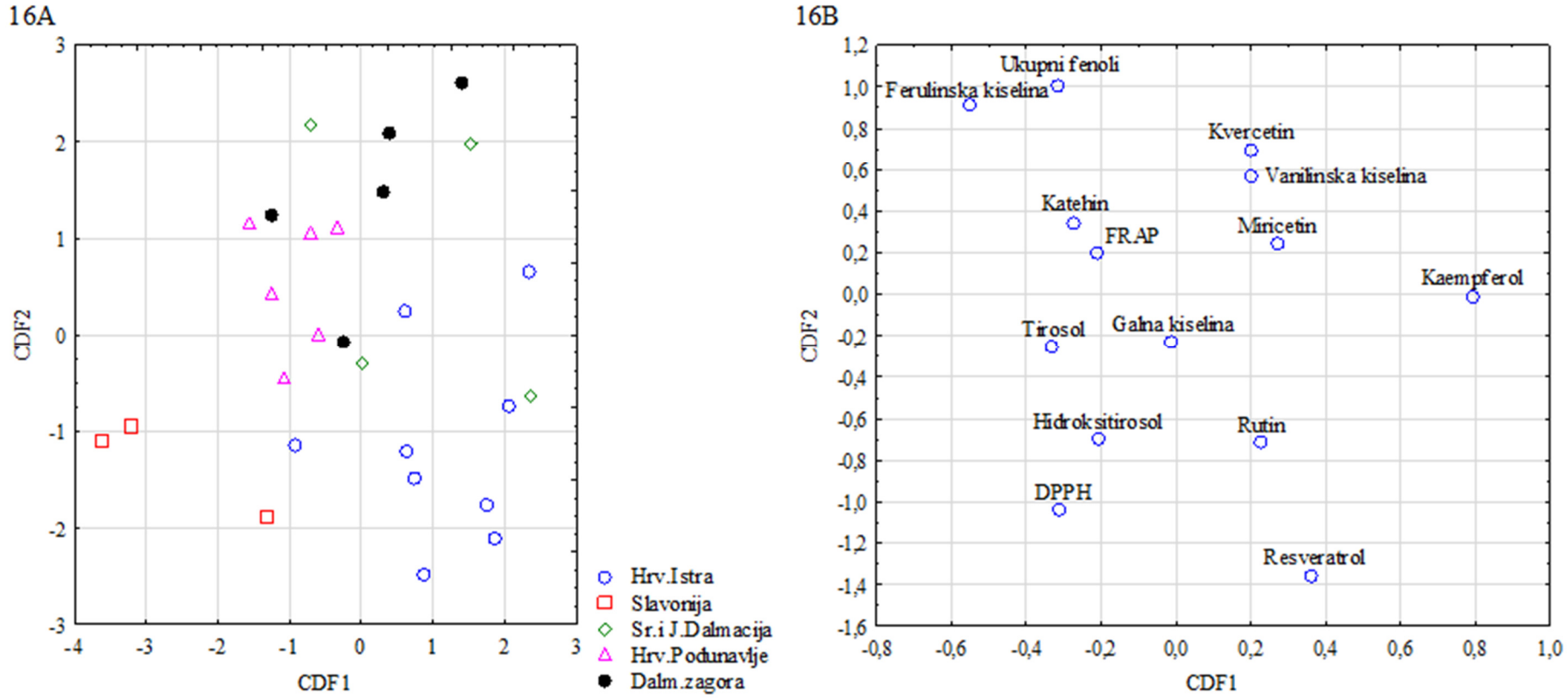
Slika 13. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na regiju (13A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (13B)



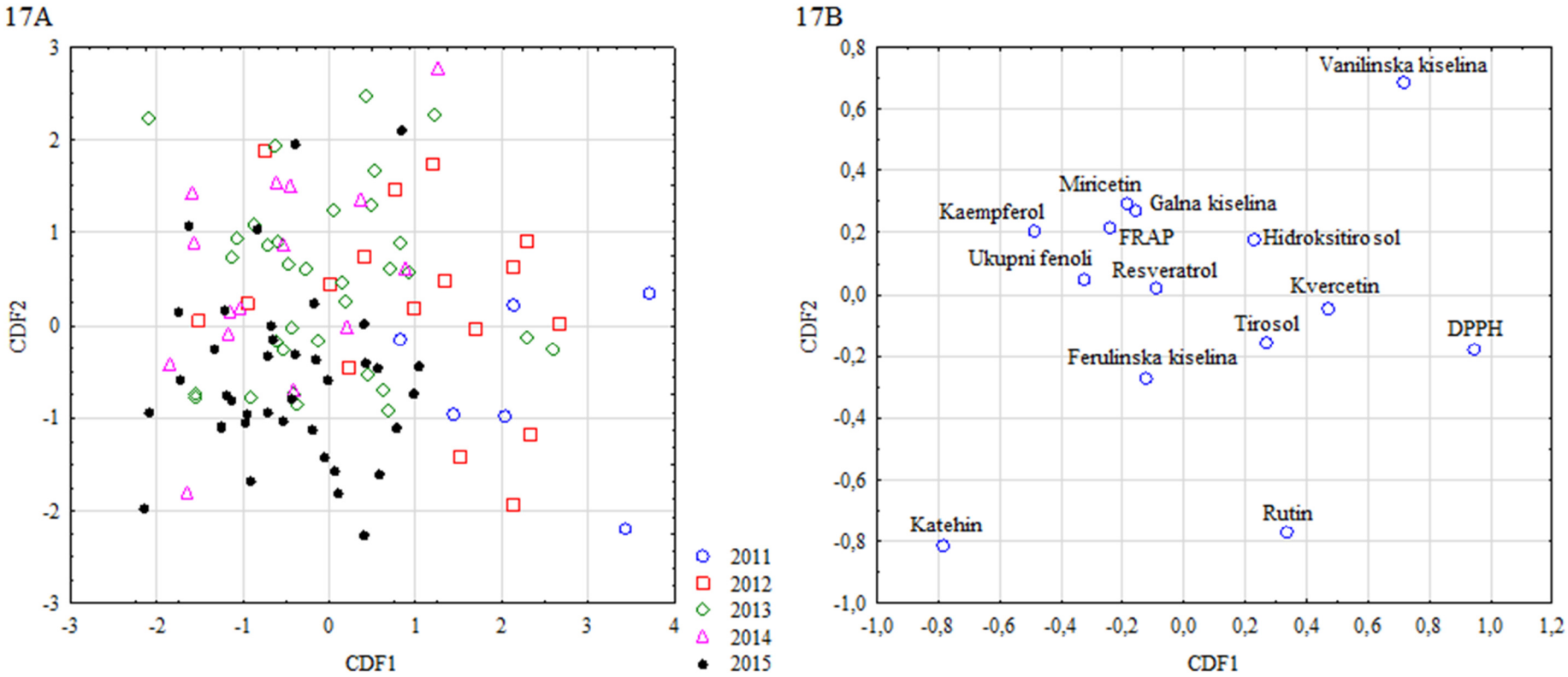
Slika 14. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na ZOI (14A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (14B)



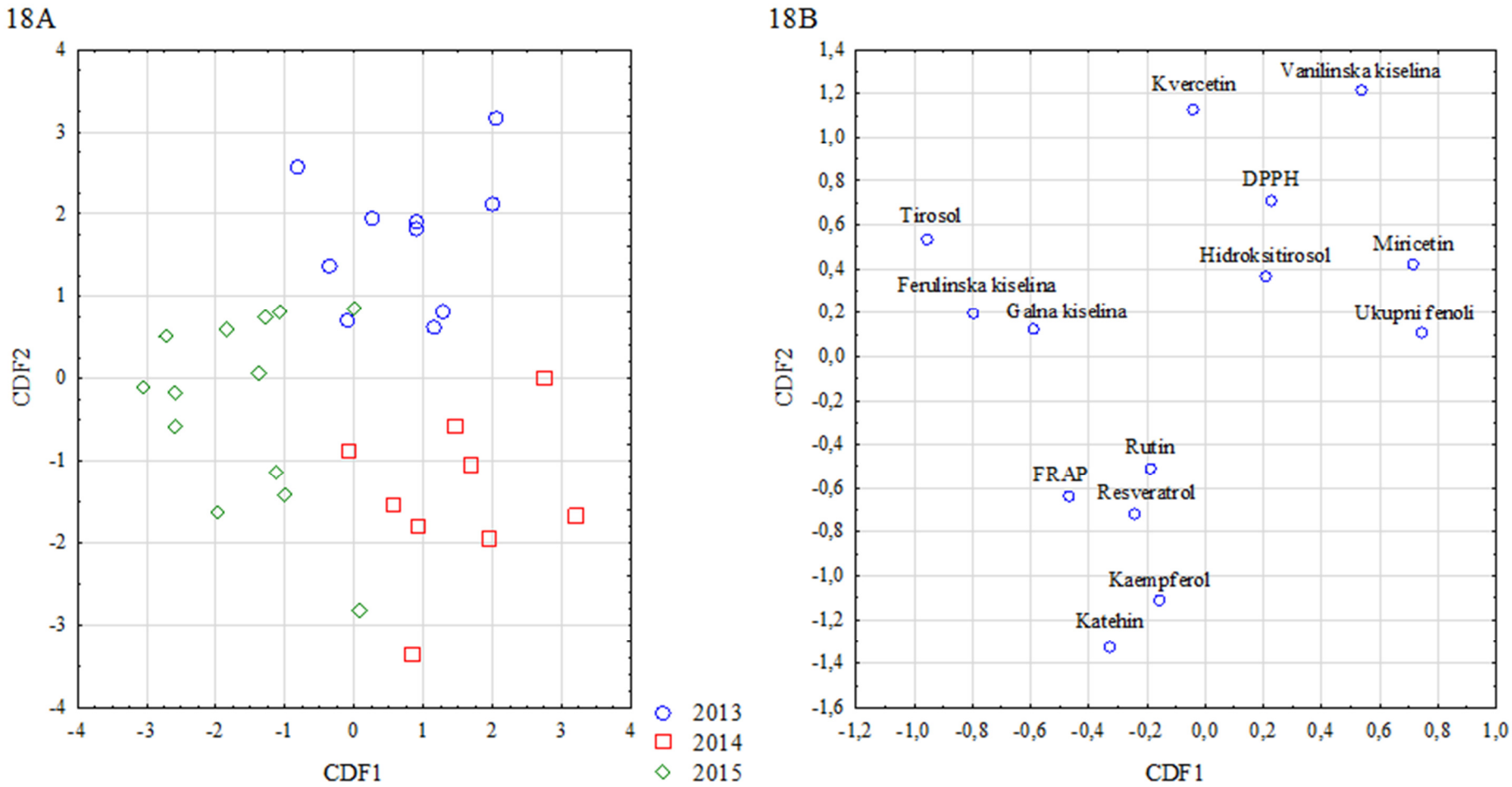
Slika 15. Projekcija vina sorte Merlot klasificiranih s obzirom na regiju (15A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (15B)



Slika 16. Projekcija vina sorte Merlot klasificiranih s obzirom na ZOI (16A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (16B)



Slika 17. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na godište berbe (17A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (17B)



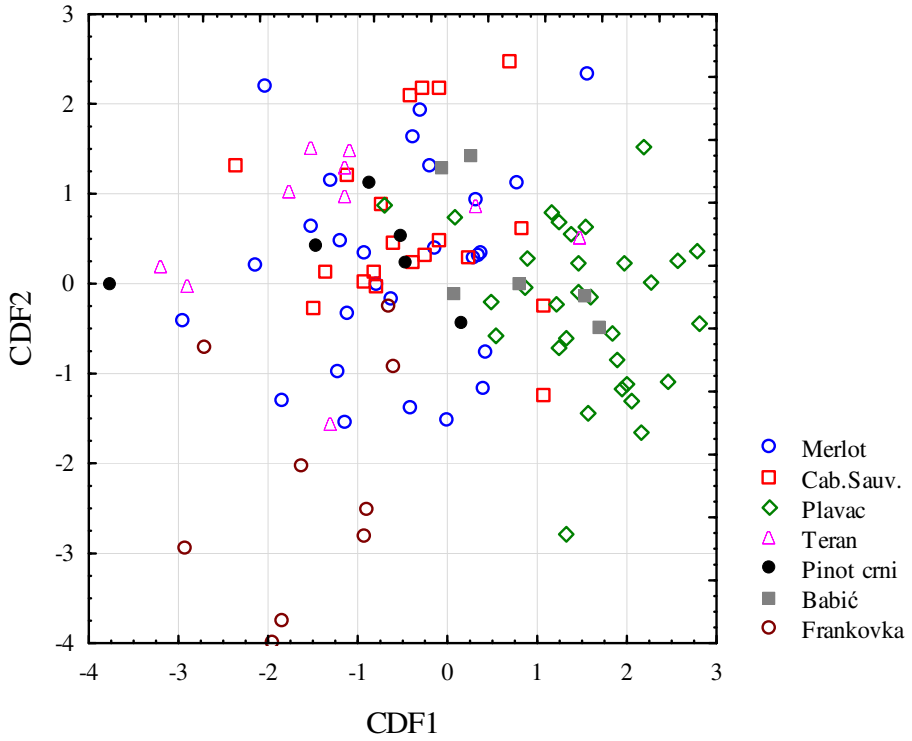
Slika 18. Projekcija vina sorte Plavac mali klasificiranih s obzirom na godište berbe (18A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (18B)

Tablica 26. Kanonička diskriminacijska analiza (nezavisne varijable: koncentracije makroelemenata, mikroelemenata i elemenata u tragovima)

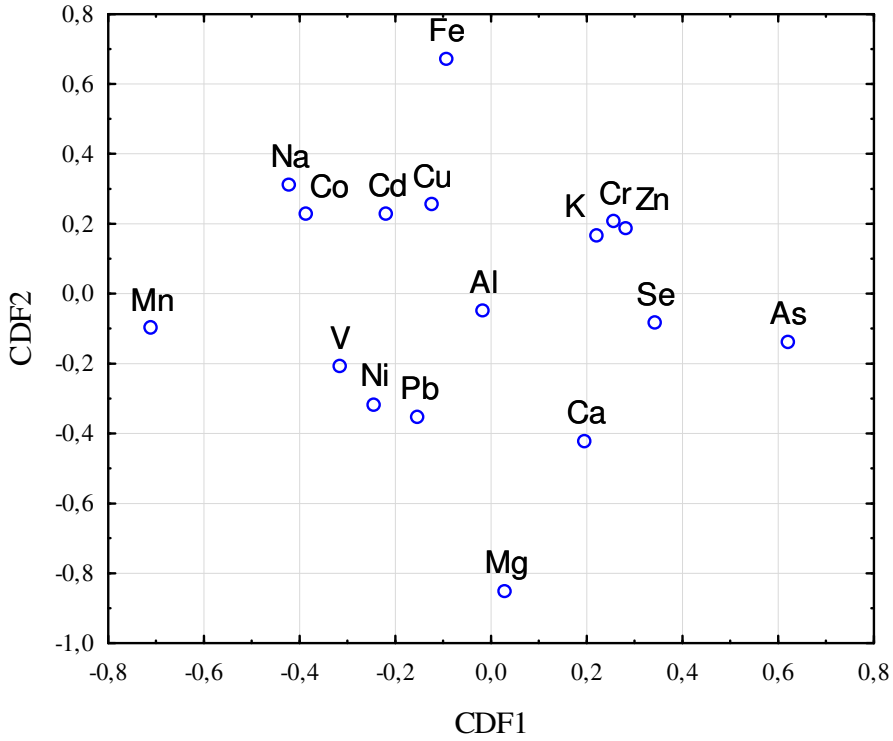
	Diskriminacijska funkcija	**Eigenvrijednost**	**Kanonička korelacija**	**Wilksov lambda**	**Značajnost p**	**Postotak varijance**
Ukupno	CDF1(S)	1,40	0,76	0,14	<0,001	51
	CDF2(S)	0,60	0,61	0,32	0,016	22
	CDF3(S)	0,29	0,48	0,52	0,340	11
	CDF1(R)	1,80	0,80	0,24	<0,001	78
	CDF2(R)	0,51	0,58	0,66	<0,001	22
	CDF1(Z)	2,44	0,84	0,03	<0,001	45
	CDF2(Z)	1,38	0,76	0,11	<0,001	24
	CDF3(Z)	0,63	0,62	0,26	<0,001	12
Merlot, Cab. Sauv. i Teran u Istri	CDF1(S/I)	1,92	0,81	0,17	0,057	65
	CDF2(S/I)	1,01	0,71	0,50	0,070	35
Merlot po regijama	CDF1(M/R)	9,01	0,95	0,04	0,037	88
	CDF2(M/R)	1,28	0,75	0,44	0,656	12
Merlot po ZOI	CDF1(M/Z)	22,4	0,98	<0,01	<0,001	63
	CDF2(M/Z)	9,11	0,95	0,01	0,038	25
	CDF3(M/Z)	3,24	0,87	0,12	0,366	9

(S) – sorta; (R) – regija; (Z) – ZOI; (S/I) – različite sorte u Istri; (M/R) – Merlot u različitim regijama; (M/Z) – Merlot u različitim ZOI

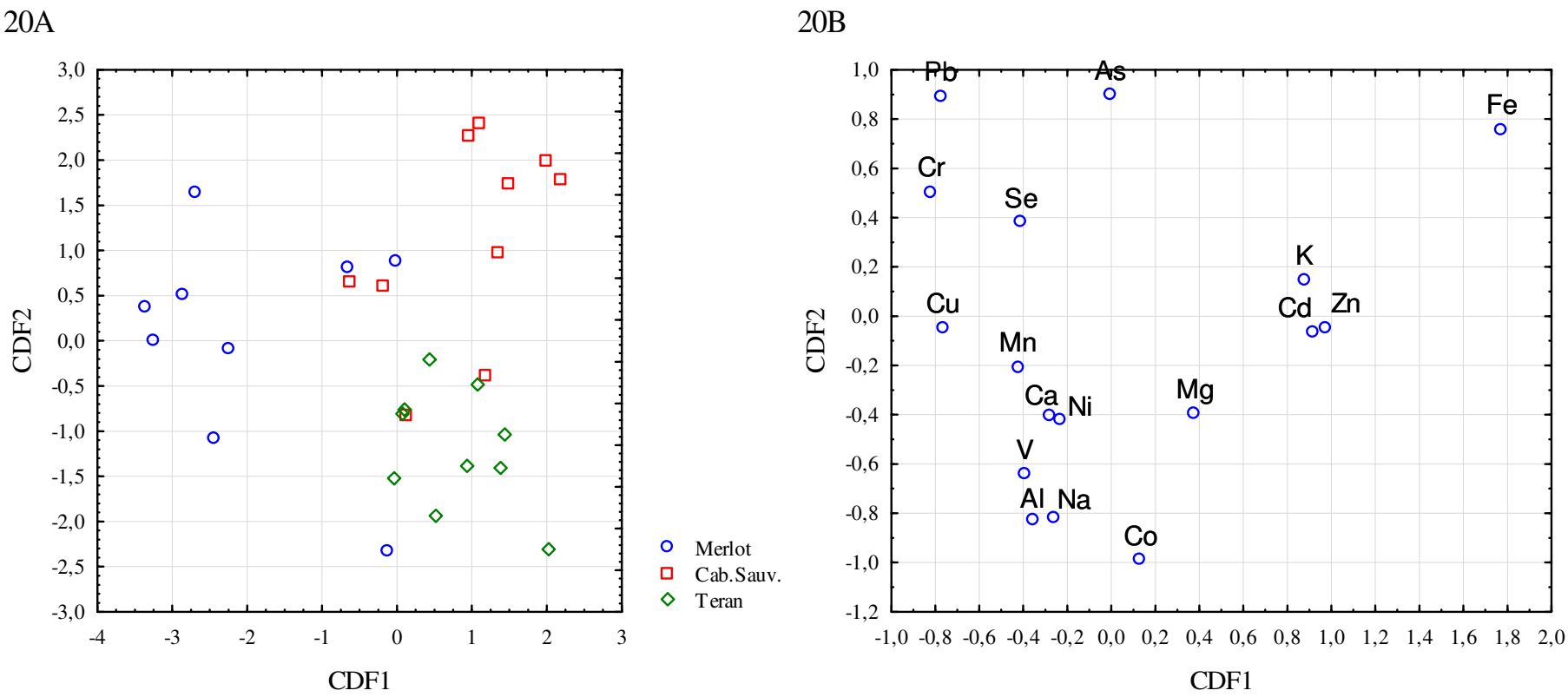
19A



19B

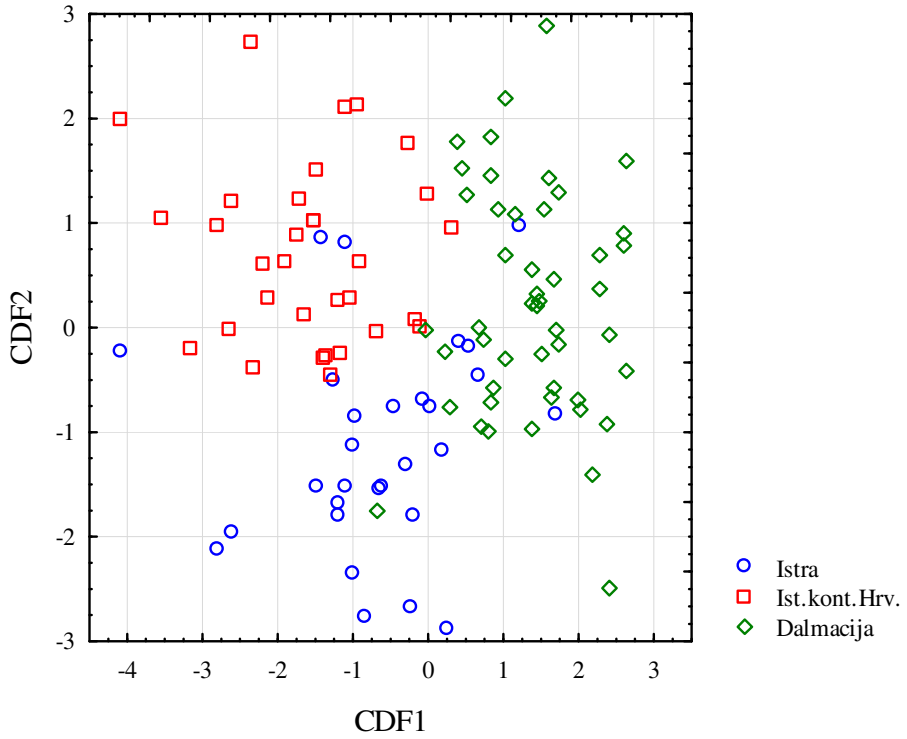


Slika 19. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na sortu (19A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (19B)

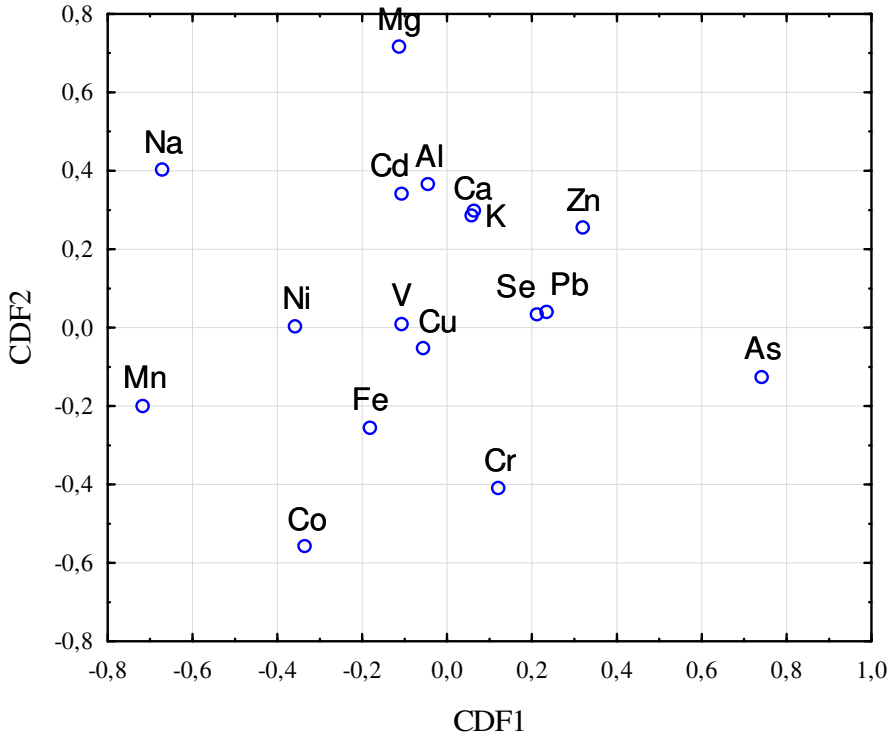


Slika 20. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na sortu u regiji Istra (20A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (20B)

21A

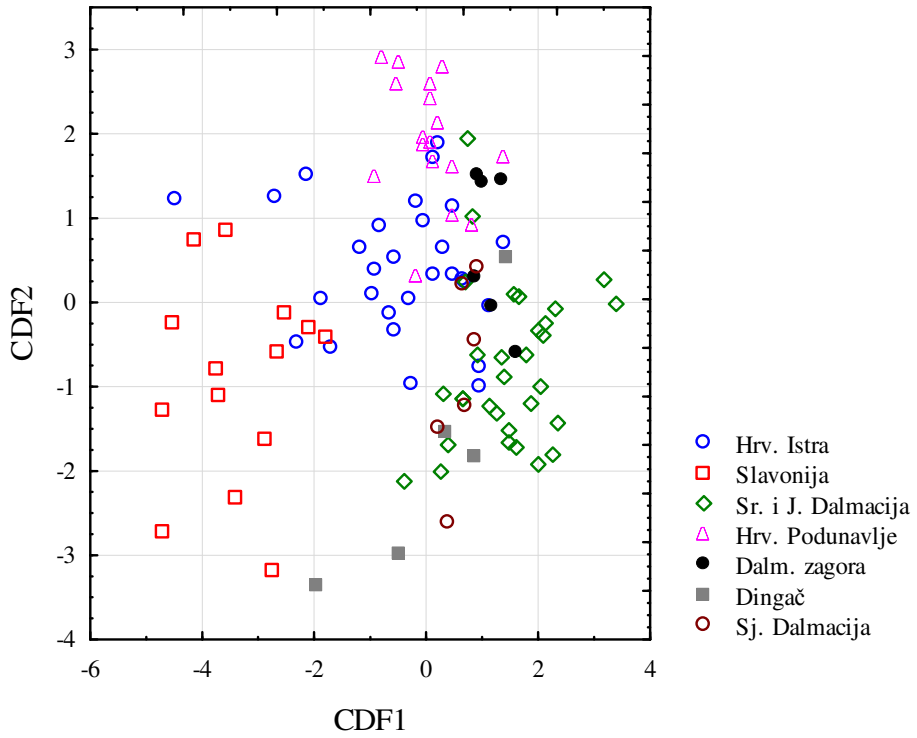


21B

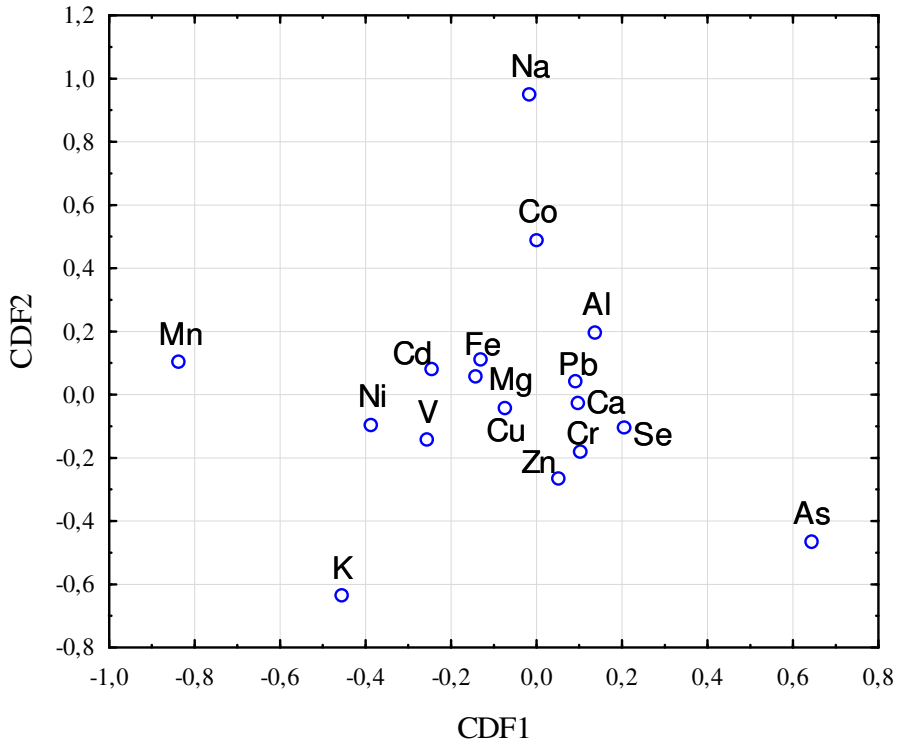


Slika 21. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na regiju (21A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (21B)

22A

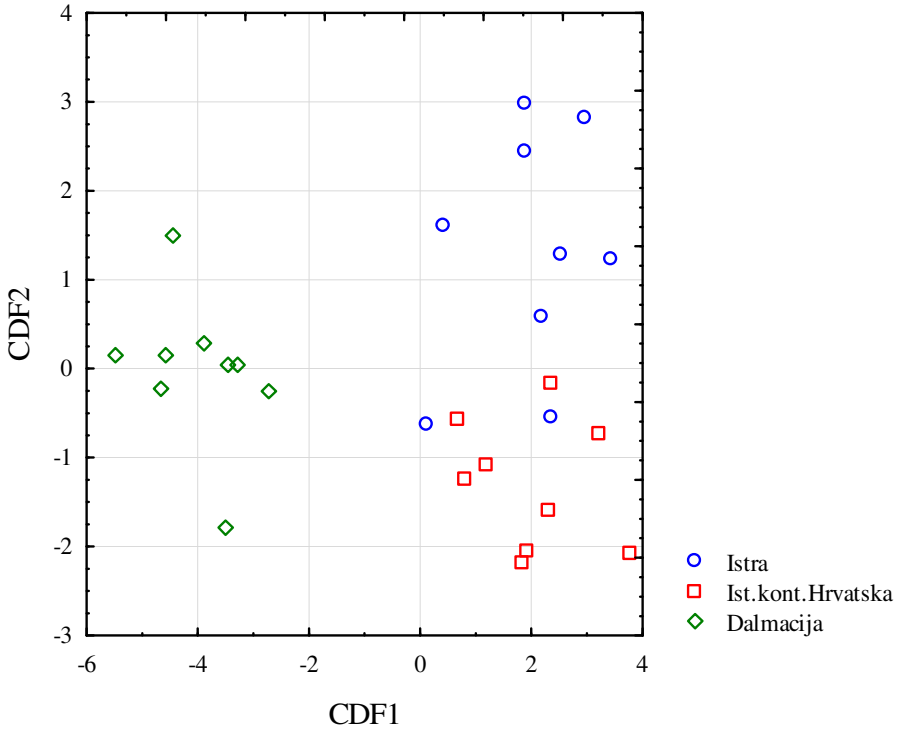


22B

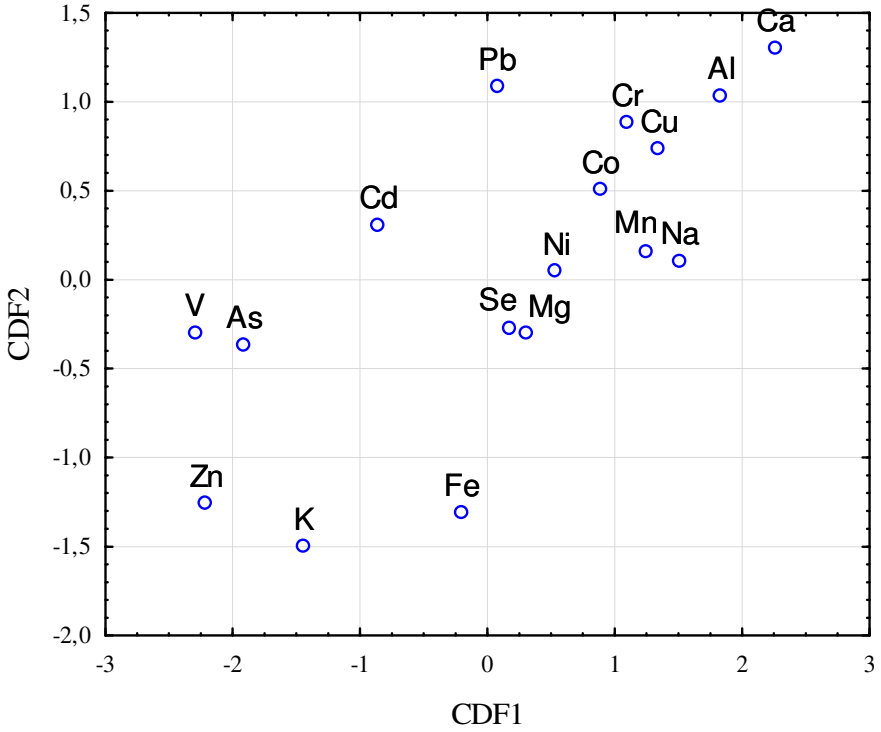


Slika 22. Projekcija vina klasificiranih s obzirom na ZOI (22A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (22B)

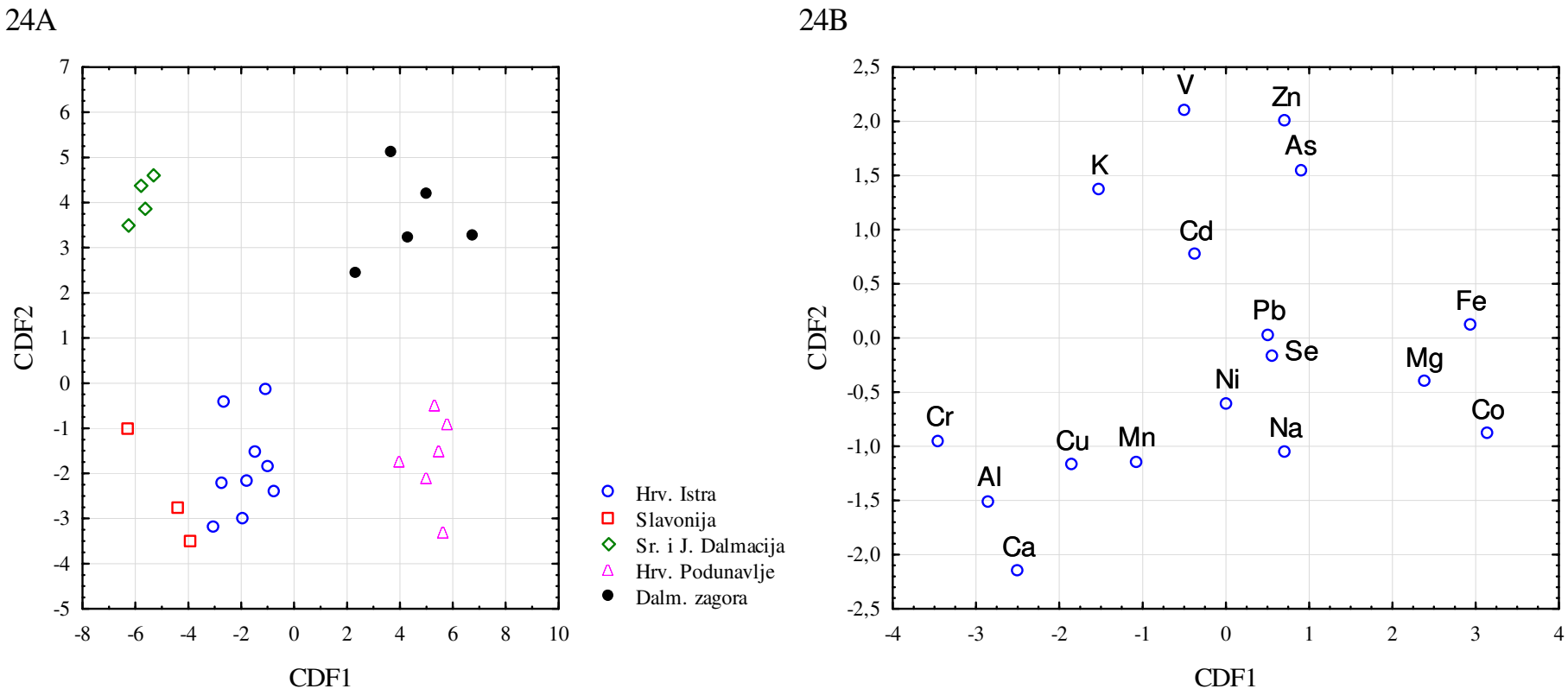
23A



23B



Slika 23. Projekcija vina sorte Merlot klasificiranih s obzirom na regiju (23A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (23B)



Slika 24. Projekcija vina sorte Merlot klasificiranih s obzirom na ZOI (24A) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru (24B)

4.8. Usporedba analiziranih vina s obzirom na tradicionalnu oznaku kvalitete

Tablica 27. Vrijednosti analiziranih kemijskih parametara s obzirom na tradicionalnu oznaku kvalitete

Parametar	Vrhunsko vino		Kvalitetno vino		p (t-test)
	Srednja vrijednost	Std. dev.	Srednja vrijednost	Std. dev.	
etanol [a]	13,67	0,86	12,74	0,76	**0,000**
SO_2 [b]	74,03	39,40	88,00	53,34	0,148
pH-vrijednost	3,47	0,19	3,47	0,14	0,938
DPPH• [c]	13,05	4,00	8,92	2,14	**0,000**
FRAP [d]	28,55	8,71	22,52	4,60	**0,000**
ukupni fenoli [e]	2127	706	1875	438	**0,023**
katehin [b]	37,14	12,09	39,62	13,48	0,334
kvercetin [b]	6,91	3,89	4,53	3,08	**0,001**
miricetin [b]	4,19	2,23	2,96	1,81	**0,002**
rutin [b]	1,16	0,75	1,00	0,60	0,243
kaempferol [b]	0,37	0,27	0,30	0,22	0,139
galna kiselina [b]	45,16	15,01	39,98	12,03	**0,049**
vanilinska kiselina [b]	8,37	2,96	8,08	3,30	0,645
ferulinska kiselina [b]	6,16	1,98	5,15	2,17	**0,017**
resveratrol [b]	1,91	0,83	1,87	0,82	0,805
tirosol [b]	45,92	10,04	40,50	9,46	**0,005**
hidroksitirosol [b]	3,08	0,68	2,64	0,74	**0,002**
putrescin [b]	14,89	8,25	14,60	11,47	0,890
histamin [b]	4,62	5,10	5,70	5,30	0,298
tiramin [b]	3,87	5,59	4,41	5,87	0,634
kadaverin [b]	1,85	1,07	2,47	1,81	**0,048**
triptofan etilester [f]	394,9	361,4	451,8	247,8	0,330
okratoksin A [f]	0,04	0,04	0,05	0,06	0,698
K [b]	1034	312	1070	268	0,522
Mg [b]	123,9	25,9	103,6	22,1	**0,000**
Ca [b]	89,86	56,45	154,2	178,1	**0,027**
Na [b]	16,55	8,74	19,97	13,58	0,151
Fe [f]	3389	2240	4661	2703	**0,013**
Mn [f]	2215	1240	2018	966	0,355
Al [f]	953,6	939,9	1059	863	0,552
Zn [f]	471,8	212,5	548,1	302,4	0,158
Cu [f]	142,9	142,4	214,0	183,1	**0,035**
Ni [f]	42,10	31,63	44,17	28,31	0,723
Pb [f]	22,70	28,27	31,33	35,37	0,186
Cr [f]	17,79	10,71	18,10	12,46	0,895
V [f]	4,49	4,40	5,58	7,09	0,377
Co [f]	2,71	2,26	3,38	3,40	0,270
Se [f]	1,45	0,86	1,70	1,41	0,321
As [f]	1,43	1,66	1,56	1,79	0,712
Cd [f]	0,58	0,73	0,42	0,40	0,130

[a] izražen u % (v/v)
[b] izražen u mg/L
[c] izražen kao mmol/L TEAC
[d] izražen kao mmol/L $FeSO_4$
[e] izražen kao mg GAE/L
[f] izražen u µg/L

5.0 RASPRAVA

U ovom istraživanju određena je koncentracija 24 nutraceutičke komponente (fenoli, makro- i mikroelementi te elementi u tragovima) i 9 antinutraceutičkih komponenata (toksični elementi, BA i OTA) u 110 uzoraka crnih vina. Također je svim uzorcima određen antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH• i FRAP testova. Usporedbom rezultata utvrđene su razlike među sortama, geografskim podrijetlom, godištem berbe i tradicionalnim oznakama kvalitete. Navedeni parametri obrađeni su dvjema multivarijantnim statističkim analizama, PCA i CDA, kako bi se utvrdila mogućnost klasifikacije hrvatskih crnih vina s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe.

U Tablici 10. prikazana je srednja vrijednost, raspon (minimum – maksimum), varijanca, standardna devijacija i koeficijent varijacije svih mjerenih parametara. U svrhu statističke obrade, za vrijednosti koje su bile ispod granice detekcije (GD), uzete su vrijednosti GD/2 (www.epa.gov). Volumni postotak etanola bio je u rasponu od 10,9% do 15,8%, s najvišim vrijednostima izmjerenim u vinima proizvedenim od sorte Plavac mali, ZOI Dingač (sr. vr. 14,7%). Sva su vina bila sumporena, a u šest uzoraka vina (5,5%) nađene su koncentracije više od maksimalno dozvoljenih 160 mg/L u crnim vinima (NN 137/2008). pH-vrijednosti bile su u rasponu od 3,0-3,9, a najmanje kisela bila su vina sa ZOI Dingač (sr. vr. 3,7). Sva vina su prošla djelomičnu ili potpunu malolaktičnu fermentaciju, srednja vrijednost jabučne kiseline iznosila je 215,5 mg/L, a srednja vrijednost mliječne kiseline iznosila je 1800 mg/L. Srednje vrijednosti antioksidacijskih kapaciteta određenih DPPH• i FRAP metodama te koncentracije ukupnih fenola iznosile su redom 10,5 mmol/L TEAC, 24,8 mmol/L $FeSO_4$ i 1969 mg GAE/L. Zastupljenost pojedinačnih fenola smanjivala se redom: tirosol ≈ galna kiselina > katehin > vanilinska kiselina > kvercetin > miricetin > hidroksitirosol ≈ ferulinska kiselina > resveratrol > rutin > kaempferol. Među biogenim aminima, najzastupljeniji je bio putrescin (sr. vr. 14,1 mg/L), zatim histamin (sr. vr. 5,3 mg/L), tiramin (sr. vr. 3,6 mg/L) i kadaverin (sr. vr. 2,2 mg/L), uz veliko rasipanje vrijednosti izmjerenih koncentracija, osobito za histamin i tiramin (standardne devijacije redom 5,2 i 4,4 mg/L). Melatonin nije pronađen u analiziranim uzorcima, međutim je triptofan etilester (TEE), donedavno poznat kao izomer melatonina, izmjeren u koncentracijama od 26 – 1568 µg/L. Koncentracije OTA bile su u rasponu od 0,003 – 0,163 µg/L. Među mjerenim makro- i mikroelementima te elementima u tragovima utvrđen je sljedeći odnos zastupljenosti: K > Ca ≈ Mg > Na za makroelemente te Fe > Mn > Al > Zn > Cu za mikroelemente i Ni > Pb > Cr > V > Co > Se ≈ As > Cd za elemente u tragovima. Koncentracije Ag i Mo u svim uzorcima bile su ispod granice detekcije te nisu prikazane u tablici.

Klimatološki podatci o prosječnoj godišnjoj temperaturi, prosječnom dnevnom trajanju osunčavanja i ukupnoj godišnjoj količini oborina za pet ispitivanih godina berbe (2011.-2015.), izraženih prema ZOI, prilagođeni su prema podatcima Državnog hidrometeorološkog zavoda (Tablica 11) (meteo.hr). Najviše prosječne godišnje temperature zabilježene su u dalmatinskom priobalju (ZOI Dingač, ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Srednja i južna Dalmacija). Najhladnije su bile ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija. Također je prosječno dnevno trajanje osunčavanja bilo najviše u ZOI Dingač, ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Srednja i južna Dalmacija, a najniže u ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija. S obzirom na količinu oborina, najveće količine zabilježene su na Pelješcu (ZOI Dingač), slijede ZOI Dalmatinska zagora i ZOI Srednja i južna Dalmacija. Najmanje oborina zabilježeno je u ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija. Podatci pokazuju da je 2014. godina bila najvlažnija u svim ispitivanim ZOI.

Detaljni podatci o vegetacijskom razdoblju (travanj – rujan), u kojem se odvija rast i sazrijevanje bobica grožđa te razvija kemijski sastav grožđa, prikazani su u Tablici 12. Najviše prosječne mjesečne temperature u vegetacijskom razdoblju izmjerene su u ZOI Srednja i južna Dalmacija, ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Dingač, dok su najniže izmjerene u ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija. U ZOI Hrvatska Istra i ZOI Dalmatinska zagora zabilježene su nešto niže prosječne temperature u travnju i svibnju, dok im se prosječna temperatura u ljetnim mjesecima izjednačuje s prosječnim temperaturama u dalmatinskom priobalju. ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija imale su najkraća prosječna dnevna trajanja osunčavanja u vegetacijskom razdoblju, dok su najduža imale ZOI Srednja i južna Dalmacija, ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Dingač. U ZOI Dingač zabilježene su najveće ukupne godišnje količine oborina. Međutim, najviše oborina u navedenoj ZOI palo je u travnju te zatim u rujnu. Ljetni mjeseci u priobalju općenito su bili vrlo sušni te su zabilježeni mjeseci bez oborina (ZOI Dalmatinska zagora: kolovoz 2012.; ZOI Dingač: kolovoz 2011. i 2012., srpanj 2013; ZOI Hrvatska Istra: kolovoz 2011; ZOI Sjeverna Dalmacija: kolovoz 2011.; ZOI Srednja i južna Dalmacija: kolovoz 2012). ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija primile su veću količinu oborina tijekom ljetnih mjeseci u odnosu na primorske ZOI. Općenito je 2014. godine zabilježen porast količine oborina: u kontinentalnim ZOI taj je porast bio izraženiji u proljetnim mjesecima (travanj – svibanj), a u primorskim ZOI u ljetnim mjesecima (lipanj – rujan).

5.1. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet određen je DPPH• i FRAP metodama, budući da se, za utvrđivanje autentičnosti, preporučuju najmanje dvije metode zbog kompleksne reaktivnosti fitokemikalija (Schlesier i dr., 2002). DPPH• metodom mjeri se sposobnost antioksidansa za uklanjanjem slobodnog radikala DPPH• (Brand-Williams i dr., 1995). FRAP metoda koristi antioksidanse kao reducense u kolorimetrijskoj metodi, koja se bazira na redoks reakciji, mjereći ukupnu redukcijsku snagu uzorka (Benzie i Strain, 1999).

Srednje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH• metodom bile su najviše u sorti Plavac mali (12,5 mmol/L TEAC), a potom u sortama Babić (10,9 mmol/L TEAC) i Teran (10,8 mmol/L TEAC), dok je najniža vrijednost izmjerena u sorti Pinot crni (7,8 mmol/L TEAC). Statistički značajna razlika u vrijednostima određenih DPPH• metodom utvrđena je između sorte Plavac mali i sorti Pinot crni, Frankovka i Merlot. Plavac mali je također pokazao najvišu srednju vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom (29,2 mmol/L $FeSO_4$), no nisu nađene statistički značajne razlike među sortama (Tablica 13). Antioksidacijski kapaciteti analiziranih hrvatskih vina u skladu su s onim prethodno određenim DPPH• metodom za sortu Plavac mali (Piljac-Žegarac i sur., 2007) te FRAP metodom za sortu Merlot (Katalinić i sur., 2004). Katalinić i sur. (2004) utvrdili su više antioksidacijske kapacitete određene FRAP metodom za sorte Babić i Cabernet Sauvignon, no niže za vino sa ZOI Dingač. Također su Šeruga i sur. (2011) utvrdili više rezultate određene DPPH• metodom za sorte Plavac mali, Pinot crni, Babić i Teran, dok su njihovi rezultati dobiveni navedenom metodom za sorte Merlot i Frankovka u skladu s onim izmjerenim u ovom istraživanju. Međutim, izvješća o antioksidacijskim kapacitetima određenim DPPH• i FRAP metodama u hrvatskim vinima su rijetka te su u većini slučajeva sorte zastupljene samo s po jednim uzorkom. U usporedbi s vinima iz drugih država, rezultati ovog istraživanja uglavnom se slažu s rezultatima utvrđenim DPPH• metodom u španjolskim vinima (Fernandez-Pachon i sur., 2004), DPPH• i FRAP metodama u turskim vinima (Büyüktuncel i sur., 2014) te FRAP metodom u talijanskim vinima (Garaguso i sur., 2015) s iznimkom vina sa ZOI Dingač u kojeg je nađen znatno viši antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom. Niže vrijednosti određene DPPH• i FRAP metodama nađene su u češkim vinima (Stratil i sur., 2008), a DPPH• metodom u belgijskim vinima (van Leeuw i sur., 2014). Sukladno rezultatima ovog istraživanja, van Leeuw i sur. (2014) su objavili da je antioksidacijski kapacitet određen DPPH• metodom bio najniži u vinima proizvedenim od sorte Pinot crni u odnosu na sva ispitivana crna vina..

Promatrano prema ZOI, najviši antioksidacijski kapaciteti određeni DPPH• metodom izmjereni su u vinima s južnim ZOI: vina sa ZOI Dingač (srednja vrijednost 16,4 mmol/L TEAC), vina sa ZOI Srednja i južna Dalmacija (srednja vrijednost 11,5 mmol/L TEAC), vina sa ZOI Dalmatinska zagora (srednja vrijednost 10,8 mmol/L TEAC) i vina sa ZOI Sjeverna Dalmacija (srednja vrijednost 10,5 mmol/L TEAC) (Tablica 14). Statistički značajne razlike utvrđene su između vina sa ZOI Dingač i vina sa sjevernijim ZOI (Hrvatska Istra, Slavonija i Hrvatsko Podunavlje). Vrijednosti određene DPPH• metodom postepeno su opadale s juga prema sjeveru, a na isti način opadale su i u sortama koje su karakteristične za navedene ZOI: Plavac mali koji nosi ZOI Dingač ili ZOI Srednja i južna Dalmacija, Babić koji nosi ZOI Sjeverna Dalmacija i Teran koji nosi ZOI Hrvatska Istra (Tablica 13). Vrijednosti određene FRAP metodom također su bile povišene u sorti Plavac mali, no bez statistički značajne razlike u odnosu na ostale sorte. Međutim, sorta Plavac mali obuhvatila je uzorke sa ZOI Dingač i ZOI Srednja i južna Dalmacija. Vina sa ZOI Dingač odlikovala su se statistički značajno većim antioksidacijskim kapacitetima određenim FRAP metodom (srednja vrijednost 40 mmol/L $FeSO_4$) u odnosu na vina sa svim ostalim ZOI. Također, uzorci sorte Plavac mali sa ZOI Dingač razlikovali su se značajno od uzoraka sorte Plavac mali sa ZOI Srednja i južna Dalmacija s obzirom na vrijednosti određene objema antioksidacijskim metodama (podatci nisu prikazani). Vina sa ZOI Dingač proizvedena su od sorte Plavac mali uzgojene na striktno definiranom specifičnom lokalitetu na južnoj strani centralnog dijela poluotoka Pelješac koji je karakteriziran blagom mediteranskom klimom, velikim brojem sunčanih sati godišnje, blizinom mora koja djeluje kao temperaturni regulator i ograničenjem prinosa grožđa na 0,85 kg/lozi (NN 96/2007). Navedeni rezultati ukazuju na značaj geografskog podrijetla i vitikulturne prakse na kvalitetu vina. U istraživanju objavljenom 2015. godine, Tauchen i sur. su ispitivali razlike u antioksidacijskim kapacitetima između gruzijskih vina i vina iz Centralne i Zapadne Europe te zaključili da antioksidacijski kapacitet crnih vina (određen s pomoću DPPH• metode) ovisi o sorti i o geografskom podrijetlu vina. Međutim, rezultati utvrđeni DPPH• metodom na hrvatskim vinima ukazuju na znatno veći utjecaj geografskog podrijetla u odnosu na utjecaj sorte s obzirom na činjenicu da se rezultati određeni DPPH• metodom među sortama koje potječu isključivo iz iste regije (Pinot crni i Frankovka iz regije Istočna kontinentalna Hrvatska; Plavac mali i Babić iz regije Dalmacija) statistički značajno ne razlikuju.

Promatrano s obzirom na godište berbe, u vinima iz godišta berbe 2011. utvrđena je statistički značajno najviša srednja vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH• metodom (14,0 mmol/L TEAC) u odnosu na srednju vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH• metodom u vinima iz godišta berbe 2014. (8,6 mmol/L TEAC) (Tablica 15).

2011. godina odlikovala se najduljim prosječnim trajanjem osunčavanja (osobito u priobalju) te najnižom ukupnom količinom oborina, dok je 2014. godina bila najoblačnija i najvlažnija među ispitivanim godištima (Tablice 11 i 12). Navedeni podatci ukazuju na pozitivan utjecaj klimatskih faktora, osobito duljeg trajanja osunčavanja i duljih sušnih razdoblja, na akumulaciju spojeva sposobnih ukloniti slobodne radikale u vinu. Među vrijednostima određenih FRAP metodom u vinima proizvedenim u različitim godištima berbe nije pronađena statistički značajna razlika (Tablica 15).

5.2. Ukupni fenoli i pojedinačni fenolni spojevi

Vina proizvedena od sorte Plavac mali odlikovala su se najvišom i statistički značajno različitom koncentracijom ukupnih fenola (srednja vrijednost 2396 mg GAE/L) u odnosu na vina proizvedena od svih ostalih sorti (Tablica 13). Izmjerene koncentracije ukupnih fenola slažu se s prethodno objavljenim vrijednostima u hrvatskim crnim vinima (Šeruga i sur., 2011). Također su slične vrijednosti ukupnih fenola izmjerene u španjolskim (Fernandez-Pachon i sur., 2004), grčkim (Arnous i sur., 2002), talijanskim (Galgano i sur., 2011), francuskim (Chira i sur., 2011) i makedonskim crnim vinima (Ivanova-Petropoulos i sur., 2015). Niže vrijednosti izmjerene su u srpskim crnim vinima (Atanacković i sur., 2012; Radovanović i sur., 2010), a viši rezultati utvrđeni su u turskim crnim vinima (Büyüktuncel i sur., 2014).

Promatrano prema ZOI, vina sa ZOI Dingač odlikovala su se najvišim vrijednostima ukupnih fenola (srednja vrijednost 2717 mg GAE/L) što se podudaralo i sa značajno višim antioksidacijskim kapacitetima određenim DPPH• i FRAP metodama u odnosu na vina sa svim ostalim ZOI (Tablica 14). Iako koncentracije ukupnih fenola ovise o različitim faktorima, među ostalim o lokaciji vinograda, vrsti tla i vinikulturnoj praksi (Büyüktuncel i sur., 2014), rezultati ovog istraživanja upućuju na najjači utjecaj klimatskih faktora. Naime, prijašnja istraživanja su pokazala da prosječne temperature imaju velik utjecaj na akumulaciju fenola u grožđu, rezultirajući povišenim vrijednostima ukupnih fenola (Chorti i sur., 2010; Costa i sur., 2015; Downey i sur., 2004) što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja u kojem izmjerene koncentracije ukupnih fenola opadaju postepeno od juga prema sjeveru na isti način na koji opadaju prosječne godišnje temperature (Tablica 11).

Koncentracije ukupnih fenola nisu se značajno razlikovale među vinima iz različitih godišta berbe. Međutim, metoda određivanja ukupnih fenola je nespecifična metoda u kojoj s Folin-Ciocalteuovim reagensom reagiraju različiti fenolni spojevi u uzorku, među kojima i antocijani te drugi fenoli koji nisu obuhvaćeni ovim istraživanjem, a čija sinteza se nejednako

stimulira/destimulira različitim klimatskim prilikama u godištu berbe (Kuhn i sur., 2014). Stoga je izostanak statistički značajne razlike među koncentracijama ukupnih fenola u vinima iz različitih godišta berbe vjerojatno posljedica velikog broja različitih, među ostalim i suprotstavljenih utjecaja klimatskih faktora na fenole prisutne u vinu.

Statistički značajne razlike među sortama nađene su u šest od jedanaest ispitivanih pojedinačnih fenolnih spojeva (55%). Najzastupljeniji pojedinačni fenoli, katehin, galna kiselina i tirosol, nisu se statistički značajno razlikovali među sortama (Tablica 13). Među flavonolima, kvercetin je bio najzastupljeniji u sorti Babić (srednja vrijednost 8,0 mg/L), miricetin u sorti Teran (srednja vrijednost 5,3 mg/L), rutin u sorti Merlot (srednja vrijednost 1,4 mg/L), a kaempferol u sorti Plavac mali (srednja vrijednost 0,4 mg/L). Statistički značajna razlika u koncentracijama kvercetina utvrđena je između sorte Babić te sorti Frankovka i Pinot crni. Miricetin je bio sortno najspecifičniji: sorta Teran se statistički značajno razlikovala od sorti Frankovka, Pinot crni i Plavac mali. Također se, s obzirom na koncentraciju miricetina, sorta Frankovka statistički značajno razlikovala od sorti Babić i Merlot te sorta Pinot crni od sorti Babić, Cabernet Sauvignon i Merlot. Statistički značajna razlika u koncentraciji rutina utvrđena je između sorti Babić i Merlot, dok za kaempferol nije nađena značajna razlika među sortama. Pinot crni odlikovao se najvišom srednjom koncentracijom vanilinske kiseline (12,3 mg/L) koja je bila značajno viša od koncentracija izmjerenih u sortama Cabernet Sauvignon, Plavac mali i Teran. Resveratrol je bio najzastupljeniji u sorti Teran (srednja vrijednost 2,7 mg/L), a statistički se značajno razlikovao od koncentracija resveratrola izmjerenih u sortama Babić, Cabernet Sauvignon, Plavac mali i Frankovka. Sorta Teran se također odlikovala najvišom koncentracijom hidroksitirosola (srednja vrijednost 3,5 mg/L) koja se statistički značajno razlikovala od koncentracija izmjerenih u sortama Cabernet Sauvignon, Frankovka i Pinot crni (Tablica 13).

U prethodnim istraživanjima hrvatskih vina, veće koncentracije galne kiseline i katehina izmjerene su u sortama Babić, Frankovka, Merlot, Pinot crni, Plavac mali i Teran (Šeruga i sur., 2011), dok su manje koncentracije navedenih spojeva izmjerene u sorti Plavac mali (Vrček i sur., 2011) te u sortama Cabernet Sauvignon, Frankovka, Merlot, Pinot crni i Plavac mali (Rastija i sur., 2009). Među internacionalnim vinima, slični rezultati galne kiseline i katehina utvrđeni su u talijanskim, grčkim i turskim crnim vinima (Garaguso i sur., 2015; Kalithraka i sur., 2006; Sen i Tokatli, 2014). Prema istraživanju Porgali i Büyüktuncel (2012), visoka koncentracija galne kiseline u crnim vinima posljedica je hidrolize estera flavonoid galata koje nema u bijelim vinima zbog izostanka kontakta mošta s kožicom grožđa. Zastupljenost flavonola utvrđena u ovom istraživanju (kvercetin > miricetin > rutin > kaempferol) te njihove

pojedinačne koncentracije u skladu su s rezultatima prethodno objavljenim za miricetin, kvercetin i kaempferol u vinima proizvedenim od sorti Plavac mali, Cabernet Sauvignon i Merlot (Rastija i sur., 2009) te za kvercetin u vinima sorti Plavac mali, Frankovka, Pinot crni i Merlot (Šeruga i sur., 2011). Niži rezultati objavljeni su za kvercetin u vinima sorti Babić i Teran (Šeruga i sur., 2011) te za miricetin, kvercetin i kaempferol u vinima sorte Plavac mali (Vrček i sur., 2011). U usporedbi s vinima proizvedenim u drugim državama, rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima objavljenim za kvercetin u srpskim (Radovanović i sur., 2010) i turskim vinima (Anli i sur., 2006); miricetin i kvercetin u talijanskim vinima (Garaguso i sur., 2015); kvercetin, miricetin i kaempferol u turskim vinima (Sen i Tokatli, 2014) te rutin u talijanskim vinima (Girelli i sur., 2015). Niže vrijednosti objavljene su za kvercetin u talijanskim vinima (Girelli i sur., 2015) te za miricetin, kvercetin i kaempferol u bugarskim vinima (Tsavova-Savova i Ribarova, 2002), a više za rutin u talijanskim i grčkim vinima (Garaguso i sur., 2015; Kalithraka i sur., 2006). Raspon koncentracija resveratrola sukladan je onom prethodno objavljenom za hrvatska vina (Rastija i sur., 2009) kao i za španjolska (Abril i sur., 2005) te rumunjska vina (Vlase i sur., 2009). Veći raspon koncentracija resveratrola pronađen je u talijanskim vinima (Buiarelli i sur., 2006). Prema dostupnim podatcima, ovo je prvi izvještaj o koncentracijama tirosola i hidroksitirosola u hrvatskim vinima, a izmjerene koncentracije u skladu su s prethodno objavljenim rezultatima za španjolska vina (Piñeiro i sur. 2011).

Statistički značajne razlike među vinima sa različitim ZOI nađene su kod sedam od jedanaest ispitivanih pojedinačnih fenola (64%) (Tablica 14). Koncentracije galne kiseline, ferulinske kiseline, hidroksitirosola i tirosola nisu se značajno razlikovale među vinima s različitom ZOI (Tablica 14). Srednje vrijednosti koncentracija katehina bile su najniže u vinima sa ZOI Hrvatska Istra (32,6 mg/L), a najviše, i statistički značajno različite, u vinima sa ZOI Sjeverna Dalmacija (48,1 mg/L) te ZOI Srednja i južna Dalmacija (42,6 mg/L). Srednje vrijednosti koncentracije katehina postepeno su padale prema sjeveru priobalnog područja, a zatim ponovno rasle u vinima s kontinentalnim ZOI. Ponovni rast koncentracija katehina u kontinentalnoj regiji može se objasniti činjenicom da je katehin karakteristično visok u sorti Pinot crni (Goldberg i sur., 2000; Nikfardjam i sur., 2006; 1998; van Leeuw i sur., 2014), a u ovom istraživanju su vina proizvedena od navedene sorte isključivo s kontinentalnom ZOI. Ovakav obrazac sugerira na utjecaj obiju faktora, sorte i geografskog podrijetla, na koncentraciju katehina u crnom vinu. Više koncentracije flavonola miricetina, kvercetina i kaempferola izmjerene su u vinima s kontinentalnim u odnosu na vina s primorskim ZOI te su pronađene statistički značajne razlike između ZOI Slavonija i ZOI Hrv. Podunavlje te: ZOI

Hrvatska Istra za miricetin; ZOI Dalmatinska zagora, ZOI Dingač i ZOI Hrvatska Istra za kvercetin i ZOI Dingač za kaempferol. Najviše koncentracije rutina izmjerene su u vinima sa ZOI Hrvatska Istra (srednja vrijednost 1,3 mg/L), dok su vina sa ZOI Sjeverna Dalmacija te ZOI Srednja i južna Dalmacija sadržavala najmanje rutina (srednja vrijednost 0,8 mg/L). Flavonoli su općenito bili zastupljeniji u vinima s primorskim ZOI te, posljedično, u sortama koje se uzgajaju u primorju tj. u područjima s dužim prosječnim trajanjem osunčavanja (Tablica 12). Isti obrazac ustanovili su Rastija i sur. (2011) i u skladu je s činjenicom da su flavonoli odgovorni za zaštitu od UV zračenja u viših biljaka (Pollastri i Tattini, 2011). Srednje vrijednosti koncentracije vanilinske kiseline bile su najniže u najjužnijim ZOI, ZOI Dingač (5,1 mg/L) i ZOI Sjeverna i južna Dalmacija (6,7 mg/L), a najviša i značajno različita u ZOI Slavonija (srednja vrijednost 11,2 mg/L). Također su se vina proizvedena od kontinentalnih sorti Frankovka i Pinot crni odlikovala najvišim koncentracijama vanilinske kiseline, dok su vina proizvedena od dalmatinske sorte Plavac mali sadržavala najmanje vanilinske kiseline. Navedene razlike mogu se objasniti činjenicom da je vanilinska kiselina aromatična komponenta čije se prisustvo u vinu dovodi u vezu sa starenjem vina u hrastovim bačvama (Herjavec i sur., 2007) te da je vinikulturna praksa starenja vina u hrastovim bačvama rasprostranjenija u Slavoniji, domovini slavonskog hrasta. Koncentracija resveratrola bila je najniža u vinima sa ZOI Dingač (srednja vrijednost 1,5 mg/L), potom u vinima sa ZOI Srednja i južna Dalmacija (srednja vrijednost 1,6 mg/L), a najviša, i statistički značajno različita, u vinima sa ZOI Hrvatska Istra (srednja vrijednost 2,2 mg/L). Suprotno rezultatima ovog istraživanja, Rastija i sur. (2009) našli su niže koncentracije resveratrola u istarskim vinima u odnosu na vina iz Slavonije i Podunavlja te osobito na vina iz Srednje i južne Dalmacije. Međutim, u navedenom istraživanju svaka je sorta bila zastupljena s po jednim uzorkom što umanjuje snagu izvedenih zaključaka. Biljke sintetiziraju resveratrol kao odgovor na infekcije patogenom, osobito na gljivične infekcije, i izlaganje UV-svjetlu (Fernandez-Mar i sur., 2012; Hasan i Bae, 2017). Općenito su koncentracije resveratrola rasle od juga prema sjeveru gdje hladnija i vlažnija klima pogoduje razvoju gljivičnih infekcija. Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da je infekcija patogenom ključna za sintezu resveratrola budući da su najviše koncentracije resveratrola izmjerene u ZOI Istra te za nju karakterističnoj sorti Teran što potkrepljuju i podatci o osjetljivosti pojedinih sorti: sorta Plavac mali (s najnižom izmjerenom srednjom vrijednosti resveratrola) vrlo je otporna za razliku od sorte Teran koja je prilično osjetljiva na infekciju *Botrytis sp.* (Ivandija, 2008).

Razlike među koncentracijama pojedinačnih fenola s obzirom na godište berbe nađene su kod četiri od jedanaest ispitivanih spojeva (36%) (Tablica 15). Srednje vrijednosti

koncentracija katehina, kaempferola, galne, vanilinske i ferulinske kiseline, resveratrola i hidroksitirosola nisu se značajno razlikovale među vinima iz različitih godišta berbe (Tablica 15). Vina proizvedena od grožđa obranog 2011. godine odlikovala su se najvećim koncentracijama miricetina, kvercetina, tirosola i rutina, dok su najmanje koncentracije navedenih spojeva nađene u vinima proizvedenim od grožđa iz berbe 2014. S obzirom na godište berbe, nije nađena korelacija između godišta te koncentracija ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih spojeva (podatci nisu prikazani) što upućuje na zaključak da su navedeni spojevi stabilni u vinu u ispitivanom vremenskom rasponu. Yoo i sur. (2011) našli su u vinima proizvedenim od sorte Cabernet Sauvignon uglavnom pozitivne korelacije katehina, kvercetina i resveratrola s godištem berbe, međutim bez statističke značajnosti. Bellomarino i sur. (2010) izmjerili su više vrijednosti katehina i niže vrijednosti vanilinske kiseline u mlađim vinima, iako su velike varijacije među godištima vjerojatno bile posljedica promjenjivih klimatskih prilika u različitim godinama berbe. Isti autori navode da koncentracije resveratrola i miricetina nisu korelirale s godištem berbe i vjerojatno bolje odražavaju klimatske prilike u godini berbe. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju, gdje su najniže srednje vrijednosti koncentracija miricetina, kvercetina, rutina, kaempferola, ferulinske kiseline, hidroksitirosola i tirosola izmjerene u vinima iz berbe 2014., koja je ujedno godina s najmanjim prosječnim dnevnim trajanjem osunčavanja i najvećom količinom ukupnih oborina (Tablica 11), također upućuju na zaključak da navedeni parametri odražavaju klimatske prilike u godini berbe. Pojedinačni fenolni spojevi najosjetljiviji na klimatske prilike bili su miricetin, kvercetin, rutin i tirosol, budući su nađene statistički značajne razlike među srednjim vrijednostima njihovih koncentracija u vinima iz berbe 2011. (najviše srednje vrijednosti) i 2014. (najniže srednje vrijednosti). Godina 2011. bila je najsunčanija i najsuša među ispitivanim godištima, no, što se tiče prosječnih temperatura, značajne razlike primjećene su samo među vrijednostima prosječnih mjesečnih temperatura u rujnu 2011. i rujnu 2014. (Tablica 12). Ovi rezultati upućuju na zaključak da je nakupljanje navedenih fenola najviše ovisno o stresnim faktorima poput suše i dugotrajnog izlaganja Sunčevoj svjetlosti (UV zračenju), ali i da pozitivan utjecaj mogu imati visoke temperature u mjesecu prije berbe.

5.3. Melatonin

Melatonin nije detektiran u analiziranim vinima što je sukladno rezultatima Gomez i sur., (2012) i Kocadağlı i sur. (2014). Drugi su autori, međutim, pronašli melatonin u vinu te izvijestili o širokom rasponu izmjerenih koncentracija: od 0,16 µg/L (Stege i sur., 2010) do čak 420 µg/L (Rodriguez-Naranjo i sur., 2011). Ovako velike varijacije u koncentracijama melatonina djelomično su posljedica razlika u korištenim sojevima kvasaca te u tehnologiji proizvodnje vina tj. prvenstveno uvjetima u kojima kvasci rastu. Poznato je, naime, da je melatonin prisutan već u grožđu, no nema ga u moštu (Gomez i sur., 2012). Pretpostavlja se da uvjeti na početku fermentacije nisu prikladni za ekstrakciju melatonina iz grožđa, te da melatonin u vinu nastaje tijekom alkoholne fermentacije. Eksperimenti izvedeni u sintetičkom mediju (idealnim uvjetima) dokazali su da su kvasci odgovorni za stvaranje melatonina i da je sposobnost njegove sinteze različita kod različitih sojeva (Vigentini i sur., 2015). U istim eksperimentalnim uvjetima, Fernandez-Cruz i sur. (2017) su uočili značajni porast koncentracije melatonina pri kraju eksponencijalne faze rasta što se može objasniti pretpostavkom da melatonin stanicama kvasca pomaže preživjeti u mediju s rastućom koncentracijom etanola (Meng i sur., 2017). Zanimljivo je, međutim, da su, u pokusu Vigentini i sur. (2015), kvasci proizveli melatonin samo u sintetskom mediju, ali ne i u enološkim uvjetima.

Drugi, i mnogo značajniji razlog spomenutim varijacijama u koncentraciji melatonina mogao bi biti u analitičkim metodama (Tan i sur., 2014) različito osjetljivim na promjene koje mogu nastati zbog fotosenzitivnosti i interakcija melatonina s reaktivnim kisikovim vrstama (Reinholds i sur., 2016). Također su novijim metodama, poput tekućinske kromatografije s tandem masenim spektrometrom (LC MS MS), identificirani, uz melatonin, i tzv. izomeri melatonina (Kocadağlı i sur., 2014). Vrlo je izvjesno da su starije i manje specifične metode, poput imunoenzimske metode (engl. ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay) i HPLC s fluorescentnim detektorom, precijenile sadržaj melatonina zamijenjujući ga s izomerima melatonina. Istraživanje melatonina u vinu relativno je novo područje s malim brojem objavljenih članaka te konačni zaključak o njegovom prisustvu i porijeklu, kao i prisustvu njegovih izomera, još nije donesen.

Sukladno rezultatima Gomez i sur., (2012) i Kocadağlı i sur. (2014), u vinima ispitivanim u ovom istraživanju detektiran je izomer melatonina, koji je nedavno identificiran kao triptofan etilester (TEE) (Gardana i sur., 2014). Kvantifikacija ovog spoja provedena je uz pomoć kalibracijske krivulje za melatonin, uporabom fragmenta 216 čija je zastupljenost

mnogo veća kod TEE u odnosu na melatonin. Izmjerene koncentracije kretale su se u rasponu od 26-1568 µg/L što je znatno više nego u prethodnim istraživanjima (Rodriguez-Naranjo, 2011; Kocadağlı i sur. 2014). Međutim, različiti su autori kvantificirali TEE koristeći različite fragmente (Rodriguez-Naranjo: fragment 216; Kocadağlı: zbroj fragmenata 216 i 174). Budući da melatonin i TEE imaju znatno različite tranzicijske omjere navedenih fragmenata, navedeno otežava međusobnu usporedbu spomenutih rezultata.

Usporedbom izmjerenih koncentracija s obzirom na sortu, najviše koncentracije TEE su nađene u vinima proizvedenim od sorte Plavac mali (srednja vrijednost 550 µg/L) (Tablica 13). Također je, usporedbom s obzirom na ZOI, ustanovljen postupan pad koncentracija TEE od juga prema sjeveru (Tablica 14). Prema Vigentini i sur. (2015), TEE nije detektiran na grožđu, u moštu je nađen u vrlo niskim koncentracijama ili je kod nekih sorti odsutan, ali se nakuplja u vinu tijekom alkoholne fermentacije. Drugi su autori također našli TEE u vinu u širokom rasponu koncentracija (Meng i sur., 2017) što ukazuje na činjenicu da mu konačna koncentracija ovisi o soju kvasca i uvjetima fermentacije. Istraživanja pokazuju da i druge vrste kvasaca, osim *Saccharomyces cerevisiae,* proizvode TEE (Fernandez-Cruz i sur., 2017; Vigentini i sur., 2015) što, s obzirom na njihovu značajnu prisutnost na grožđu prije fermentacije (Mas i sur., 2014), može imati velik utjecaj na konačnu koncentraciju TEE u vinu. Razlike u koncentracijama TEE, primijećene u ovom istraživanju, mogu se stoga pripisati različitoj populaciji mikroorganizama prisutnoj na sirovini te različitim uvjetima vinifikacije.

Značaj TEE kao biološki aktivnog spoja još je uvijek nejasan. Njegova moguća nutritivna uloga, prema Iriti i Vigentini (2015), jest da predstavlja rezervoar triptofana sposobnog za prolazak kroz gastrointestinalni sustav te, moguće, krvno-moždanu barijeru. Prema istim autorima, TEE se može, nakon deesterifikacije, brzo metabolizirati u melatonin i serotonin djelovanjem enteroendokrinih stanica, no za potvrdu ove hipoteze potrebna su dodatna istraživanja.

5.4. Makroelementi, mikroelementi i elementi u tragovima

Makroelementi, mikroelementi i elementi u tragovima u vinu u najvećoj mjeri potječu iz prirodnih, geogenih izvora, no ne mogu se zanemariti ni antropološki izvori, poput uporabe fungicida, različitih aditiva i metalnog pribora tijekom proizvodnje. Elementi koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem odabrani su na temelju svojih potencijalnih blagotvornih, kao i štetnih učinaka na ljudsko zdravlje. Umjerena konzumacija vina doprinosi zadovoljenju dnevnih potreba organizma za mnogim esencijalnim elementima, poput Cu, Zn, Ca, K, Co, Cr,

Mg, Mn, Mo, Ni, Se i Fe. Međutim, vino može sadržavati i toksične metale: Al, As, Cd i Pb (Pohl, 2007). U ovom su istraživanju izmjerene koncentracije makroelemenata (Ca, K, Mg, Na), mikroelemenata (Al, Cu, Zn, Mn, Fe) te elemenata u tragovima (As, Cd, Co, Cr, Ni, Pb, Se, V).

Najviše koncentracije K izmjerene su u vinima proizvedenim od sorte Plavac mali (srednja vrijednost 1124 mg/L), najviše Ca je nađeno u vinima proizvedenim od sorte Teran (srednja vrijednost 179,5 mg/L), a najviše Na je nađeno u vinima proizvedenim od sorte Pinot crni (srednja vrijednost 23,1 mg/L). Statistički značajno različite koncentracije makroelemenata s obzirom na sortu utvrđene su jedino za Mg budući su njegove koncentracije u sorti Frankovka (srednja vrijednost 148,4 mg/L) bile značajno više odnosu na sve ostale ispitivane sorte (Tablica 16). Najviše koncentracije Fe i Al utvrđene su u vinima proizvedenim od sorte Teran (srednje vrijednosti redom 6007 µg/L i 1383 µg/L), dok je najviše Zn izmjereno u vinima sorte Cabernet Sauvignon (srednja vrijednost 580 µg/L), a najviše Cu izmjereno je u vinima sorte Merlot (srednja vrijednost 249 µg/L). Među mikroelementima, samo je Mn bio sortno specifičan. Koncentracija Mn bila je najviša u sorti Frankovka (srednja vrijednost 3440 µg/L) te značajno različita od koncentracije Mn u sortama Babić, Cabernet Sauvignon, Merlot i Plavac mali. Vina proizvedena od sorte Plavac mali sadržavala su najmanje Mn (srednja vrijednost 1265 µg/L). Među elementima u tragovima utvrđene su sljedeće najviše srednje vrijednosti: za Ni 66,6 µg/L (Frankovka); za Pb: 37,8 µg/L (Babić); za Cr: 22,1 µg/L (Plavac mali); za V: 8,5 µg/L (Teran); za Co: 6,3 µg/L (Teran); za Se: 2,3 µg/L (Plavac mali); za As: 2,1 µg/L (Plavac mali); za Cd: 1,0 µg/L (Pinot crni). Sortno specifični bili su Ni, Co i Se. Sorta Frankovka sadržavala je značajno više Ni od sorte Babić (srednja vrijednost 18,6 µg/L). Koncentracija Co se statistički značajno razlikovala u vinima proizvedenih od sorte Teran u odnosu na vina proizvedena od sorti Babić, Frankovka, Pinot crni i Plavac mali. Sorta Plavac mali sadržavala je najviše Se te se značajno razlikovala od sorti Frankovka i Merlot. Koncentracije Pb, Cr, V, As i Cd nisu se značajno razlikovale među sortama (Tablica 16).

Koncentracije K bile su najspecifičnije s obzirom na geografsko podrijetlo vina. Najveće i statistički značajno više koncentracije K izmjerene su u vinima sa ZOI Dingač (srednja vrijednost 1396 mg/L) i ZOI Slavonija (srednja vrijednost 1305 mg/L) u odnosu na vina sa svim ostalim ZOI, izuzev ZOI Sjeverna Dalmacija. Najniža koncentracija K izmjerena je u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora (srednja vrijednost 711 mg/L). Statistički značajne razlike u koncentraciji K nađene su još i između vina sa ZOI Dalmatinska zagora te vina sa ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Srednja i južna Dalmacija, kao i između vina sa ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Sjeverna Dalmacija (Tablica 17). Koncentracija Mg bila je najviša u vinima

sa ZOI Slavonija (srednja vrijednost 134 mg/L) te statistički značajno različita u odnosu na vina sa ZOI Dalmatinska zagora, ZOI Hrvatska Istra, ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Srednja i južna Dalmacija, kao i između vina sa ZOI Dingač te vina sa ZOI Hrvatska Istra i ZOI Sjeverna Dalmacija. Najviša koncentracija Ca izmjerena je u vinima sa ZOI Srednja i južna Dalmacija (srednja vrijednost 179 mg/L), ali bez statistički značajne razlike u odnosu na vina sa svim ostalim ZOI. Koncentracija Na bila je značajno viša u vinima sa ZOI Hrvatsko Podunavlje (srednja vrijednost 33,7 mg/L) u odnosu na vina sa svim ostalim ZOI. Među mikroelementima, najviše koncentracije Fe izmjerene su u vinima sa ZOI Sjeverna Dalmacija (srednja vrijednost 5629 µg/L), dok je najviše Mn nađeno u vinima sa ZOI Slavonija (srednja vrijednost 3564 µg/L), najviše Al izmjereno je u vinima sa ZOI Srednja i južna Dalmacija (srednja vrijednost 1278 µg/L), Zn je bilo najviše u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora (srednja vrijednost 762 µg/L), a Cu je bilo najviše u vinima sa ZOI Sjeverna Dalmacija (srednja vrijednost 237 µg/L). Mn i Zn jedini su bili specifični s obzirom na geografsko podrijetlo vina. Koncentracija Mn bila je statistički značajno viša u vinima sa ZOI Slavonija u odnosu na vina sa svim ostalim ZOI. Također su se, s obzirom na koncentraciju Mn, vina sa ZOI Srednja i južna Dalmacija značajno razlikovala u odnosu na vina sa ZOI Hrvatska Istra i Hrvatsko Podunavlje kao i vina sa ZOI Hrvatska Istra u odnosu na vina sa ZOI Dalmatinska zagora. Statistički značajna razlika uočena je i između koncentracije Zn u vinima sa ZOI Hrvatsko Podunavlje i vinima sa ZOI Dalmatinska zagora (Tablica 17). Među elementima u tragovima, utvrđene su sljedeće najviše srednje vrijednosti: za Ni 79,2 µg/L (ZOI Slavonija); za Pb: 65,3 µg/L (ZOI Sjeverna Dalmacija); za Cr: 21,9 µg/L (ZOI Srednja i južna Dalmacija); za V: 6,4 µg/L (ZOI Slavonija); za Co: 4,7 µg/L (ZOI Hrvatska Istra); za Se: 2,2 µg/L (ZOI Srednja i južna Dalmacija); za As: 2,0 µg/L (ZOI Dingač i ZOI Srednja i južna Dalmacija); za Cd: 1,2 µg/L (ZOI Dalmatinska zagora). Koncentracije Pb i Cd značajno su se razlikovale između vina s različitim ZOI. Pb je bilo statistički značajno više u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora i ZOI Sjeverna Dalmacija u odnosu na vina sa ZOI Hrvatsko Podunavlje. Također je Cd bio statistički značajno viši u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora u odnosu na vina sa ZOI Hrvatska Istra i ZOI Srednja i južna Dalmacija. Koncentracije Ni, Cr, V, Co, Se i As nisu se značajno razlikovale među vinima sa različitom ZOI (Tablica 17).

Međusobni odnos zastupljenosti navedenih elemenata u ispitivanim hrvatskim vinima u skladu je s prethodno objavljenim (Fiket i sur., 2011). Također, rezultati dobiveni u ovom istraživanju općenito se slažu s prijašnjim nalazima u hrvatskim vinima (Fiket i sur., 2011; Leder i sur., 2015; Vrček i sur., 2011). U usporedbi s vinima iz drugih država, rezultati ovog istraživanja uglavnom se podudaraju s prethodno objavljenim rezultatima za rumunjska (Geana

i sur., 2013), turska (Alkıs i sur., 2014), španjolska (Garcia-Rodriguez i sur., 2011) i češka vina (Kment i sur., 2005). Geana i sur. (2013) objavili su više vrijednosti koncentracija Cr, Cu i V u rumunjskim vinima; Alkıs i sur. (2014) objavili su više vrijednosti koncentracija Cr i niže vrijednosti koncentracija Mn, Fe i Pb u turskim vinima, Garcia-Rodriguez i sur. (2011) objavili su više vrijednosti koncentracija As i V u španjolskim vinima, dok su Kment i sur. (2005) objavili više vrijednosti koncentracija As, Cu, Cr, Pb i V u češkim vinima. Uočena varijabilnost može se objasniti različitom geokemijom tla i različitim stupnjem antropogenog utjecaja bilo tijekom uzgoja vinove loze, bilo tijekom proizvodnje vina.

Usporedbom srednjih vrijednosti izmjerenih koncentracija ispitivanih elemenata među sortama, statistički značajne razlike nađene su u 29% elemenata, dok su usporedbe s obzirom na ZOI otkrile statistički značajne razlike u 41% elemenata. Relativno mali broj statistički značajnih razlika, uočenih u ovom istraživanju, posljedica je velike varijabilnosti rezultata pojedinih elemenata koja je uočena i ranije (Geana i sur., 2013). Zbog kiselosti vina, koncentracije elemenata u vinu variraju znatno više u odnosu na druga alkoholna pića (Ibanez i sur., 2008). Također, visoka varijabilnost je očekivana s obzirom na različit doprinos položaja vinograda, proizvodne sorte te viti- i vinikulturne prakse konačnom elementnom profilu vina. Sukladno istraživanju Sen i Tokatli (2014), problem u izvođenju zaključaka o sortnim i regionalnim elementnim profilima vina u ovom istraživanju su vina proizvedena od sorti koje se uzgajaju samo u jednoj regiji zbog čega nije moguće zaključiti da li uočene razlike potječu od sorte ili od geografskog podrijetla uzoraka vina. Koncentracije Mn tako se statistički značajno razlikuju između uzoraka vina proizvedenih od sorti Frankovka i Plavac mali, od kojih uzorci vina Frankovka potječu isključivo iz regije Istočna kontinentalna Hrvatska, dok uzorci vina Plavac mali potječu isključivo iz regije Dalmacija. Slična razlika uočena je u koncentracijama Ni između vina proizvedenih od sorti Babić (Dalmacija) i Frankovka (Istočna kontinentalna Hrvatska). Također se koncentracije Co značajno razlikuju između vina proizvedenih od sorti Babić, Plavac mali (Dalmacija), Pinot crni i Frankovka (Istočna kontinentalna Hrvatska) s jedne strane i vina proizvedenih od sorte Teran (Istra) s druge strane. Istovremeno se vina proizvedena od sorti Merlot i Cabernet Sauvignon, koja nisu regionalno specifična, ne razlikuju značajno od drugih vina s obzirom na koncentraciju Co. Ovi podatci potvrđuju da geografsko podrijetlo ima mnogo veći utjecaj od sorte na elementni profil vina.

Kako bi se procijenio geogeni doprinos elementnom sastavu ispitivanih vina, rezultati ovog istraživanja uspoređeni su s koncentracijama odgovarajućih elemenata u tlu objavljenih u Geokemijskom atlasu Republike Hrvatska (Halamić, 2009). Unatoč različitoj geokemiji različitih tala te, posljedično, različitoj apsorpciji elemenata iz tla, uočena je visoka podudarnost

između regionalne zastupljenosti pojedinih elemenata u tlu i u vinu proizvedenom od grožđa iz iste regije. Među makroelementima, koncentracije K, Mg i Na značajno su se razlikovale između vina s različitim ZOI. Koncentracije K bile su najviše u vinima sa ZOI Slavonija i ZOI Dingač, a statistički su se značajno razlikovale u odnosu na koncentracije K u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora, ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Srednja i južna Dalmacija. Ovaj nalaz podudara se s koncentracijama K u tlu budući su najviše koncentracije u Hrvatskoj izmjerene u Slavoniji, dok su u priobalju najviše koncentracije K nađene na poluotoku Pelješac i otocima srednje Dalmacije. Visoke koncentracije K u tlu Slavonije jednim se dijelom pripisuju intenzivnoj uporabi umjetnih gnojiva (Halamić, 2009), dok su na Pelješcu prirodnog podrijetla (Specifikacija proizvoda: Dingač). Podudarnost s koncentracijama u tlu uočena je i za Mg: najviše i statistički značajno različite koncentracije Mg izmjerene su u vinima sa ZOI Slavonija i ZOI Dingač, u odnosu na vina sa ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Hrvatska Istra koja su sadržavala najniže koncentracije Mg. Sjeverna Dalmacija, osobito područje Ravnih kotara, te Istra područja su s najmanjom koncentracijom Mg u tlu. S druge strane, Pelješac i Slavonija odlikuju se znatno višim koncentracijama Mg. Tla Hrvatskog Podunavlja također su bogata Mg što se poklapa i s nešto nižim, ali još uvijek visokim koncentracijama Mg u vinima sa ZOI Hrvatsko Podunavlje. Vina sa ZOI Hrvatsko Podunavlje sadržavala su značajno više Na u odnosu na sva ostala ispitivana vina unatoč činjenici da se, zbog utjecaja morskog aerosola, više Na očekuje u vinima proizvedenim od grožđa koje potječe iz vinograda smještenih blizu mora. I ovi se rezultati podudaraju s obrascem Na nađenim u tlu, gdje su najniže koncentracije Na izmjerene u dalmatinskim tlima, a najviše u tlima istočne Hrvatske te sjeveroistočnog dijela središnje Hrvatske. Među mikroelementima, regionalno specifični bili su Mn i Zn. Koncentracije Mn bile su najviše u vinima sa ZOI Slavonija, a najniže u vinima sa ZOI Srednja i južna Dalmacija što je u suprotnosti s koncentracijama Mn u tlu. Naime, koncentracije Mn u tlu rastu od sjevera prema jugu te su najviše koncentracije izmjerene u srednjoj Dalmaciji. Prema Halamiću (2009), medijan koncentracija Mn izmjerenih u dalmatinskim tlima čak je dvostruko veći od europskog prosjeka. Imajući u vidu dobru podudarnost ostalih navedenih elemenata u tlu i u vinu, ovakav rezultat upućuje na zaključak da je Mn u vinu pretežno antropogenog podrijetla te da vjerojatno potječe od uporabe pesticida, fungicida i gnojiva tijekom uzgoja loze (Pohl, 2007) kao i da osobine tla poput pH-vrijednosti i stupnja aeracije (Kabata-Pendias, 2004) znatno više utječu na sposobnost vinove loze za apsorpcijom Mn u odnosu na druge elemente. Koncentracije Zn bile su najviše u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora, a najniže i statistički značajno različite u vinima sa ZOI Hrvatsko Podunavlje što se slaže s nalazima Zn u tlu. Naime, tla Dalmatinske zagore najbogatija su cinkom, dok su tla

središnje i istočne Hrvatske najsiromašnija Zn, uz iznimku aluvijalnih ravnica rijeke Drave u koje je Zn dospio antropogenim utjecajem (Halamić, 2009). Među elementima u tragovima, koncentracije Pb i Cd značajno su se razlikovale s obzirom na geografsko podrijetlo. Zanimljivo je da se koncentracije Pb u vinu mogu povezati s koncentracijama Pb u tlu: najviše su vrijednosti izmjerene u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora, a najniže u ZOI Hrvatsko Podunavlje što odgovara obrascu utvrđenom u hrvatskim tlima. Ovi rezultati upućuju na zaključak da najveći dio Pb u vinu potječe iz tla. Međutim se povećano prisustvo Pb u tlu najvećim dijelom pripisuje antropogenom djelovanju, tj. atmosferskom onečišćenju (cestovni promet) (Halamić, 2009). Također je Cd bilo najviše u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora čija su tla vrlo opterećena Cd, a značajno manje u vinima sa ZOI Hrvatska Istra, što odgovara obrascu utvrđenom u tlu. Povećane koncentracije Cd u poljoprivrednom tlu dovode se u vezu s atmosferskim onečišćenjem (cestovni promet), uporabom pesticida, fungicida, fosfatnih gnojiva te korištenjem otpadnog mulja kao gnojiva (Halamić, 2009; Tariba, 2011). Kment i sur. (2005) našli su statistički značajnu ovisnost između sadržaja Mg u vinu i tlu vinograda, dok su Fabani i sur. (2010) utvrdili dobro podudaranje koncentracija Ca, Cr i Fe u vinu i tlu. Unatoč činjenici da su opažanja u ovom istraživanju temeljena na usporedbi sastava vina sa sastavom tla šireg zemljopisnog područja, umjesto mnogo preciznije usporedbe sa sastavom tla u odgovarajućem vinogradu, uočeno je dobro podudaranje sadržaja K, Mg, Na, Zn, Pb i Cd u vinu i tlu.

Koncentracije elemenata uspoređene su s maksimalnim dopuštenim koncentracijama (MDK) koje su propisale Europska Unija i Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (Tablica 4). Usporedba je pokazala da su koncentracije svih elemenata bile ispod graničnih vrijednosti u svim ispitivanim uzorcima.

5.5. Biogeni amini

Najviše koncentracije putrescina izmjerene su u vinima proizvedenim od sorti Babić i Cabernet Sauvignon (srednja vrijednost 6,5 mg/L), dok je najviše histamina nađeno u vinima proizvedenim od sorte Babić (srednja vrijednost 3,8 mg/L). Tiramina je bilo najviše u vinima sorte Frankovka (2,4 mg/L), a kadaverina u vinima sorte Plavac mali (srednja vrijednost 1,0 mg/L). Histamin je bio jedini BA kod kojeg je nađena statistički značajna razlika s obzirom na sortu: sorta Babić sadržavala je značajno više histamina u odnosu na sorte Merlot i Pinot crni (Tablica 18).

Promatrano s obzirom na ZOI, putrescina je bilo najviše u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora (srednja vrijednost 9,3 mg/L) i bio je statistički značajno različit u odnosu na vina sa

ZOI Hrvatska Istra i ZOI Slavonija. Koncentracija histamina bila je najviša u vinima sa ZOI Dingač (srednja vrijednost 4,2 mg/L) i ZOI Sjeverna Dalmacija (srednja vrijednost 4,3 mg/L) i značajno se razlikovala od koncentracije histamina u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora i ZOI Hrvatsko Podunavlje. Koncentracije tiramina bile su najviše u vinima sa ZOI Slavonija (2,6 mg/L), a kadaverina u vinima sa ZOI Slavonija i ZOI Srednja i južna Dalmacija (srednja vrijednost 1,0 mg/L) te se nisu značajno razlikovale među vinima s različitim ZOI (Tablica 19).

Najviše koncentracije putrescina i histamina izmjerena su u vinima iz 2014. godišta (srednje vrijednosti redom 6,2 mg/L i 3,4 mg/L). Tiramina je bilo najviše u vinima iz godišta berbe 2012. i 2014., dok je kadaverina bilo najviše u vinima iz godišta berbe 2015. Nisu nađene statistički značajne razlike u koncentracijama navedenih spojeva među vinima proizvedenim od grožđa iz različitih godišta berbe (Tablica 20).

Općenito je putrescin bio najzastupljeniji BA, a slijedili su redom histamin, tiramin i kadaverin, što se podudara s prethodno objavljenim rezultatima (Konakovsky i sur., 2011). Također, raspon rezultata pojedinačnih BA u skladu je s nedavno objavljenim rezultatima talijanskih vina (Restuccia i sur., 2017). Međutim, Mitar i sur. (2018) su izvijestili o znatno nižim koncentracijama BA izmjerenih u hrvatskim vinima. Ove razlike mogu se povezati s različitim podrijetlom ispitivanih vina (Mitar i sur. su istraživanjem obuhvatili i vina iz Središnje bregovite Hrvatske), no moguće je, također, da su im uzrok metodološke razlike u mjerenju koncentracija BA (Mitar i sur. nisu koristili interni standard).

Anzin-Azpilicueta i sur. (2008) su u svojem preglednom članku naveli da je iz prethodnih izvješća evidentan velik raspon izmjerenih koncentracija BA: od koncentracija koje su bile ispod granice detekcije do koncentracija mnogo viših od onih izmjerenih u ovom istraživanju: 55 mg/L za putrescin, 25 mg/L za histamin, 28 mg/L za tiramin i 14 mg/L za kadaverin. Konakovsky i sur. (2011) su izvijestili čak i o višim koncentracijama putrescina (122 mg/L) i histamina (27 mg/L) izmjerenih u austrijskim kvalitetnim crnim vinima. Ovakva varijabilnost je očekivana, budući da koncentracije BA ovise o mnogobrojnim faktorima, poput kvalitete sirovine (koja ovisi o klimi i karakteristikama tla vinogradarske regije), aminogenoj sposobnosti prisutnih bakterijskih sojeva, uvjetima uzgoja vinove loze (uključujući uporabu dušičnih gnojiva), tehnikama proizvodnje vina i uvjetima skladištenja (Anzin-Azpilicueta i sur., 2008). Sukladno navedenome, Konakovsky i sur. (2011) nisu pronašli statistički značajne razlike između ispitivanih vina proizvedenih od sedam crnih sorti (ukupno 100 uzoraka) zbog velike varijabilnosti unutar grupa (sorti). U ovom istraživanju je također uočena velika varijabilnost unutar grupa (sorta, geografsko podrijetlo, godište) te su značajne razlike pronađene samo među koncentracijama histamina i to promatranim s obzirom na sortu te s

obzirom na ZOI. Sorta Pinot crni sadržavala je značajno manje histamina u odnosu na dalmatinske sorte Babić i Plavac mali. U skladu s navedenim, histamina je bilo najviše u ispitivanim vinima sa ZOI Sjeverna Dalmacija (dominantno vina od sorte Babić) i ZOI Dingač (isključivo vina od sorte Plavac mali), a najmanje u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora (dominantno vina od sorte Merlot) i ZOI Hrvatsko Podunavlje (vina od raznih sorti). Vina s najvišim srednjim vrijednostima koncentracije histamina bila su najmanje kisela vina: ZOI Dingač (4,2 mg/L, pH=3,74); ZOI Srednja i južna Dalmacija (2,4 mg/L, pH=3,53); ZOI Sjeverna Dalmacija (4,3 mg/L, pH=3,50), dok su vina s najmanje histamina bila najkiselija: ZOI Dalmatinska zagora (0,9 mg/L, 3,22); ZOI Hrvatsko Podunavlje (1,1 mg/L, pH=3,38). Srednje pH-vrijednosti rasle su od sjevera prema jugu što je sukladno činjenici da grožđe koje dozrijeva u toplijim klimatskim uvjetima sadrži manje kiselina od grožđa koje dozrijeva u hladnijim klimatskim uvjetima. Više pH-vrijednosti (iznad 3,5) povezane su s većom sposobnosti preživljavanja različitih mikroorganizama, među kojima su i oni s aminogenom sposobnošću, dok su niže pH-vrijednosti (ispod 3,3) povezane s otežanom malolaktičnom fermentacijom, veoma važnom za nastanak BA (Preti i sur., 2016). Koncentracije jabučne i mliječne kiseline izmjerene u ovom istraživanju upućuju na zaključak da je u svim vinima provedena potpuna ili djelomična malolaktična fermentacija: jabučna kiselina izmjerena je u rasponu koncentracija od ispod granice detekcije do 1927 mg/L, dok je mliječna kiselina izmjerena u rasponu koncentracija od 519 do 3982 mg/L (Tablica 10). Više pH-vrijednosti u vinima koja su prošla malolaktičnu fermentaciju, a na koje upućuju pozitivna korelacija mliječne kiseline i negativna korelacija jabučne kiseline s pH-vrijednosti (Tablica 24), očekivane su budući da je razgradnja jabučne i sinteza mliječne kiseline praćena blagim porastom pH-vrijednosti. Smatra se da se istovremenom sintezom BA omogućuje preživljavanje mikroorganizama u kiselom okolišu ili da sinteza BA predstavlja alternativni izvor metaboličke energije (Martuscelli i sur., 2013). Pozitivna korelacija između pH-vrijednosti i koncentracija različitih BA uočena je u prethodnim istraživanjima (Landete i sur., 2005; Preti i sur., 2016; Restuccia i sur., 2017). U skladu s rezultatima ovog istraživanja, Landete i sur. (2005) izmjerili su više koncentracije histamina u vinima s pH-vrijednošću iznad 3,5. U istom istraživanju utvrđeno je da je utjecaj pH-vrijednosti na tiramin bio manje očit, a uopće nije uočen za ostale BA. Statistički značajne, iako slabe pozitivne korelacije pH-vrijednosti i histamina ($r = 0,304$, $p < 0,05$) te pH-vrijednosti i tiramina ($r = 300$, $p < 0,05$) utvrđene u ovom istraživanju, potvrđuju navedene nalaze. S druge strane, Preti i sur. (2016) utvrdili su pozitivnu korelaciju između pH-vrijednosti te putrescina, kadaverina i tiramina, ali

ne i histamina. Ovi se rezultati mogu objasniti visokom varijabilnošću rezultata uslijed velikog broja ostalih faktora koji utječu na nastanak BA.

Promatrano s obzirom na godište berbe, vina iz berbe 2014. sadržavala su najviše histamina (najveća srednja vrijednost, najviši maksimum), dok je za druge BA sličan trend bio manje uočljiv. Također se 2014. godina ističe po najvećem udjelu vina kontaminiranih s BA (Tablica 21). Del Prete i sur. (2009) su, proučavajući utjecaj grožđa na konačan sastav i koncentraciju BA u vinu, zaključili da vina proizvedena od grožđa iz klimatskih ˝loših˝ godina sadržavaju značajno više BA. Njihovi su eksperimentalni uvjeti uključivali rad sa sterilnim moštom i odabranim kulturama kvasaca i bakterija kako bi se tijekom proizvodnje vina isključio doprinos nekontroliranih kontaminirajućih mikroorganizama. U realnim uvjetima je izgledno da prirodno veći sadržaj BA u grožđu ubranom u ˝lošoj˝ godini dodatno raste zbog utjecaja kontaminirajućih mikroorganizama prisutnih na oštećenim bobicama.

Unatoč potencijalno toksičnim učincima na osjetljive pojedince, Europska Unija još uvijek nije definirala MDK ni za histamin, niti za drugi farmakološki aktivan BA, tiramin. Švicarska je jedina privremeno uvela MDK za histamin (10 mg/L), ali ju je 2008. povukla tijekom usklađivanja sa zakonskom regulativom EU (Konakovsky i sur., 2011). Primjenom navedene granične vrijednosti, sva ispitivana vina smatrala bi se zdravstveno ispravnim. Međutim, konzumacijom ovih vina nisu isključeni mogući toksični učinci histamina na histamin-netolerantne osobe imajući u vidu moguće sinergijske učinke različitih BA prisutnih u vinu kao i činjenicu da se količina histamina unesena vinom može dodatno uvećati istovremenom konzumacijom drugih vrsta hrane koje sadrži histamin. Ovi rezultati dodatno naglašavaju potrebu za rutinskom detekcijom i kvantifikacijom BA u vinu kako bi se postigla bolja kontrola procesa vinifikacije, a stvaranje BA svelo na minimum.

5.6. Okratoksin A

Koncentracije OTA kretale su se u rasponu od vrijednosti ispod granice detekcije do 0,163 µg/L (Tablica 10), uz srednju vrijednost od 0,040 µg/L i medijan od 0,026 µg/L. Iako je raspon veći u usporedbi s prijašnjim istraživanjima OTA u hrvatskim vinima (Domijan i Peraica, 2005.; Flajs i sur., 2009), srednja vrijednost i medijan su neznatno veći unatoč velikom rasponu ispitivanih godišta (2002. u spomenutim prethodnim istraživanjima - 2015. u ovom istraživanju). Ovaj nalaz je u suprotnosti s izvješćem De Jesusa i sur. (2018) koji su utvrdili porast OTA koncentracija u vinima proizvedenim u Sjedinjenim američkim državama (SAD) za gotovo dva reda veličine (100x) u razmaku od dva desetljeća. Najznačajnije OTA-

proizvodne vrste su *Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus carbonarius* (Amezqueta i sur., 2012), među kojima je najveći proizvođač, pripadnik tzv. crnih plijesni, *Aspergillus carbonarius* (Belli i sur., 2006). Južna Europa je pogodnija za rast okratoksigenih vrsta iz roda *Aspergillus* u odnosu na vrste iz roda *Penicillium,* budući da su crne plijesni vrlo otporne na izlaganje suncu te na suhu i vruću klimu (Serra i sur., 2003) što im daje kompetitivnu prednost u odnosu na druge plijesni. Međutim, klimatske će promjene, osobito rast prosječnih temperatura, vjerojatno dovestih do značajnih promjena u proizvodnji OTA kroz dulje vremensko razdoblje. Različiti proizvođači OTA razlikuju se po optimalnim temperaturama za rast i za proizvodnju OTA. Veće koncentracije OTA izmjerene su u grožđu na 30°C (gornja granica optimalnog rasta za *Aspergillus carbonarius* te donja granica optimalnog rasta za *Aspergillus niger*), nego u grožđu na 20°C (Paterson, 2018; Belli, 2004). Izvjesno je da će s promjenom klimatskih uvjeta *Aspergillus niger* postati zastupljeniji na grožđu u odnosu na *Aspergillus carbonarius* jer je otporniji na visoke temperature i sušu (Garcia-Cela, 2014), ali rjeđe proizvodi OTA (Guzev, 2006; Serra, 2005). Stoga će rast temperatura u umjerenim klimatskim zonama vjerojatno dovesti do porasta, a rast temperatura do ekstremnih vrijednosti poput onih na jugu Europe će vjerojatno dovesti do pada koncentracije OTA u vinima, uz istovremeni porast koncentracije drugih mikotoksina, npr. aflatoksina, kojeg proizvode termorezistentnije plijesni poput *Aspergillus flavus i Aspergillus parasiticus* (Paterson, 2018). Mali porast OTA u hrvatskim vinima u ovom u odnosu na prethodna istraživanja podupire navedene pretpostavke, budući da veći broj uzoraka vina potječe iz regije s vrućom klimom gdje dodatni rast temperatura vjerojatno neće dovesti do značajnijeg daljnjeg porasta koncentracije OTA (Žurga i sur., 2019).

Uspoređena s prethodnim međunarodnim izvješćima o koncentracijama OTA, hrvatska vina se više podudaraju s vinima iz srednjoeuropskih država (Belajova i sur., 2007; Mikulikova i sur., 2012; Varga i sur., 2005) iako većina uzoraka potječe iz regije s tipičnom Csa klimom (toplo - sušna ljeta - vruća ljeta) Koppen - Geigerove klimatske klasifikacije (Kottek i sur., 2006) koja odgovara klimatskim karakteristikama južnoeuropskih i mediteranskih zemalja poput Grčke, Turske, Italije, Španjolske i Portugala s većim izmjerenim koncentracijama OTA (Sarigiannis i sur., 2014; Altiokka i sur., 2009; Spadaro i sur., 2010; Burdaspal i sur., 2007; Pena i sur. 2010).

Promatrano prema ZOI, uočen je postepen porast izmjerenih koncentracija OTA od sjevera prema jugu, što je osobito izraženo u dalmatinskom priobalju: najviše pojedinačne koncentracije izmjerene su u vinima proizvedenim od sorte Plavac mali koja potječu iz najjužnijih područja ispitivanih ZOI (0,163 µg/L u vinu s otoka Visa i 0,141 µg/L u vinu s otoka

Hvara). Također, najviše je nekontaminiranih vina bilo među vinima sa sjevernim ZOI (ZOI Slavonija i ZOI Hrvatsko Podunavlje), dok su sva dalmatinska vina bila kontaminirana (ZOI Sjeverna Dalmacija, ZOI Dalmatinska zagora, ZOI Srednja i južna Dalmacija, ZOI Dingač) (Tablica 21). Ovi rezultati snažno podupiru prethodne nalaze, prema preglednom članku Blesa i sur. (2006), prema kojima koncentracije OTA postupno rastu od sjevera prema jugu tj. vina iz južnih predjela Europe češće su kontaminirana i sadrže veće koncentracije OTA. S obzirom na činjenicu da su najviše koncentracije OTA izmjerene u sortama koje se uzgajaju isključivo na jugu zemlje, izgledno je da su primijećene razlike u koncentraciji OTA posljedica različitog geografskog podrijetla ispitivanih vina. Mariño-Repizo i sur. (2017) su također zaključili da su razlike u koncentraciji OTA u crnim vinima, zapažene u njihovom istraživanju, bile ovisne o geografskom podrijetlu, ali ne i o proizvodnoj sorti. Oni su zapažene razlike pripisali vremenskim uvjetima tijekom sazrijevanja grožđa i upotrebljenim vitikulturnim tehnikama. Među ispitivanim ZOI, ZOI Dingač se isticala po najvišim izmjerenim koncentracijama OTA (srednja vrijednost 0,095 µg/L) (Tablica 19). Lokalitet Dingač odlikovao se vrućim i sušnim ljetnim mjesecima, uz porast količine oborina u rujnu te, osobito, značajno veću količinu oborina tijekom pupanja u odnosu na ostatak Dalmacije (Tablica 12). Vruća, ali istovremeno nešto vlažnija klima, osobito u mjesecu prije berbe, osobito je pogodna za *Aspergillus carbonarius* (Chiotta i sur., 2013; Mariño-Repizo i sur., 2016), što može objasniti visoku koncentraciju OTA u vinima sa ZOI Dingač. Zanimljivo je da je srednja vrijednost OTA u vinima sa ZOI Dalmatinska zagora (0,020 µg/L), unatoč blizini i klimatološkoj sličnosti s ostalim dalmatinskim ZOI, sličnija srednjim vrijednostima OTA u kontinentalnim vinima. Iako su srednje vrijednosti temperatura i ukupna količina oborina slične u cijeloj Dalmaciji (Tablica 11), u Dalmatinskoj zagori mnogo je manji utjecaj temperaturne regulacije mora te postoje oštre razlike između dnevnih i noćnih temperatura. Prema Clouvel et al. (2008), minimalna temperatura zraka od 15 °C tijekom razdoblja kontaminacije grožđa mogla bi biti donja granica ispod koje je rast plijesni ograničen što bi moglo biti uzrok navedenim rezultatima. S druge strane, znatno više koncentracije OTA u vinima s priobalnim dalmatinskim ZOI mogu se objasniti i višom vlažnosti zraka koja potječe iz mora (Var i Kabak, 2007).

U ovom je istraživanju, međutim, uočena sortno specifična učestalost kontaminacije s OTA. Naime, usporedbom učestalosti kontaminacije s OTA u vinima proizvedenih od sorti Merlot i Cabernet Sauvignon, nađeno je 78% kontaminiranih vina sorte Merlot u odnosu na 100% kontaminiranih vina sorte Cabernet Sauvignon (Tablica 21). Navedene sorte se uzgajaju i u kontinentalnoj i u primorskoj Hrvatskoj čime se mogu isključiti regionalno uvjetovane razlike. Navedeni podatci sugeriraju na važan utjecaj vitikulturne prakse (Gil-Serna i sur.,

2018): grožđe sorte Merlot sazrijeva i bere se ranije od grožđa sorte Cabernet Sauvignon, što smanjuje rizik dostizanja uvjeta za optimalan rast okratoksigenih plijesni pri višim temperaturama. Slična razlika u učestalosti kontaminiranih vina uočena je među vinima iz regije Istočna kontinentalna Hrvatska: nađeno je 78% kontaminiranih vina proizvedenih od sorte Frankovka u odnosu na 100% kontaminiranih vina proizvedenih od sorte Pinot crni. Ova se razlika može objasniti činjenicom da se plod sorte Pinot crni odlikuje mnogo tanjom kožicom, u odnosu na sortu Frankovka, zbog čega je vrlo osjetljiv na napad patogenih funga, poput *Botrytis cinerea*, koje oštećuju plod i stvaraju uvjete pogodne za kolonizaciju okratoksigenih plijesni (Gil-Serna i sur., 2018).

Promatrano s obzirom na godište berbe, najviše OTA izmjereno je u vinima iz berbe 2014. (najviša srednja vrijednost, najviši maksimum) (Tablica 20) što je u skladu s klimatološkim podatcima u razdoblju 2011. – 2015. (Tablice 11. i 12.). Navedena je godina bila najvlažnija od svih ispitivanih godina (+32% na godišnjoj razini), uz temperaturu koja je bila neznatno niža ili nije odstupala od prosjeka. Porast ukupne količine oborina bio je naročito izražen u razdoblju od srpnja - rujna što je vjerojatno pogodovalo razvoju okratoksigenih plijesni.

Praćenje koncentracije OTA u vinu od iznimno je velike važnosti zbog visoke učestalosti njegove prisutnosti u vinu kao i zbog njegovog mutagenog i toksičnog potencijala. U svim ispitivanim vinima, koncentracija OTA bila je više nego deseterostuko niža od najviše dopuštene koncentracije u EU (Uredba 1881/2006), čime se ova vina smatraju sigurnim za konzumaciju.

5.7. Učestalost kontaminacije prirodnim kontaminantima

U Tablici 21 prikazan je udio nekontaminiranih vina s obzirom na sortu, ZOI, godište berbe i tradicionalnu oznaku kvalitete. Prikazani su rezultati za BA (kadaverin, putrescin, histamin i tiramin) i OTA. Kadaverin i putrescin detektrani su u svim uzorcima vina (100% kontaminiranih uzoraka). Međutim, pronađeno je ukupno 88,2% uzoraka kontaminiranih histaminom, 82,7% uzoraka kontaminiranih tiraminom i 92,8% kontaminiranih okratoksinom A. Izraženo prema sortama, Merlot je bio sorta s najmanjim udjelom, a Cabernet Savignon s najvećim udjelom kontaminiranih uzoraka. Izraženo prema ZOI, Dalmatinska zagora bila je ZOI s najmanje uzoraka kontaminiranih biogenim aminima, no uzevši u obzir i OTA, ZOI Hrvatsko Podunavlje bila je ZOI s najmanje uzoraka nekontaminiranih potencijalno toksičnim prirodnim kontaminantima histaminom, tiraminom i OTA. Vina sa ZOI Sjeverna Dalmacija bila su sva kontaminirana analiziranim kontaminantima. Promatrano prema godištu berbe, najviše nekontaminiranih uzoraka potjecalo je iz 2012. godine, a najviše kontaminiranih iz 2014. godine. Među vrhunskim vinima nađen je manji udio kontaminiranih vina (Tablica 21).

5.8. Međuzavisnost analiziranih nutraceutičkih i antinutraceutičkih komponenata

Među analiziranim nutraceutičkim i antinutraceutičkim komponentama provedena je korelacijska analiza kako bi se ustanovilo postoji li međusobni odnos između ispitivanih parametara te je izračunat Pearsonov koeficijent 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.

Među analiziranim parametrima u ovom istraživanju, najviše statistički značajno koreliraju rezultati određeni DPPH• i FRAP metodama: vrijednosti utvrđene DPPH• metodom umjereno pozitivno koreliraju s vrijednostima utvrđenim FRAP metodom ($r = 0,625$, $p < 0,05$) i koncentracijama ukupnih fenola ($r = 0,561$, $p < 0,05$), dok vrijednosti utvrđene FRAP metodom jako pozitivno koreliraju s koncentracijama ukupnih fenola ($r = 0,720$, $p < 0,05$). Najjača korelacija (pozitivna) utvrđena je između koncentracija kvercetina i miricetina ($r = 0,766$, $p < 0,05$). Resveratrol najslabije korelira s ostalim ispitivanim parametrima: slaba pozitivna korelacija nađena je samo između koncentracija resveratrola i miricetina ($r = 0,337$, $p < 0,05$) (Tablica 22). Statistički značajne umjerene do jake pozitivne korelacije između ukupnih fenola i antioksidacijskih testova sukladne su rezultatima prethodnih istraživanja

(Porgali i Büyüktuncel, 2012; Psarra i sur., 2002; Šeruga i sur., 2011; Staško i sur., 2008). Među pojedinačnim fenolima u ovom istraživanju nađena je slaba pozitivna korelacija između ukupnih fenola i galne kiseline ($r = 0,375$, $p < 0,05$) te vrlo slaba između ukupnih fenola i tirosola te katehina. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH• metodom su slabo korelirale s galnom kiselinom ($r = 0,418$, $p < 0,05$) i kvercetinom ($r = 0,355$, $p < 0,05$), a vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom slabo su korelirale s galnom kiselinom ($r = 0,485$, $p < 0,05$) i tirosolom ($r = 0,329$, $p < 0,05$). Ostale su korelacije bile vrlo slabe ili ih nije bilo (Tablica 22). Di Majo i sur. (2008) su pronašli najjače korelacije između galne kiseline, miricetina te katehina s antioksidacijskim kapacitetom; Porgali i Büyüktuncel (2012) su utvrdili jake do slabe pozitivne korelacije antioksidacijskog kapaciteta i sljedećih spojeva (u opadajućem nizu): kaempferola, miricetina, kvercetina, resveratrola, katehina, rutina i galne kiseline; Granato i sur. (2011) su uočili značajne korelacije između antioksidacijskog kapaciteta i kvercetina, miricetina, galne kiseline, katehina, ferulinske kiseline i kaempferola, uz najznačajniji doprinos galne kiseline, kvercetina i miricetina. U ovom istraživanju utvrđena je slaba ili vrlo slaba, ali statistički značajna pozitivna korelacija antioksidacijske aktivnosti i flavonola: kvercetina, miricetina i kaempferola. Isto nije primijećeno i za rutin, glikozilirani kvercetin, što se slaže s nalazom Granata i sur. (2011) prema kojima glikozilacija značajno smanjuje nukleofilnu snagu, tj. antioksidacijski kapacitet glikoziliranih flavonoida u odnosu na odgovarajuće aglikone. Također, nedostatak korelacije između resveratrola i testova antioksidacijskog kapaciteta potvrđuje prethodne nalaze (Atanacković i sur., 2012; Granato i sur., 2011.; van Leeuw i sur., 2014) prema kojima antioksidacijski kapacitet uglavnom ovisi o drugim fenolnim spojevima. Općenito, visoke korelacije nađene između ukupnih fenola i antioksidacijskih testova nisu potvrđene i između antioksidacijskih testova i pojedinačnih fenola što se može objasniti činjenicom da se ukupni fenoli određuju nespecifičnim testom kojim se identificira svaki potencijalno oksidirajući spoj u vinu (Porgali i Büyüktuncel, 2012), dok su DPPH• i FRAP također nespecifične metode kojima se obuhvaćaju i antioksidacijski kapaciteti drugih spojeva, primjerice tanina i antocijana, koji pojedinačno nisu uključeni u ovo istraživanje. Odnos između pojedinačnih fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta još uvijek nije do kraja razjašnjen (Preti i sur., 2016), unatoč brojnim objavljenim istraživanjima, te i dalje ostaje otvoreno pitanje s obzirom da na antioksidacijski kapacitet, uz već navedene, utječu i brojni ostali faktori poput koncentracije prisutnih slobodnih radikala u vinu, reakcijskog vremena testa, faktora razrijeđenja uzorka, energije disocijacije između kisika i fenolnog vodika, pH-vrijednosti, redukcijskog potencijala, topljivosti i stereokemijske strukture (Cao i sur., 2007). Međusobno

suprotstavljeni rezultati mogu se objasniti činjenicom da različiti fenolni spojevi pokazuju različit antioksidacijski kapacitet ovisno o broju hidroksilnih i metoksi grupa i njihovom položaju na benzenskom prstenu (Finotti i Di Majo, 2003). Također, prethodna istraživanja pokazuju da antioksidacijski kapacitet raste sa stupnjem polimerizacije fenola (Rice-Evans i sur., 1995) kao i da vjerojatno ovisi o stupnju sinergije ili antagonizma između različitih fenolnih spojeva (Di Majo i sur., 2008). Pozitivne korelacije između miricetina, kvercetina i kaempferola vjerojatno su posljedica istog biokemijskog puta te, posljedično, sličnog mehanizma aktivacije njihove sinteze (Mativi i sur., 2006).

Među makroelementima, mikroelementima i elementima u tragovima ispitivanim u vinu nije nađena niti jedna jaka pozitivna ili negativna korelacija (Tablica 23) što je vjerojatno posljedica suprotstavljenih utjecaja što ga na konačni sastav vina ima geografsko podrijetlo vina (različita geokemija tla), klima, položaj vinograda, karakteristike loze (starost trsa, sorta), vitikulturna praksa (uporaba gnojiva, pesticida, herbicida, fungicida, navodnjavanja, zrelost grožđa kod berbe), tehnike vinifikacije (postupci maceracije, filtracije, uporaba aditiva), posuđe i pribor koji se upotrebljava pri proizvodnji, skladištenju i transportu vina (Đorđević i sur., 2018.; Hopfer i sur., 2015; Pohl, 2008; Tariba, 2011). Makroelementi međusobno nisu korelirali. Umjerene pozitivne korelacije nađene su između Al i Fe ($r = 0,501$, $p < 0,05$); Al i Co ($r = 0,532$, $p < 0,05$); Fe i Co ($r = 0,526$, $p < 0,05$) te Co i As ($r = 0,515$, $p < 0,05$) (Tablica 23). Umjerene korelacije između Al, Co i Fe vjerojatno potječu od materijala koji se upotrebljavaju u vinarijama, uključujući nehrđajući čelik, mesing, drvo i plastiku koji mogu doprinijeti povećanju koncentracije Al, Cr, Cd, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti, V i Zn (Hopfer i sur., 2015). Najveća, no ipak umjerena pozitivna korelacija utvrđena je između Al i As ($r = 0,641$, $p < 0,05$). Jaku korelaciju između Al i As u hrvatskim vinima pronašli su i Fiket i sur. (2011) koji smatraju da je ta ovisnost prouzročena njihovim zajedničkim mineralnim podrijetlom u tlu. Ovaj zaključak se slaže sa elementnim sastavom tla (Halamić i sur., 2009) po kojem Al i As dijele sličnu zastupljenost u hrvatskim tlima: oba su elementa znatno zastupljenija u tlima primorske Hrvatske u odnosu na tla kontinentalne Hrvatske. Sličan obrazac zastupljenosti u tlu utvrđen je i za Fe i Co. Ipak, As može potjecati i od uporabe fungicida, a s obzirom na utvrđene korelacije Co-As, Al-Co i Al-As, ne može se isključiti antropogeni uzrok navedenih povezanosti. Cd, Na, Mg i K nisu korelirali ili su vrlo slabo korelirali s ostalim ispitivanim elementima (Tablica 23).

Korelacijski matriks mikrobioloških kontaminanata (BA i OTA) te parametara s poznatim utjecajem na mikrobiološku aktivnost: volumnog udjela etanola, koncentracije SO_2 i pH-vrijednosti prikazan je u Tablici 24. Najveća, ali još uvijek umjerena pozitivna korelacija

nađena je između histamina i tiramina ($r = 0,616$, $p < 0,05$). Slaba pozitivna korelacija uočena je između putrescina i histamina te između putrescina i tiramina. Slične korelacije primjećene su u prijašnjim istraživanjima: histamin - tiramin (Soufleros i sur., 1998); putrescin - tiramin (Herbert i sur., 2005); sva tri BA (Romero i sur., 2002; Konakovsky i sur., 2011). Navedene korelacije sugeriraju zajedničko podrijetlo navedenih BA koji vjerojatno nastaju tijekom malolaktične fermentacije djelovanjem iste vrste ili istog skupa bakterija. Slaba, no statistički značajna pozitivna korelacija između pH-vrijednosti i histamina, pH-vrijednosti i tiramina te pH-vrijednosti i OTA (Tablica 24) podupire zaključak prema kojima je manje kiselo vino podložnije kontaminaciji.

5.9. Analiza glavnih komponenata

Analizom glavnih komponenti (PCA) istraženo je prirodno grupiranje uzoraka ovisno o njihovom antioksidacijskom kapacitetu, koncentraciji ukupnih fenola, pojedinačnih fenola, makroelemenata, mikroelemenata te elemenata u tragovima u odnosu na sortu, ZOI i godište berbe. Analiza glavnih komponenata provedena je na dva odvojena skupa varijabli: prvi koji uključuje rezultate određivanja antioksidacijskog kapaciteta dvjema metodama, koncentracije ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih spojeva, te drugi koji uključuje koncentracije makroelemenata, mikroelemenata te elemenata u tragovima.

Diskriminacija vina prema fenolnom sastavu u literaturi je korištena za procjenu geografskog podrijetla, godišta berbe i sorte vina (Geana i sur., 2014; Jaitz i sur., 2010; Makris i sur., 2006; Rastija i sur., 2009; Sen i Tokatli, 2014). Fenolni sastav sorte odražava njezin genski potencijal da proizvede/aktivira enzime uključene u proces biosinteze (Makris i sur., 2006). Enzimska aktivnost ovisi o faktorima okoliša kao što su izloženost suncu, nedostatak vode, stupanj zrelosti grožđa, veličina bobice i vegetativna snaga biljke (Sen i Tokatli, 2014). Stoga se fenolni sastav vina može razlikovati u vina proizvedenih od iste sorte, ali različitog geografskog podrijetla, i obrnuto, vina proizvedena u istoj regiji, ali od različitih sorti, mogu također imati različit fenolni profil. Osim navedenih faktora okoliša, na fenolni sastav vina mogu utjecati i tehnološki postupci, starenje vina (npr. u hrastovim bačvama) (Makris i sur., 2006), kao i napad patogena (Fanzone i sur., 2012).

Nakon autoskaliranja, prve dvije glavne komponente objasnile su 43,43% ukupne varijance, od čega je prva glavna komponenta (engl. PC1 – principal component 1) obuhvatila 24,98%, a druga glavna komponenta (engl. PC2 – principal component 2) obuhvatila je 18,45%

ukupne varijance. Varijable s najvećim doprinosom PC1 bile su: DPPH• (-0,73), FRAP (-0,71) i kvercetin (-0,71), dok su galna kiselina (0,68) i katehin (0,65) bile varijable s najvećim doprinosom PC2. Slike 7 i 8 prikazuju rezultate PCA s prvim skupom varijabli: projekcija varijabli na faktorsku ravninu PC1xPC2 (7A); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na sorte) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (7B); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na ZOI) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (8A); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na godište berbe) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (8B).

Vina proizvedena od sorte Plavac mali grupirala su se većim dijelom na gornjoj polovici faktorske ravnine s obzirom na povišeni sadržaj katehina, galne i vanilinske kiseline. Na donjoj polovici faktorske ravnine nalazila su se većim dijelom vina proizvedena od sorte Merlot karakterizirana nižim koncentracijama navedenih spojeva. Vina proizvedena od sorte Frankovka isticala su se nižim antioksidacijskim kapacitetom te nižim koncentracijama ukupnih fenola i flavonola, ali višim koncentracijama vanilinske kiseline. Međutim, nije uočeno izraženije razdvajanje uzoraka s obzirom na sortu (Slika 7B). Rastija i sur. (2009) također su pronašli više koncentracije galne kiseline i katehina u vinima proizvedenim od sorte Plavac mali u odnosu na druga hrvatska crna vina. Šeruga i sur. (2011) su izmjerili najviše koncentracije galne kiseline i katehina u hrvatskim vinima proizvedenim od sorte Plavac mali, a najniže u vinima proizvedenim od sorti Merlot i Frankovka. Visoka koncentracija katehina u vinima sorte Plavac mali vjerojatno je odlika sorte budući je katehin dominantan flavan-3-ol u sjemenki i kožici ploda Plavca malog (Ćurko i sur., 2014). Metode vinifikacije također mogu imati utjecaj na visoke koncentracije katehina u vinima proizvedenim od sorte Plavac mali: budući da su sjemenke glavni izvor katehina, produljena maceracija pod povišenom temperaturom može povećati ekstrakciju fenola iz sjemenke (Bravo i sur., 2006). Navedeni uvjeti često se koriste prilikom vinifikacije Plavca malog kako bi se poboljšala ekstrakcija antocijana.

Među ispitivanim ZOI, vina sa ZOI Dingač te ZOI Hrvatsko Podunavlje djelomično su se grupirale uzduž PC1, a vina sa ZOI Hrvatska Istra djelomično su se grupirala uz PC2. Vina sa ZOI Dingač odlikovala su se visokim vrijednostima koncentracije flavonola, ukupnih fenola te rezultata antioksidacijskih testova (Slika 8A). Više koncentracije fenolnih spojeva u dalmatinskim vinima mogu se objasniti klimatskim uvjetima ove regije koji uključuju visoke temperature, velik broj sunčanih sati godišnje i sušne ljetne mjesece (Tablica 11). Za razliku od njih, vina sa ZOI Slavonija, a osobito vina sa ZOI Hrvatsko Podunavlje, proizvedena u hladnijem i vlažnijem području s manjim brojem sunčanih sati godišnje, sadržavala su manje koncentracije navedenih spojeva i imala su manji antioksidacijski kapacitet. Prethodna su

istraživanja, naime, ustanovila da su flavonoli odgovorni za zaštitu od UV zračenja u viših biljaka (Pollastri i Tattini, 2011; Teixeira i sur., 2013). Također su izmjerene više koncentracije flavonola uslijed izražene suše u razdoblju zrenja grožđa (Ojeda i sur., 2002); te više koncentracije ukupnih fenola i flavan-3-ola (katehina) u uvjetima sušne i tople klime (Chacon i sur., 2009). Karakteristike tla također imaju učinak na sintezu fenola: neplodna ili siromašna tla aktiviraju sintezu flavonoida (Reeve i sur., 2005). Prema Li i sur. (2011), karakteristike ˝terroira˝ utječu na protok ugljika kroz različite ogranke metaboličkih puteva biosinteze flavonoida te utječu na konačni fenolni profil vina. Promatrano s obzirom na ZOI, rezultati ovog istraživanjima u skladu su s navedenim rezultatima pronađenim u literaturi.

Promatrano s obzirom na godište berbe, uočeno je potpuno razdvajanje uzoraka vina iz 2011. i 2014. godine (Slika 8B). Vina iz godišta berbe 2014. jedina su se grupirala na desnoj polovici faktorske ravnine. Godina 2014. bila je najhladnija i najvlažnija, s najmanjim prosječnim dnevnim osunčavanjem u odnosu na ostale ispitivane godine. S druge strane, 2011. je bila najsušnija, najsunčanija i najtoplija godina (Tablica 11), no u vegetacijskom razdoblju zabilježena je veća količina oborina u srpnju, u odnosu na ostale ispitivane godine (Tablica 12), nakon čega je slijedio vrlo sušni kolovoz. Prema Ojeda i sur. (2006) blagi deficit vode neposredno prije zrenja i zatim snažan deficit tijekom zrenja pozitivno utječu na sintezu flavonola. S druge strane, hladna 2014. godina, s kratkim sunčanim razdobljima i s mnogo vlage, općenito se može smatrati lošom godinom s niskim koncentracijama fenola i smanjenim antioksidacijskim kapacitetom.

Diskriminacija prema elementnom sastavu uspješno se koristi za autentifikaciju vina s obzirom na geografsko podrijetlo (Geana et al., 2013; Martin et al., 2012; Šelih et al., 2014) iako u literaturi ne postoji dokaz o izravnoj vezi elementnog sastava tla i vina. Naime, elementni sastav vina ovisi o kompleksnoj interakciji tla i loze te utjecaju okolišnih faktora, klimatskih uvjeta, vitikulturne i enološke prakse te skladištenju vina (Serapinas i sur., 2008; Versari i sur., 2014). Slike 9 i 10 prikazuju rezultate PCA s drugim skupom varijabli (makroelementi, mikroelementi te elementi u tragovima): projekcija varijabli na faktorsku ravninu PC1xPC2 (9A); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na sorte) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (9B); projekcija uzoraka (razlikovanih obzirom na ZOI) na faktorsku ravninu PC1xPC2 (10). Nakon autoskaliranja, prve dvije glavne komponente objasnile su 34,25% ukupne varijance, od čega je prva glavna komponenta (PC1) obuhvatila 23,81%, a druga glavna komponenta (PC2) je obuhvatila 10,44% ukupne varijance. Varijable s najvećim doprinosom PC1 bile su: Co (-0,79), Fe (-0,68) i Al (-0,68), dok su Mn (-0,71), Ni (-0,55), Cd (0,52) i Se (0,51) bile varijable s

najvećim doprinosom PC2. Projekcija uzoraka na faktorsku ravninu nije otkrila izraženije grupiranje uzoraka ni s obzirom na sortu, niti s obzirom na ZOI.

Vina proizvedena od sorte Frankovka grupirala su se u donjem dijelu faktorske ravnine s obzirom na povišeni sadržaj Mg i Mn, a sniženi sadržaj Se i Cd. Vina proizvedena od sorte Babić grupirala su se u gornjem desnom kvadrantu faktorske ravnine s obzirom na niže koncentracije Mn, Al, Ni, Co, V i As (Slika 9B). Uzorci vina proizvedenih od sorte Babić potjecali su isključivo iz Sjeverne Dalmacije, dok su uzorci vina proizvedenih od sorte Frankovka potjecali iz regije Istočna kontinentalna Hrvatska zbog čega nije moguće sa sigurnošću zaključiti da li navedene razlike potječu od proizvodne sorte ili od geografskog podrijetla vina. Vina sa ZOI Slavonija i ZOI Hrvatsko Podunavlje grupirala su se na desnoj strani faktorske ravnine što je bilo očekivano s obzirom na njihovo blisko geografsko podrijetlo (Slika 10). Ova su vina bliska s obzirom na niži sadržaj As, Se i Cd, a viši sadržaj Mg i Mn. Vina iz primorske Hrvatske većim su dijelom smještena na gornjem dijelu faktorske ravnine i odlikuju se višim sadržajem Se i Cd, a nižim sadržajem Mg, K, Mn i Ni. Leder i sur. (2015) su zaključili da su K, Ca, Mg, Na i Co karakteristični za vina iz kontinentalne Hrvatske, dok su Cd, Ni, Cr, Zn, As i Al karakteristični za vina iz priobalnog dijela Hrvatske. Suprotno nalazu Fiket i sur. (2011), ali sukladno nalazu Leder i sur. (2015), u ovom istraživanju nisu nađene povišene vrijednosti As u vinima iz kontinentalne Hrvatske unatoč povećanim koncentracijama As u podzemnim vodama navedene regije (Ujević i sur., 2010). Općenito, visoka raspršenost uzoraka može se objasniti mnogobrojnim potencijalnim uzrocima varijabilnosti uključujući sastav tla, mobilnost elemenata od stijena do tla i od tla do loze, upotrebom fungicida, pesticida i herbicida, navodnjavanjem, biljnim unosom koji ovisi o sorti grožđa i podlozi vinove loze, procesom prozvodnje, starenja, pakiranja i skladištenja vina (Versari i sur., 2014).

5.10. Kanonička diskriminacijska analiza

Kanonička diskriminacijska analiza (CDA) upotrebljena je kao supervizirana statistička tehnika kako bi se definirale diskriminacijske funkcije koje najbolje opisuju razlike među unaprijed definiranim grupama (zavisnim klasifikacijskim varijablama): sortama, geografskim regijama, ZOI i godištima berbe. Definirano je sedam sorti (Babić, Cabernet Sauvignon, Frankovka, Merlot, Pinot crni, Plavac mali i Teran), tri regije (Dalmacija, Istočna kontinentalna Hrvatska i Istra), sedam ZOI (Dalmatinska zagora, Dingač, Hrvatska Istra, Hrvatsko Podunavlje, Sjeverna Dalmacija, Slavonija te Srednja i južna Dalmacija) i pet godišta berbe (2011., 2012., 2013., 2014. i 2015.). Provedene su CDA s dva odvojena seta nezavisnih

varijabli. Prvi set varijabli uključivao je rezultate antioksidacijskih testova te koncentracije ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih spojeva, a drugi set nezavisnih varijabli uključivao je koncentracije makroelemenata, mikroelemenata te elemenata u tragovima. Nove varijable definirane s CDA, tzv. kanoničke diskriminacijske funkcije, nazvane su CDF1, CDF2, CDF3, a dodana oznaka u zagradi označuje klasifikacijske varijable (grupe) (Tablice 25 i 26). Projekcije vina u dvodimenzionalnom prostoru s obzirom na sortu, regiju i ZOI ukazuju da CDA pruža bolji diskriminacijski model na temelju fenolnog i multielementnog sastava vina u odnosu na PCA (Slike 11A, 13A, 14A, 21A i 22A).

Diskriminacija vina prema fenolnom sastavu ispitana je s obzirom na sortu, geografsko podrijetlo i godište berbe. CDA provedena s prvim setom varijabli na svim uzorcima vina, uz sortu kao zavisnu, klasifikacijsku, varijablu, definirala je šest kanoničkih diskriminacijskih funkcija, od kojih su prikazane prve tri. Prve dvije funkcije sažele su 79% ukupne varijance, a razlika među sortama bila je značajna (Wilksov lambda 0,06 i 0,21; $p<0,001$) (Tablica 25). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(S) bile su vanilinska kiselina i katehin, dok su ferulinska kiselina i miricetin najviše doprinijele CDF2(S). Projekcija vina klasificiranih s obzirom na sortu te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru prikazana je na Slici 11. CDF1(S) je omogućila razdvajanje sorte Plavac od sorti Merlot, Frankovka i Pinot crni. CDF2(S) je razdvojila sortu Teran od sorti Frankovka i Pinot crni. Međutim, Plavac mali bila je jedina sorta s jasno izdvojenim antioksidacijskim svojstvima i fenolnim sastavom. Vina proizvedena od sorte Plavac mali odvojila su se od ostalih vina na temelju viših koncentracija katehina i višeg antioksidacijskog kapaciteta utvrđenog DPPH• metodom, a nižih koncentracija miricetina i vanilinske kiseline. Vina proizvedena od sorte Teran odvojila su se od vina proizvedenih od sorti Pinot crni i Frankovka na temelju viših koncentracija miricetina i hidroksitirosola, a nižih koncentracija ferulinske kiseline. Grupiranje vina proizvedenih od sorte Frankovka u gornjem desnom kvadrantu temeljilo se na višoj koncentraciji vanilinske i ferulinske kiseline, a nižoj koncentraciji katehina i miricetina. Uzorci vina Cabernet Sauvignon i Merlot međusobno su se preklapali i nisu se razdvajali od ostalih vina pomoću kanoničkih diskriminacijskih funkcija. Uzorci vina proizvedenih od ovih dviju sorti potjecali su iz svih ispitivanih regija što je mogući razlog opisanom rezultatu budući je različit utjecaj terroira na aktivaciju gena i sintezu enzima potrebnih za biosintezu fenolnih spojeva (Li i sur., 2011) uzrokovao značajnu varijabilnost među ispitivanim fenolima i smanjio mogućnost diskriminacije navedenih vina.

Kako bi se razlučio utjecaj sorte od utjecaja geografskog podrijetla na antioksidacijski kapacitet i fenolni sastav vina, provedena je CDA na istom setu nezavisnih varijabli, ali je definiran novi set zavisnih varijabli: obuhvaćena su vina proizvedena od različitih sorti (Merlot, Cabernet Sauvignon i Teran), ali s istom ZOI (Hrvatska Istra). Dvije kanoničke diskriminacijske funkcije CDF1(S/I) i CDF2(S/I) imale su visoku kanoničku korelaciju s definiranim grupama ($r = 0,89$; $r = 0,83$) te je razlika među sortama bila značajna (Wilksov lambda 0,07 i 0,31; $p<0,05$) (Tablica 25). Projekcija vina klasificiranih s obzirom na sorte (Merlot, Cabernet Sauvignon i Teran sa ZOI Hrvatska Istra) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru prikazana je na Slici 12. DPPH•, miricetin, katehin, ferulinska kiselina i FRAP najviše su doprinijeli CDF1(S/I), dok su miricetin i resveratrol najviše doprinijeli CDF2(S/I). Razdvajanje je bilo potpuno: CDF1(S/I) je razdvojila sorte Cabernet Sauvignon i Merlot od sorte Teran, dok je CDF2(S/I) razdvojila sortu Merlot od sorte Cabernet Sauvignon. Vina proizvedena od sorte Teran odlikovala su se višim koncentracijama miricetina, katehina i višim antioksidacijskim kapacitetom određenim DPPH• metodom, a nižim koncentracijama ferulinske i galne kiseline. Vina proizvedena od sorte Merlot bogatija su resveratrolom, tirosolom i kvercetinom u donosu na druga ispitivana vina, dok su se vina proizvedena od sorte Cabernet Sauvignon isticala višim koncentracijama galne kiseline, a nižim koncentracijama katehina, resveratrola i nižim antioksidacijskim kapacitetom određenim DPPH• metodom. Ovi rezultati ukazuju da fenolni spojevi imaju visok potencijal za diskriminaciju vina koji, međutim, može biti maskiran utjecajem terroira. Stoga s pomoću fenolnog profila nije moguće razlikovanje vina proizvedenih od iste sorte, ali različitog geografskog podrijetla, kao što je u ovom istraživanju bio slučaj s vinima proizvedenim od sorti Merlot i Cabernet Sauvignon.

Utjecaj geografskog podrijetla na diskriminaciju vina tj. njegov potencijal za moguće grupiranje vina provjeren je uz pomoć CDA provedene sa svim uzorcima, ali s regijom i sa ZOI kao klasifikacijskim varijablama. Prilikom uporabe regije kao klasifikacijske varijable ustanovljeno je da je razlika među regijama bila značajna, no razdvajanje je bilo slabije nego među sortama (Wilksov lambda 0,28 i 0,58; $p<0,001$) (Tablica 25). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(R) bile su katehin, vanilinska kiselina i kvercetin, dok su ferulinska kiselina, vanilinska kiselina i miricetin najviše doprinijeli CDF2(R). Projekcija vina klasificiranih s obzirom na regiju te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru prikazana je na Slici 13. CDF1(R) je djelomično razdvojila dalmatinska vina od istarskih i kontinentalnih vina. CDF2(R) je djelomično razdvojila istarska od kontinentalnih vina. Vina iz Istočne kontinentalne Hrvatske razdvajala su se od ostalih vina s obzirom na visoku

koncentraciju ferulinske i vanilinske kiseline, a nisku koncentraciju katehina i miricetina. Dalmatinska vina isticala su se višim koncentracijama katehina i kvercetina, a nižim koncentracijama resveratrola, miricetina i vanilinske kiseline. Istarska vina sadržavala su više miricetina, a manje vanilinske i ferulinske kiseline te kvercetina u odnosu na ostala ispitivana vina (Slika 13).

CDA je također provedena s prvim setom varijabli na svim uzorcima vina, ali uz ZOI kao zavisnu, klasifikacijsku, varijablu kako bi se ustanovilo da li je pomoću antioksidacijskog kapaciteta i fenolnog sastava moguće grupiranje i razdvajanje vina tj. klasifikacija vina s obzirom na ZOI. Na taj način je definirano šest kanoničkih diskriminacijskih funkcija, od kojih su prikazane prve tri. Prve dvije funkcije sažele su 75% ukupne varijance, a razlika među sortama bila je značajna (Wilksov lambda 0,09 i 0,26; $p<0,001$) (Tablica 25). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(Z) bile su vanilinska kiselina, kvercetin i katehin, dok su FRAP, ferulinska kiselina i miricetin najviše doprinijele CDF2(Z). Projekcija vina klasificiranih s obzirom na ZOI te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru prikazana je na Slici 14. CDF1(Z) je djelomično razdvojila ZOI Dingač i ZOI Srednja i južna Dalmacija od ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija. Također je CDF2(Z) djelomično razdvojila ZOI Hrvatska Istra od ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija. Iako je jasno vidljivo grupiranje uzoraka prema ZOI, CDA nije uspjela razdvojiti vina porijeklom s geografski bliskih ZOI: ZOI Hrvatsko Podunavlje od ZOI Slavonija te međusobno razdvajanje ZOI Dalmatinska zagora, ZOI Dingač, ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Srednja i južna Dalmacija. Manje izraženo razdvajanje u slučaju uporabe ZOI kao klasifikacijske varijable vjerojatno je posljedica manje geografske udaljenosti između pojedinih navedenih ZOI te, posljedično, sličnijeg terroira (Jaitz i sur., 2010). Vina sa kontinentalnim ZOI karakterizirana su višim sadržajem vanilinske kiseline, vina sa ZOI Hrvatska Istra sadrže više miricetina, a vina sa dalmatinskim ZOI sadrže više kvercetina i katehina. Vina sa ZOI Dalmatinska zagora nemaju posebno istaknutih diskriminacijskih svojstava (Slika 14).

Kako bi se razlučio utjecaj geografskog podrijetla od utjecaja sorte na antioksidacijski kapacitet i fenolni sastav vina, provedene su dvije CDA na istom setu nezavisnih varijabli, ali je definiran novi set zavisnih varijabli: prvim su obuhvaćena vina proizvedena od iste sorte (Merlot), ali iz različitih regija (Dalmacija, Istočna kontinentalna Hrvatska i Istra), a drugim vina proizvedena od iste sorte (Merlot), ali s različitim ZOI (Dalmatinska zagora, Hrvatska Istra, Hrvatsko Podunavlje, Slavonija, Srednja i južna Dalmacija). Dvije kanoničke diskriminacijske funkcije CDF1(M/R) i CDF2(M/R) bile su na granici statističke značajnosti (Wilksov lambda 0,16 i 0,42; $p=0,047$ i $p=0,051$) (Tablica 25). Varijable s najvećim

doprinosom CDF1(M/R) bile su resveratrol i ferulinska kiselina, dok su vanilinska kiselina, katehin i DPPH• najviše doprinijele CDF2(M/R). Projekcija vina Merlot klasificiranih s obzirom na regije (Dalmacija, Istočna kontinentalna Hrvatska i Istra) te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru prikazana je na Slici 15. CDF1(M/R) je djelomično razdvojila vina Merlot proizvedena u Istri od onih proizvedenih u Istočnoj kontinentalnoj Hrvatskoj, dok je CDF2(M/R) djelomično razdvojila vina Merlot proizvedena u Dalmaciji od onih proizvedenih u Istri i Istočnoj kontinentalnoj Hrvatskoj. Veći broj uzoraka pridonio bi stabilnosti modela i povećao statističku značajnost diskriminacijskih funkcija. Ovi rezultati, međutim, ukazuju na izražen utjecaj terroira na fenolni sastav vina (Slika 15A). Merlot iz Istre odlikuje se višom koncentracijom resveratrola, Merlot iz Dalmacije višom koncentracijom vanilinske kiseline, a Merlot iz Istočne kontinentalne Hrvatske višim koncentracijama katehina i ferulinske kiseline. Zanimljivo je da su vina iz Istočne kontinentalne Hrvatske karakterizirana višom koncentracijom vanilinske kiseline u odnosu na vina iz ostalih regija. Isto nije slučaj s vinima proizvedenim od sorte Merlot u navedenoj regiji, koja imaju nižu koncentraciju vanilinske kiseline u odnosu na vina proizvedena od sorte Merlot u ostalim regijama. Navedeno ukazuje da na visoki doprinos vanilinske kiseline diskriminaciji kontinentalnih vina utječe njezina prisutnost u drugim vinima, u ovom slučaju vinima proizvedenim od sorti Frankovka i Pinot crni. Budući se vanilinska kiselina najvećim dijelom povezuje s praksom starenja vina u hrastovim bačvama, više koncentracije nađene u vinima proizvedenim od sorti Frankovka i Pinot crni ukazuju na češću praksu oplemenjivanja ovih vina hrastom, što potvrđuje činjenicu da na fenolni profil utječe i enološka praksa određene vinorodne regije.

CDA provedena sa uzorcima vina Merlot te s pet ZOI kao zavisnim varijablama definirala je šest kanonskih diskriminacijskih funkcija, no niti jedna nije bila statistički značajna (Tablica 25). Projekcija vina Merlot klasificiranih s obzirom na ZOI te kanoničkih koeficijenata izvornih varijabli u dvodimenzionalnom prostoru prikazana je na Slici 16. S obzirom da navedena CDA nije dala statistički značajne rezultate zbog malog broja uzoraka po pojedinim ZOI, njezini rezultati nisu uključeni u raspravu.

Općenito, najučinkovitiji fenolni spojevi u diskriminaciji hrvatskih vina u ovom istraživanju bili su katehin, miricetin, vanilinska kiselina, ferulinska kiselina, kvercetin i resveratrol. Rastija i sur. (2009) također su zaključili da su flavonoli i resveratrol glavne varijable koje omogućuju diskriminaciju hrvatskih vina prema geografskom podrijetlu i sorti. Slični rezultati dobiveni su i kod inozemnih vina: Makris i sur. (2006) razlikovali su vina prema

sadržaju antocijana, flavan-3-ola, flavonola, procijanidina i hidroksicinaminskih kiselina, dok su Li i sur. (2011) uz pomoć fenolnog sastava razlikovali vina iz pet specifičnih kineskih regija.

Ispitan je i potencijal fenolnih spojeva da diskriminira vina na osnovu različitih godišta berbe. CDA provedena s prvim setom varijabli na svim uzorcima vina, uz godište berbe kao zavisnu, klasifikacijsku, varijablu, definirala je pet kanoničkih diskriminacijskih funkcija, od kojih su prikazane prve tri, međutim samo je prva, CDF1(G) statistički značajna ($p<0,001$). Relativno visok Wilksov lambda, nizak koeficijent kanoničke korelacije te niska svojstvena vrijednost (engl. eigenvalue) (Tablica 25) ukazuju na slabost modela tj. na slabu sposobnost fenolnih spojeva da diskriminiraju vina iz različitih godišta berbe. DPPH•, vanilinska kiselina i katehin najviše doprinose CDF1(G), no nije uočeno grupiranje, niti razdvajanje uzoraka vina s obzirom na godište berbe (Slika 17). Ovakav rezultat je očekivan, s obzirom na veliku raznolikost ispitivanih uzoraka (različite proizvodne sorte, različito geografsko podrijetlo).

Kako bi se razlučio utjecaj geografskog podrijetla i sorte grožđa od utjecaja klimatoloških faktora u godini berbe na antioksidacijski kapacitet i fenolni sastav vina, provedena je CDA na istom setu nezavisnih varijabli, ali je definiran novi set zavisnih varijabli: obuhvaćena su vina proizvedena od jedne sorte (Plavac mali), s istom ZOI (Srednja i južna Dalmacija), ali iz tri godišta berbe (2013., 2014. i 2015.). Definirane su dvije kanoničke diskriminacijske funkcije s visokim koeficijentom korelacije, od koji je druga, CDF2(P/G), bila na granici statističke značajnosti ($p=0,053$) (Tablica 25). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(P/G) bile su ukupni fenoli, miricetin, tirosol i ferulinska kiselina, dok su vanilinska kiselina, katehin i kvercetin bile varijable s najvećim doprinosom CDF2(P/G). CDF1(P/G) razdvaja godište 2014. od godišta 2015, dok CDF2(P/G) razdvaja godište 2013. od godišta 2015. Slika 18A prikazuje projekciju uzoraka u dvodimenzionalnom prostoru: 2013. godište odlikuje se višim koncentracijama vanilinske kiseline i kvercetina, 2014. godište karakterizirano je višim koncentracijama katehina, kaempferola i resveratrola, a 2015. godište se odlikuje višim koncentracijama galne kiseline, ferulinske kiseline i tirosola. Moguće je da su više koncentracije vanilinske kiseline u vinima iz 2013. godišta posljedica dugotrajnijeg starenja vina u hrastovim bačvama. Visoka koncentracija kaempferola u vinima iz 2014. godine može dovesti u vezu s klimatskim uvjetima. Sinteza flavonoida u grožđu započinje od L-fenilalanina, preko dihidrokaempferola do dihidrokvercetina i dihidromiricetina i njihovih derivata. Dihidrokvercetin se dalje metabolizira do cijanidin-antocijana, a dihidromiricetin do delfinidin-antocijana (Castellarin i sur., 2007: Mattivi i sur., 2006). Brojne studije potvrđuju da biosinteza flavonoida, osobito antocijana, ovisi o nedostatku vode tijekom zrenja (Lee i sur., 2009; Ojeda i sur., 2002; Sen i Tokatli, 2014). Prema Li i sur. (2011), protok ugljika u lozi

podložan je terroiru i klimatskim uvjetima. Velika količina oborina u 2014. godini mogla je, stoga, utjecati na prekid biosinteze flavonoida prije sinteze kvercetina i miricetina što bi moglo prouzročiti višu koncentraciju njihovog prekursora, kaempferola, u analiziranim vinima. Iz istog razloga bi se veća koncentracija flavonola kvercetina u vinima iz 2013. godišta mogla pripisati znatno sušnijim uvjetima u razdoblju zrenja u odnosu na 2015., a osobito na 2014. godinu. Jaitz i sur. (2010) također su pronašli da su flavan-3-oli (katehin i epikatehin), flavonoli (kvercetin, miricetin i kaempferol) te neke od fenolnih kiselina (galna, ferulinska, *p*-kumarinska i kavena) bili korisni u diskriminaciji austrijskih crnih vina proizvedenih od godišta berbe 2003.-2007. Visoka koncentracija resveratrola u vinima proizvedenim 2014. g. vjerojatno je posljedica češće izloženosti napadu patogena, poput *Botrytis cinerea*, kojima su pogodovali najkraće prosječno dnevno trajanje osunčavanja i najveća ukupna količina oborina među ispitivanim godištima (Tablice 11 i 12).

Diskriminacija prema elementnom sastavu ispitana je s obzirom na sortu i geografsko podrijetlo. CDA provedena s drugim setom varijabli (makroelementi, mikroelementi te elementi u tragovima) na svim uzorcima vina, uz sortu kao zavisnu, klasifikacijsku, varijablu, definirala je šest kanoničkih diskriminacijskih funkcija, od kojih su prikazane prve tri. Prve dvije funkcije sažele su 73% ukupne varijance, a razlika među sortama bila je značajna (Wilksov lambda 0,14 i 0,32; $p < 0,05$) (Tablica 26). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(S) bile su As i Mn, dok su Fe i Mg najviše doprinijele CDF2(S) (Slika 19). CDF1(S) je omogućila razdvajanje sorte Plavac od sorte Frankovka. CDF2(S) je djelomično razdvojila sortu Teran od sorte Frankovka. Ostale sorte se slabo grupiraju i razdvajaju uzduž CDF1(S) i CDF2(S). Prema Versari i sur. (2014), elementni sastav vina upotrebljava se za diskriminaciju vina obzirom na geografsko podrijetlo, no ne i s obzirom na sortu. Stoga, očekivano, CDA provedena sa sortom kao klasifikacijskom varijablom, a makroelementima, mikroelementima i elementima u tragovima kao nezavisnim varijablama, nije dala zadovoljavajuće rezultate (Slika 19A).

Uzevši u obzir da su doprinosi tla, kao i različite vitikulturne i enološke prakse na elementni sastav vina značajni, provedena je CDA s tri različite sorte (Merlot, Cabernet Sauvignon i Teran) s istom ZOI (Hrvatska Istra) kako bi se razlučio mogući utjecaj sorte na elementni sastav vina. Suprotno očekivanjima, projekcija vina u dvodimenzionalnom prostoru otkrila je grupiranje istarskih vina obzirom na sortu: vina proizvedena od sorte Cabernet Sauvignon sadržavala su više Fe, a manje Na i Al; vina proizvedena od sorte Merlot sadržavala su više Cu i Cr, a manje Fe; vina proizvedena od sorte Teran sadržavala su više Co, a manje Pb i As (Slika 20A). Iako je utvrđena relativno visoka kanonička korelacija i niski Wilksov lambda,

kanoničke diskriminacijske funkcije nisu bile statistički značajne (Tablica 26) zbog malog broja uzoraka. Unatoč tomu, bilo je moguće utvrditi diskriminacijski obrazac. Nejasno je, međutim, da li ove razlike potječu od različitih tala u vinogradima tj. preferencijalnoj sadnji sorti u određenu vrstu tla što implicira različitu geokemiju tla. Ipak, nedavno objavljeni rezultati upućuju na zaključak da je diskriminacija sorti na osnovu elementnog sastava moguća. Naime, Potorti i sur. (2016) su našli da se sicilijanska vina proizvedena od sorte Nero d'Avola odlikuju višom koncentracijom Zn, Cr, Ni, As i Cd, dok su uzorci vina proizvedeni od sorte Syrah sadržavali više K, Mg, Cu i Sb.

Također je provedena CDA s drugim setom varijabli na svim uzorcima vina, uz regiju kao zavisnu, klasifikacijsku, varijablu. Razlika među regijama bila je značajna, ali je razdvajanje bilo slabije nego među sortama (Wilksov lambda 0,24 i 0,66; $p<0,001$) (Tablica 26). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(R) bile su As, Mn i Na, dok su Mg i Co najviše doprinijeli CDF2(R) (Slika 21). CDF1(R) je djelomično razdvojila dalmatinska od istarskih i kontinentalnih vina. CDF2(R) je djelomično razdvojila istarska od kontinentalnih vina. Istarska vina razlikovala su se od ostalih vina s obzirom na viši sadržaj Cr i Co, a niži sadržaj Mg; dalmatinska vina odlikovala su se višim sadržajem As, a nižim sadržajem Mn i Na; kontinentalna vina odlikovala su se višim sadržajem Na i Mg, a nižim sadržajem Cr i As. Geološka rasprostranjenost elemenata u tlima uglavnom se podudara s opisanim rezultatima (Halamić, 2009). Iznimka je Mn koji je osobito nizak u dalmatinskim vinima unatoč visokoj koncentraciji izmjerenoj u tlu.

S obzirom na značajnu geografsku udaljenost ispitivanih regija, dodatna CDA provedena je sa ZOI kao klasifikacijskim varijablama, kako bi se ustanovilo može li se ovim modelom razlikovati vina porijeklom s mnogo bliskijih geografskih područja. Na taj način je definirano šest kanoničkih diskriminacijskih funkcija, od kojih su prikazane prve tri. Prve dvije funkcije sažele su 69% ukupne varijance, a razlika među sortama bila je značajna (Wilksov lambda 0,03 i 0,11; $p<0,001$) (Tablica 26). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(Z) bile su As i Mn, dok su Na i K najviše doprinijele CDF2(Z) (Slika 22). CDF1(Z) je djelomično razdvojila ZOI Dalmatinska zagora i ZOI Srednja i južna Dalmacija od ZOI Slavonija. Također je CDF2(Z) djelomično razdvojila ZOI Srednja i južna Dalmacija i ZOI Slavonija od ZOI Hrvatsko Podunavlje. Iako je jasno vidljivo grupiranje uzoraka prema ZOI, CDA nije uspjela razdvojiti vina porijeklom s geografski bliskih ZOI tj. nije uspjelo međusobno razdvajanje ZOI Dalmatinska zagora, ZOI Dingač, ZOI Sjeverna Dalmacija i ZOI Srednja i južna Dalmacija. Također ni CDF1(Z) niti CDF2(Z) nisu uspjele razdvojiti ZOI Hrvatska Istra od drugih ispitivanih ZOI. Dalmatinska vina karakterizirala je viša koncentracija As i niža koncentracija

Na i Mn, a vina sa ZOI Dingač dodatno su se odlikovala višom koncentracijom K. Ipak, zanimljivo je potpuno razdvajanje geografski bliskih ZOI: ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Slavonija. ZOI Slavonija razdvojila se s obzirom na više koncentracije Mn i K, a ZOI Hrvatsko Podunavlje s obzirom na više koncentracije Na i Co. Vina sa ZOI Hrvatska Istra u ovom se modelu grupiraju u središnjem dijelu ravnine bez ikakvih osobitosti u odnosu na ostala ispitivana vina.

Kako bi se razlučio utjecaj geografskog podrijetla od utjecaja sorte na elementni sastav vina, provedene su dvije CDA na istom setu nezavisnih varijabli, ali je definiran novi set zavisnih varijabli: prvim su obuhvaćena vina proizvedena od iste sorte (Merlot), ali iz različitih regija (Dalmacija, Istočna kontinentalna Hrvatska i Istra), a drugim vina proizvedena od iste sorte (Merlot), ali s različitim ZOI (Dalmatinska zagora, Hrvatska Istra, Hrvatsko Podunavlje, Slavonija, Srednja i južna Dalmacija). U prvoj CDA definirane su dvije kanoničke diskriminacijske funkcije CDF1(M/R) i CDF2(M/R), od kojih je samo prva bila statistički značajna te je omogućila potpuno razdvajanje vina iz regije Dalmacija od vina iz regija Istočna kontinentalna Hrvatska i Istra (Wilksov lambda 0,04; p=0,037) (Tablica 26). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(M/R) bile su Ca, Al, V i Zn (Slika 23). Vina proizvedena od sorte Merlot jasno su se odvajila prema regijama (Slika 23A), no varijable koje su omogućile razdvajanje (Slika 23B) razlikovale su se od onih identificiranih za ukupan set uzoraka vina. Vina Merlot proizvedena u Istri sadrže više Ca, Al, Cr i Cu, a manje Zn i K u odnosu na ostala regionalna vina Merlot. Vina Merlot proizvedena u Dalmaciji karakterizirale su više koncentracije As, V i Zn, a vina Merlot proizvedena u Istočnoj kontinentalnoj Hrvatskoj karakterizirale su niže koncentracije Pb, Cd i V.

CDA s uzorcima vina Merlot i s pet ZOI kao zavisnim varijablama omogućila je još bolje razdvajanje uzoraka. U ovom modelu definirano je šest kanonskih diskriminacijskih funkcija, od kojih su prikazane prve tri (Tablica 26). Prve dvije funkcije sažele su 88% ukupne varijance. Unatoč malom broju uzoraka, snaga modela bila je velika: svojstvene vrijednosti kanoničkih diskriminacijskih funkcija bile su 22,1 i 9,11; kanoničke korelacije iznosile su 0,98 i 0,95, Wilksovi lambda bili su < 0,01 i 0,01; $p < 0,05$ (Tablica 26). Varijable s najvećim doprinosom CDF1(M/Z) bile su Co, Fe, Cr i Al, dok su V, Zn i Ca najviše doprinijele CDF2(M/Z) (Slika 24). Razdvajanje je bilo potpuno: CDF1(M/Z) je omogućila razdvajanje ZOI Hrvatsko Podunavlje i ZOI Dalmatinska zagora od ZOI Hrvatska Istra i ZOI Srednja i južna Dalmacija, dok je CDF2(M/Z) razdvojila ZOI Hrvatsko Podunavlje, ZOI Slavonija i ZOI Hrvatska Istra od ZOI Dalmatinska zagora i ZOI Srednja i južna Dalmacija. Također su uzorci vina iz ZOI Slavonija razdvojeni od uzoraka vina iz ZOI Hrvatska Istra. Vina Merlot sa ZOI

Srednja i južna Dalmacija odvajala su se na temelju više koncentracije K, a niže koncentracije Co i Mg. Vina Merlot sa ZOI Dalmatinska zagora sadržavala su više As i Zn, a manje Ca i Al, dok su vina Merlot sa ZOI Hrvatsko Podunavlje sadržavala više Na, a manje K i V. Zanimljivo je da su vina Merlot sa ZOI Slavonija i ZOI Hrvatska Istra bila slična po elementnom sastavu, unatoč značajnoj geografskoj udaljenosti, te su sadržavala više Cr, Al i Ca. Ipak, ovaj rezultat trebalo bi potvrditi s većim brojem uzoraka slavonskih vina Merlot. Navedeni rezultati upućuju na zaključak da utjecaj sorte na elementni sastav vina nije zanemariv te da su modeli za geografsku diskriminaciju vina proizvedenih od jedne sorte superiorniji u odnosu na modele koji uključuju više različitih sorti. Utjecaj sorte, međutim, vjerojatno nije ograničen samo na karakteristike koje potječu od botaničkog podrijetla, a uključuju interakciju između vinove loze i tla te moguće različite potrebe različitih sorti za nutrijentima, već i od vitikulturne i enološke prakse povezane uz određenu sortu (npr. upotrebu fungicida ovisno o osjetljivosti sorte na patogene, upotrebu hrastovih bačvi ili hrastovih trijeski za poboljšavanje organoleptičkih svojstava tijekom starenja vina). Razlikovanje vina proizvedenog od iste sorte, ali različitog podrijetla osobito bi moglo biti korisno u sprečavanju prijevare kupca uslijed nedopuštenog mješanja takvih vina (Jaitz i sur., 2010). Istraživanja provedena u drugim državama producirala su različite kombinacije diskriminacijskih elemenata, što je očekivano s obzirom na različitu geokemiju tla, ali i vitikulturnu i enološku praksu. Tako su Fabani i sur. (2010) klasificirali argentinska vina pomoću K, Fe, Ca, Cr, Mg, Mn i Zn; Geana i sur. (2013) upotrijebili su Pb, Cu, Zn, Co, Ni, Sr, Mn, Ag, Cr, Rb i V za geografsku diskriminaciju rumunjskih vina; Sen i Tokatli (2014) su razlikovali vina proizvedena na istoku od onih proizvedenih na zapadu Turske uz pomoć Sr, Li, Ni, Ba, B, Pb, Cd i Al. Općenito, najkorisniji elementi za diskriminaciju hrvatskih vina u ovom istraživanju bili su As, Na, K, Al, Cr i Co. Leder i sur. (2013) također su zaključili da K, Ca, Mg, Na, Co, Cd, Ni, Cr, Zn, Al i As omogućuju razlikovanje hrvatskih kontinentalnih od primorskih vina.

Zaključno, fenolni sastav vina omogućio je bolju diskriminaciju vina prema sorti, a elementni sastav prema geografskom podrijetlu (Tablice 25 i 26). Unatoč tomu, regionalna diskriminacija bila je moguća s pomoću fenolnog sastava, kao i sortna diskriminacija s pomoću elementnog sastava. Ova posljednja zahtijevala je, međutim, minimizaciju zbunjujućih čimbenika tj. sortna diskriminacija bila je moguća među vinima porijeklom iz iste regije.

5.11. Zastupljenost nutraceutičkih i antinutraceutičkih spojeva u vinima s različitom tradicionalnom oznakom kvalitete

Vina se razvrstavaju u kvalitetne kategorije ovisno o kakvoći prerađenog grožđa, prirodu po hektaru, stupnju zrelosti grožđa, prerade i njege, randmanu, količini prirodnog alkohola i drugih sastojaka te organoleptičkim svojstvima (NN 96/2003). Tradicionalne oznake kvalitete vezane uz ZOI u Hrvatskoj su kvalitetno vino i vrhunsko vino. U ovom su istraživanju t-testom uspoređene koncentracije ispitivanih parametara u uzorcima kvalitetnih i vrhunskih vina te je u vrhunskim vinima nađen statistički značajno veći antioksidacijski kapacitet te statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenola, kvercetina, miricetina, galne i ferulinske kiseline, hidroksitirosola i tirosola čime se potvrđuje veći nutraceutički potencijal vrhunskih vina. Resveratrol je bio podjednako zastupljen u vrhunskim i kvalitetnim vinima (Tablica 27). Među antinutraceutičkim komponentama, jedino je kadaverin bio statistički značajno različit u vinima različitih kategorija kvalitete. Također su nađene statistički značajne razlike u koncentracijama Ca, Mg, Fe i Cu među uzorcima kvalitetnih i vrhunskih vina. Vrhunska vina sadržavala su značajno niže koncentracije Cu i Fe (Tablica 27). Niže koncentracije ovih elemenata poželjne su u vrhunskim vinima jer njihov suvišak može prouzročiti nepoželjne promjene organoleptičkih svojstava, poput neugodnog ˝bakrenog˝ ili ˝željeznog˝ okusa vina (Pohl, 2007).

6.0 ZAKLJUČCI

Ciljevi ovog istraživanja bili su: utvrditi razlike u antioksidacijskom kapacitetu te koncentracijama nutraceutičkih (fenola, melatonina, mikroelemenata i makroelemenata) i antinutraceutičkih tvari (biogenih amina, toksičnih elemenata, okratoksina A) u komercijalno dostupnim crnim vinima različitih sorti, godišta berbe i zaštićenih oznaka izvornosti te utvrditi postojanje pokazatelja specifičnih za pojedine zaštićene oznake izvornosti i za njih karakteristične sorte čime će se omogućiti pouzdanija autentifikacija vina. Na osnovu provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1.) Antioksidacijski kapacitet vina te koncentracije pojedinačnih fenola u hrvatskim su vinima ovisne većim dijelom o geografskom podrijetlu vina tj. o terroiru, a manjim dijelom o karakteristikama proizvodne sorte. Općenito su vina s južnim ZOI bogatija fenolnim spojevima i imaju veći antioksidacijski kapacitet. Najviše koncentracije resveratrola, najistraživanijeg nutraceutika, izmjerene su u vinima proizvedenima od sorte Teran. Vina sa ZOI Dingač isticala su se najvišim koncentracijama ukupnih fenola i najvišim antioksidacijskim kapacitetom.

2.) Elementni sastav vina bio je najvećim dijelom ovisan o geografskom podrijetlu vina. Unatoč velikoj varijabilnosti rezultata, nađene su statistički značajne razlike u koncentracijama K, Mg, Na, Mn, Zn, Pb i Cd među vinima s različitim ZOI. Za sve navedene elemente, izuzev Mn, uočeno je dobro poklapanje s njihovom zastupljenošću u tlu. Koncentracije As, Cd, Cu, Pb i Zn, za koje su EU i OIV propisale MDK, bile su ispod graničnih vrijednosti u svim ispitivanim uzorcima.

3.) Biogeni amini (putrescin, histamin, tiramin i kadaverin) izmjereni su u širokom rasponu koncentracija. Histamin je jedini bio sortno i regionalno specifičan. Više koncentracije histamina izmjerene su u vinima s višim pH-vrijednostima (Plavac mali i Babić) te u vinima proizvedenim od grožđa ubranog u klimatološki nepovoljnoj godini (kraće trajanje osunčavanja, veća količina oborina).

4.) Koncentracije OTA i udio OTA-kontaminiranih vina postupno je rastao od sjevera prema jugu. Sva su dalmatinska vina bila kontaminirana, međutim je najviša izmjerena koncentracija iznosila 0,163 µg/L što je više nego deseterostruko niže od maksimalno dopuštene granice (2 µg/kg) u Europskoj Uniji.

5.) U vinima je OTA izmjeren u širokom rasponu koncentracija te nisu nađene statistički značajne razlike s obzirom na sortu i geografsko podrijetlo. Međutim, udio OTA-nekontaminiranih vina upućivao je na sortno specifičnu osjetljivost na infekciju okratoksigenom plijesni i posljedičnu kontaminaciju OTA. Frankovka i Merlot bile su jedine sorte među čijim su vinima pronađeni OTA-nekontaminirani uzorci. Klimatološki uvjeti utječu na pojavnost OTA: najviše koncentracije OTA izmjerene su u vinima iz 2014. godine koja je bila najvlažnija godina s najkraćim prosječnim dnevnim trajanjem osunčavanja. Također su sva vina iz navedenog godišta bila kontaminirana s OTA.

6.) Melatonin nije detektiran u ispitivanim uzorcima, ali je izomer melatonina, TEE, pronađen u širokom rasponu koncentracija. Razlike u koncentracijama TEE, primijećene u ovom istraživanju, mogu se pripisati različitoj populaciji mikroorganizama prisutnoj na sirovini te različitim uvjetima vinifikacije.

7.) Kanoničkom diskriminacijskom analizom dobiveni su bolji modeli za razlikovanje vina proizvedenih od različitih sorti i s različitim geografskim podrijetlom u odnosu na analizu glavnih komponenata.

8.) Fenolni sastav vina imao je visok potencijal za diferencijaciju vina i bio je ovisan o sorti. Međutim, utjecaj terroira bio je snažan: stoga nije bila moguća diskriminacija vina proizvedenih od iste sorte, ali različitog geografskog podrijetla. Također, fenolni sastav vina omogućio je razlikovanje vina ovisno o godištu berbe, ukoliko je proizvedeno od iste sorte i ukoliko je istoga geografskog podrijetla. Učinkoviti fenolni spojevi u diskriminaciji vina bili su: katehin, kvercetin, miricetin, vanilinska i ferulinska kiselina i resveratrol.

9.) Elementni sastav vina bio je osobito koristan za regionalnu diskriminaciju vina, međutim, utjecaj sorte na elementni sastav vina nije bio zanemariv. Učinkoviti elementi u diskriminaciji vina bili su K, Na, Al, Cr, Co i As.

10.) Vrhunska vina imala su statistički značajno viši antioksidacijski kapacitet te su sadržavala statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenola, kvercetina, miricetina, galne i ferulinske kiseline, hidroksitirosola i tirosola čime je potvrđen veći nutraceutički potencijal vrhunskih vina. Resveratrol je bio podjednako zastupljen u vrhunskim i kvalitetnim vinima.

.

LITERATURA

- Abril, M., Negueruela, A., Perez, C., Juan, T., Estopanan, G. (2005) Preliminary study of resveratrol content in Aragón red and rosé wines. *Food Chem.* **92**, 729–736. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.034
- Albergaria, H., Arneborg N. (2016) Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **100**, 2035-2046. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0
- Alkıs, İ.M., Öz, S., Atakol, A., Yılmaz, N., Anlı, R.E., Atakol, O. (2014) Investigation of heavy metal concentrations in some Turkish wines. *J. Food Comp. Anal*. **33**, 105–110. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.006
- Altiokka, G., Can, N.O., Atkosar, Z., Aboul-Enein, H.Y. (2009) Determination of ochratoxin A in Turkish wines. *J. Food Drug Anal*. **17**, 467-473.
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., Guiraud, J.P. (2012) OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control* **26**, 259-268. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.042
- Ancín-Azpilicueta, C., González-Marco, A. Jiménez-Moreno, N. (2008) Current knowledge about the presence of amines in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 257-275. https://doi.org/10.1080/10408390701289441
- Angelone, T., Pasqua, T., DiMajo, D., Quintieri, A.M., Filice, E., Amodio, N., Tota, B., Giammanco, M., Cerra, M.C. (2011) Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols. *Nutr. Metab. Cardiovas.* **21**, 362-371. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.10.011
- Anli, E., Vural, N., Demiray, S., Ozkan, M. (2006) Trans-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish red wines with HPLC. *J. Wine Res*. **17**, 117-125. https://doi.org/10.1080/09571260601004328
- Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P. (2002) Anthocyanin composition and colour characteristics of selected aged wines produced in Greece. *J. Wine Res*. **13**, 23-34. https://doi.org/10.1080/0957126022000004039
- Artero, A., Artero, A., Tarín, J.J., Cano, A. (2015) The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas* **80**, 3-13. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.09.007

- Arts, I.C.W., van de Putte, B., Hollman, P.C.H. (2000) Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1752–1757. https://doi.org/10.1021/jf000025h
- Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković-Bukarica, Lj., Bursać, M., Cvejić, J. (2012) Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chem*. **131**, 513-518. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.015
- Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A., Pusztai, A. (1993) Polyamines in food—implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.* **4**, 66-71. https://doi.org/10.1016/0955-2863(93)90001-D
- Barnard, H., Dooley, A.N., Areshian, G., Gasparyan, B., Faull, K.F. (2011) Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *J. Archaeol. Sci.* **38**., 977-984. https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.11.012
- Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A. (2006) European research on ochratoxin A in grapes and wine. *Int. J. Food Microbiol*. **111**, S2–S4. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.007
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z. (2003) Occurrence of ochratoxin A–producing fungi in grapes grown in Italy. *J. Food Protect*. **66**, 633–636. https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.4.633
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. (2004) Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol*. **97**, 1038-1044. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x
- Belajova, E., Rauova, D. (2007) Determination of ochratoxin A and its occurrence in wines of Slovakian retail. *J. Food Nutr. Res.* **46**, 68–74.
- Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J., Bragulat, M.R. (2006) Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol*. **111**, S40–S45. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.011
- Belli, N., Marıin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2004) Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 19–27.

https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.004

- Bellomarino, S.A., Parker, R.M., Conlan, X.A.,Barnett, N.W., Adams, M.J. (2010) Partial least squares and principal components analysis of wine vintage by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta* **678**, 34-38. https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.021
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of ˝Antioxidant Power˝: The FRAP assay. *Anal Biochem.* **239**, 70-76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol.* **299**, 15-27. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5
- Biagi, M., Bertelli, A.A.E. (2015) Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox? *Life Sci.* **131**, 19-22. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.024
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT – *Food Sci. Technol.* **28,** 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Bravo, M.N., Silva, S., Coelho, A.V., Vilas Boas, L., Bronze, M.R. (2006) Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal, *Anal. Chim. Acta* **563**, 84–92. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.054
- Brown, V.A., Patel, K.R., Viskaduraki, M., Crowell, J.A., Perloff, M., Booth, T.D., Vasilinin, G., Sen, A., Schinas, A.M., Piccirilli, G., Brown, V., Steward, W.P., Gescher, A.J., Brenner, D.E. (2010) Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res*. **70**, 9003–9011. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2364
- Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M., Terracciano, A. (2006) Chromatographic analysis of trans resveratrol in Italian wines: comparisons between FL, UV and MS detection. *Chromatographia* **64**, 475–481. https://doi.org/10.1365/s10337-006-0042-4

- Burdaspal, P.; Legarda, T. (2007) Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. *Food Addit. Contam.* **24**, 976–986. https://doi.org/10.1080/02652030701311155
- Büyüktuncel, E., Porgalı, E., Çolak, C. (2014) Comparison of total phenolic content and total antioxidant activity in local red wines determined by spectrophotometric methods. *Food Nutr. Sci.* **5**, 1660-1667. https://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.517179
- Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., Lopez-Lazaro, M. (2011) A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Rev. Med. Chem*. **11**, 298-344(47). https://doi.org/10.2174/138955711795305335
- Calixto-Campos, C., Carvalho, T.T., Hohmann, M.S.N., Pinho-Ribeiro, F.A., Fattori, V., Manchope, M.F., Zarpelon, A.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Casagrande, R., Verri Jr., W.A. (2015) Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NFκB activation in mice. *J. Nat. Prod.* **78***,* 1799–1808. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00246
- Cao, W., Chen, W., Sun, S., Guo, P., Song, J., Tian, C. (2007). Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method*. J. Mol. Struc. Theochem*. **817**, 1–4. https://doi.org/10.1016/j.theochem.2007.04.022
- Castellarin, S.D., Matthews, M.A., Di Gaspero, G., Gambetta, G.A. (2007) Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, **227**, 101–112. https://doi.org/10.1007/s00425-007-0598-8
- Cavalieri, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., Polsinelli, M. (2003) Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* **57**, S226–S232. https://doi.org/10.1007/s00239-003-0031-2
- Chacón, J. L., García, E., Martínez, J., Romero, R., Gómez, S. (2009) Impact of the vine water status on the berry and seed phenolic composition of 'Merlot' (Vitis vinifera L.) cultivated in a warm climate: consequence for the style of wine. *Vitis* **48**, 7–9.
- Chen, Z.Y., Chan, P.T., Ho, K.Y., Fung, K.P., Wang, J. (1996) Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem. Phys. Lipids* **79**, 157-163.

https://doi.org/10.1016/0009-3084(96)02523-6

- Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Sosa, D.M., Combina, M., Chulze, S.N. (2013) Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. *Food Microbiol*. **36**, 182-190. https://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.003
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., Teissedre, P.L. (2011) Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem.* **126**, 1971-1977. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.056
- Chorti E., Guidoni S., Ferrandino A., Novello V. (2010) Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Viticult*. **61**, 23–30.
- Clouvel, P., Bonvarlet, L., Martinez, A., Lagouarde, P., Dieng, I., Martin, P. (2008) Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. *Int. J. Food Microbiol*. **123**, 74–80. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.003
- Cornwell, D.G., Ma, J. (2008) Nutritional Benefit of Olive Oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8774–8786. https://doi.org/10.1021/jf8015877
- Costa, E., Cosme, F., Rivero-Pérez, M.D., Jordao, A.M., González-SanJosé, M.L. (2015) Influence of wine region provenance on phenolic composition, antioxidant capacity and radical scavenger activity of traditional Portuguese red grape varieties. *Eur. Food Res. Technol*. **241**, 61-73. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2434-x
- Costantini, A., Vaudano, E., Del Prete, V., Danei, M., Garcia-Moruno, E. (2009) Biogenic amine production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10664-10669. https://doi.org/10.1021/jf9025426
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Shah, N., Dambergs, R.G., Smith, P.A. (2009) A brief introduction to multivariate methods in grape and wine analysis. *Int. J. Wine Res*. **1**, 123–130.

- Ćurko, N., Kovačević Ganić, K., Gracin, L., Đapić, M., Jourdes, M., Teissedre, P.L. (2014) Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chem.* **145**, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.131
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313-7352. https://doi.org/10.3390/molecules15107313
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., Manley, M. (2002) Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. S. Afr. J. Enol. Vitic. 23, 48-61. https://doi.org/10.21548/23-2-2155.
- De Jesus, C.L., Bartley, A., Welch, A.Z., Berry, J.P. (2018) High incidence and levels of ochratoxin A in wines sourced from the United States. *Toxins*, **10**, 1. https://doi.org/10.3390/toxins10010001
- de Orduña, R.M. (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* **43**, 1844-1855. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001
- de Vries, J.H., Hollman, P.C., Meyboom, S., Buysman, M.N., Zock, P.L., van Staveren, W.A., Katan, M.B. (1998) Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 60–65. https://doi.org/10.1093/ajcn/68.1.60
- Del Prete, V., Costantini, A., Cecchini, F., Morassut, M., Garcia-Moruno, E. (2009) Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chem*. **112**, 474–481. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.102
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Sign*. **18**. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., Giammanco, M. (2008) The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem*. **111**, 45–49. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.037

- Domijan, A.M.; Peraica, M. (2005) Ochratoxin A in wine. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 17–20.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., Robinson, S.P. (2004) The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res*. **10**, 55–73.
  https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00008.x
- Državni hidrometeorološki zavod (DHMZ), klimatološki podatci, dostupno na: meteo.hr; pristupljeno 10.01.2019.
- Statistički ljetopis Republike Hrvatske (2017), Državni zavod za statistiku, Zagreb, dostupno na: https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2017/sljh2017.pdf; pristupljeno: 15.07.2018.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M. (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *P. Nutr. Soc.* **62**, 599–603.
  https://doi.org/10.1079/PNS2003275
- Đorđević, N.O., Pejin, B., Novaković, M.M., Stanković, D.M., Mutić, J.J., Pajović, S.B., Tešević, V.V. (2018) Multielement analysis and antioxidant capacity of Merlot wine clones developed in Montenegro, *Nat. Prod. Res*. **32**, 247-251.
  https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1347171
- El Khoury, A., Atoui, A. (2010) Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins* **2**, 461-493.
  https://doi.org/10.3390/toxins2040461
- EPA QA/G-9S Data quality assessment: statistical methods for practitioners. EPA/240/B-06/003 February 2006. Dostupno na: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/g9s-final.pdf; pristupljeno 11.08.2019.
- European Commission Regulation (EC) No 2676/1990 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. Dostupno na: https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6528497d-1ece-4355-ab08-c73b3242f7ee/language-en; pristupljeno 02.02.2019.
- European Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance); https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1881; pristupljeno pristupljeno 02.02.2019.

- European Commission Regulation 2015/1005 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs (Text with EEA relevance). Dostupno na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32015R1005; pristupljeno 02. 02.2019.
- Fabani, M.P., Arrua, R.C., Vazquez, F., Diaz, M.P., Baroni, M.V., Wunderlin, D.A. (2010) Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chem.* **119**, 372–379. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.085
- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F. (2012) Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res. Int.* **45**, 402–414. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.010
- Faustino, R.S., Sobrattee, S., Edel, A.L., Pierce, G.N. (2003) Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. *Mol. Cell. Biochem.* **249**, 11–19. https://doi.org/10.1023/A:1024745513314
- Fernández-Cruz, E., Álvarez-Fernández, M.A., Valero, E., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2017) Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains, *Food Chemistry* **217**, 431-437. https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.020
- Fernandez-Mar, M.I., Mateos R., Garcia-Parrilla, M.C., Puertas, B., Cantos-Villar, E. (2012) Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* **130**, 797-813. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.023
- Fernández-Pachón, M., Villaño, D., Garcıa-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M. (2004) Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. Chim. Acta* **513**, 113–118. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.028
- Ferreira, I., Pinho, O. (2006) Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *J. Food Prot.* **69**, 2293–2303. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2293
- Fiket, Ž., Mikac, N., Kniewald, G. (2011) Arsenic and other trace metals in wines of eastern Croatia. *Food Chem.* **126**, 941-947.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.091

- Finotti, E., Di Majo, D. (2003) Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Mol. Nutr. Food Res*. **47**, 186-187. https://doi.org/10.1002/food.200390043
- Flajs, D., Domijan, A.M., Ivić, D., Cvjetković, B., Peraica, M. (2009) ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control* **20**, 590-592. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.021
- Formica, J.V., Regelson, W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061-1080. https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00077-1
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* ***31***, 435–445. https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006
- Fraga, H., Malheiro, A.C., Moutinho-Pereira, J., Santos, J.A. (2014) Climate factors driving wine production in the Portuguese Minho region. *Agr. Forest Meteorol*. **185**, 26–36. https://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2013.11.003
- Galgano, F., Caruso, M., Perretti, G., Favati, F. (2011) Authentication of Italian red wines on the basis of the polyphenols and biogenic amines. *Eur. Food Res. Technol.* **232**, 889–897. https://doi.org/10.1007/s00217-011-1457-1
- Ganeshpurkar, A., Saluja, A.K. (2017) The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm J*. **25**, 149-164. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025
- Garaguso, I., Nardini, M. (2015) Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chem.* **179**, 336-342. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.144
- García-Cela, E., Crespo-Sempere, A., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S. (2014) Ecophysiological characterization of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* isolated from grapes in Spanish vineyards. *Int. J. Food Microbiol.* **173**, 89–98. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.012

- Garcia-Rodrigues, G., Hernández-Moreno, D., Soler, F., Pérez-Lopez, M. (2011) Characterization of "Ribera del Guadiana" and "Méntrida" Spanish red wines by chemometric techniques based on their mineral contents. *J. Food Nutr. Res.* **50**, 41–49.
- Gardana, C., , Iriti, M., Stuknytė, M., De Noni, I., Simonetti, P. (2014) 'Melatonin isomer' in wine is not an isomer of the melatonin but tryptophan-ethylester. *J. Pineal Res*. **57**, 435-441.
  https://doi.org/10.1111/jpi.12183
- Garrido, J.,Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Res. Int.* **54,** 1844-1858.
  https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002
- 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 Chem.* **138**, 1125-1134.
  https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.104
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsolova, V. (2014) Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals, *Nutrients* **6**, 391-415.
  https://doi.org/10.3390/nu6010391
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res*. **5**, 6697-6703.
  https://doi.org/10.5897/JMPR11.1404
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., Patiño, B. (2018) Wine contamination with Ochratoxins: a review. *Beverages* **4**, 6.
  https://doi.org/10.3390/beverages4010006
- Giovinazzo, G., Grieco, F. (2015) Functional properties of grape and wine polyphenols. *Plant Foods Hum. Nutr.* **70**, 454–462.
  https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1
- Girelli, A.M., Mele, C., Salvagni, L., Tarola, A.M. (2015) Polyphenolic content and antioxidant activity of Merlot and Shiraz wine. *Anal. Lett*. **48**, 1865-1880.
  https://doi.org/10.1080/00032719.2014.1003429
- Goldberg, D.M., Dam, J., Carey, M., Soleas, G.J. (2000) Cultivar-specific patterns of polyphenolic constituents in wines from the finger lakes region of New York state. *J. Wine Re*s. **11**, 155-164.
  https://doi.org/10.1080/09571260020001593

- Gomez, F.J.V., Raba, J., Cerutti, S., Silva, M.F. (2012) Monitoring melatonin and its isomer in Vitis vinifera cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. *J. Pineal Res*. **52**, 349–355. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00949.x
- Graf, E. (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 435-448. https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90184-I
- Granato, D., Chizuko Uchida Katayama, F., Alves de Castro, I. (2011) Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem*. **129**, 366-373. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.085
- Guilford, J.M., Pezzuto, J.M. (2011) Wine and health: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **62**, 471-486. https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11013
- Gupta, A., Birhman, K., Raheja, I., Sharma, S.K., Kar, H.K. (2016) Quercetin: a wonder bioflavonoid with therapeutic potential in disease management. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **6**, 248-252. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61024-6
- Guzev, L., Danshin, A., Ziv, S., Lichter, A. (2006) Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, S67–S71. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.003
- Halamić, J., Miko, S., editors. Geochemical Atlas of the Republic of Croatia–Croatian Geological Survey. Zagreb, Croatia: Croatian Geological Institute; 2009.
- Hasan, M., Bae, H. (2017) An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*, **22**, 294. https://doi.org/10.3390/molecules22020294
- Herbert, P., Cabrita, M.J., Ratola, N., Laureano, O., Alves, A. (2005) Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *J. Food Eng.* **66**, 315-322. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.024
- Herjavec, S., Jeromel, A., Da Silva, A., Orlic, S., Redzepovic, S. (2007) The quality of white wines fermented in Croatian oak barrels. *Food Chem*. **100**, 124–128. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.034

- Hopfer, H., Nelson, J., Collins, T.C., Heymann, H., Ebeler, S.E. (2015) The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines. *Food Chem*. **172**, 486–496. https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.113
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Vol. 56, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993, pp. 489–521.
- Ibanez, J.G., Carreon-Alvarez, A., Barcena-Soto, M., Casillas, N. (2008) Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. *J. Food Comp. Anal*. **21**, 672– 683. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.005
- International code of Oenological Practices. Paris, France: OIV (International Organisation of Vine and Wine); 2015. Available from: http://www.oiv.int/public/medias/3741/e-code-annex-maximum-acceptable-limits.pdf. Datum pristupa: 15.04.2019.
- Iriti, M., Vigentini, I. (2015) Article commentary: tryptophan-ethylester, the false (unveiled) melatonin isomer in red wine. *Int. J. Tryptophan Res*. **8**, 27–29. https://doi.org/10.4137/IJTR.S22450
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M., Yagi, K. (2009) Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin A-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull*. **32**, 1215-1219. https://doi.org/10.1248/bpb.32.1215
- Ivandija, T. (2008) Autochthonous sorts of vine. *Glasnik zaštite bilja*, **6**, 117-125 (in Croatian).
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, A., Márk, L., Dimovska, V., Stafilov, T., Kilár, F. (2011) Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Res. Int*. **44**, 2851–2860. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.046
- Ivanova-Petropulos, V., Ricci, A., Nedelkovski, D., Dimovska, V., Parpinello, G.P., Versari, A. (2015) Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chem*. **171**, 412–420. https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.014

- Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak, G., Abranko, L., Koellensperger, G., Hann, S. (2010) LC–MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chem.* **122**, 366–372. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.053
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2007) Evaluation of certain food additives and contaminants: Sixty-eight report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report Series, 947.
- Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E., Lanaridis, P. (2006) Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem.* **99**, 784–793. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.059
- Kamsu-Foguem, B., Flammang, A. (2014) Knowledge description for the suitability requirements of different geographical regions for growing wine. *Land Use Policy* **38**, 719-731. https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2014.01.018
- Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I., Boban, M. (2004) Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.* **86**, 593-600. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.007
- Kaur, M., Velmurugan, B., Rajamanickam, S., Agarwal, R., Agarwal, C. (2009) Gallic acid, an active constituent of grape seed Extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharm. Res.* **26**, 2133–2140. https://doi.org/10.1007/s11095-009-9926-y
- Kennedy, J.A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and wine phenolics: history and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* **57,** 239-248.
- Kim, Y.J. (2007) Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol. Pharm. Bull*. **30**, 1052—1055. https://doi.org/10.1248/bpb.30.1052
- 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 Chem.* **91**, 157-65. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.010
- Kocadağlı, T., Yılmaz, C., Gökmen, V. (2014) Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **153**, 151–156.

https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.036

- Konakovsky, V., Focke, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Schmid, R., Scheiner, O., Moser, P., Jarisch, R., Hemmer, W. (2011) Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines, *Food Addit. Contam. A* **28**, 408-416. https://doi.org/10.1080/19440049.2010.551421
- Kottek, M.; Grieser, J.; Beck, C.; Rudolf, B.; Rubel, F. (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Z.* **15**, 259–263. https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130
- 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 Res. Int.* **54**, 621-626. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.053
- Kuhn, N., Guan, L., Dai, Z.W., Wu, B.H., Lauvergeat, V., Gomès, E., Li, S.H., Godoy, F., Arce-Johnson, P., Delrot, S. (2014) Berry ripening: recently heard through the grapevine. *J. Exp. Bot.* **65**, 4543–4559. https://doi.org/10.1093/jxb/ert395
- Kumar, S., Pandey, A.K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* Article ID 162750, 16 pages. https://dx.doi.org/10.1155/2013/162750
- La Torre, G.L., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicanò, T., Dugo, G. (2006) Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem*. **94**, 640-650. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.007
- Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I. (2005) Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1119-1124. https://doi.org/10.1021/jf049340k
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M., Cardinali, A. (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry* 23-67.
- Leder, R., Kubanović, V., Petric, I.V., Vahčić, N., Banović, M. (2015) Chemometric prediction of the geographical origin of Croatian wines through their elemental profiles. *J. Food Nutr. Res*. **54**, 229-238.

- Li, Z., Pan, Q., Jin, Z., Mu, L., Duan, C. (2011) Comparison on phenolic compounds in Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon wines from five wine-growing regions in China. *Food Chem*. **125**, 77–83. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.039
- Lim, M.Y., Park, Y.H., Son, D.J., Kim, M.K., Lee, H.S. (2004) Antiplatelet activity of gallic acid and methyl gallate. *Food Sci. Biotech.* **13**, 806-809.
- Lipar, M., Bosankić, G., Horvat Hržić, A., Savić, Z. (2015) Wine production, trade of wine and state of planted areas of varieties Cabernet Sauvignon, Merlot and Syrah in Croatia. In Proceedings of the 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture, Opatija, Croatia, 16–20 February 2015; 521–525.
- Lippi, G., Franchini, M., Favaloro, E.J., Targher, G. (2010) Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the ‘‘French paradox’’. *Semin. Thromb. Hemost*. **36**, 059-070. https://doi.org/10.1055/s-0030-1248725
- Lista tradicionalnih izraza za vino (NN 96/2007), dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_09_96_2857.html; pristupljeno 08.06.2019.
- Liu, R.H. (2013) Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv. Nutr*. **4**, 384S–392S. https://doi.org/10.3945/an.112.003517
- Lorenzo, M.N., Taboada, J.J., Lorenzo, J.F., Ramos, A.M. (2013) Influence of climate on grape production and wine quality in the Rı´as Baixas, north-western Spain. *Reg. Environ. Change* **13**, 887–896. https://doi.org/10.1007/s10113-012-0387-1
- Makris, D.P., Kallithraka, S., Mamalosc, A. (2006) Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta* **70**, 1143–1152. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.024
- Maletić, E., Pejić, I., Karoglan Kontić, J., Zdunić, G., Preiner, D., Šimon, S., Andabaka, Ž., Žulj Mihaljević, M., Bubola, M., Marković, Z., Stupić, D., Mucalo, A. (2015) Ampelographic and genetic characterization of Croatian grapevine varieties. *Vitis* **54**, 93-98.
- Mariño-Repizo, L., Gargantini, R., Manzano, H., Raba, J., Cerutti, S. (2017) Assessment of ochratoxin A occurence in Argentine red wines using a novel sensitive quechers-solid phase

extraction approach prior to ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry methodology. *J. Sci. Food Agr.* **97**, 2487-2497. https://doi.org/10.1002/jsfa.8065

- Marks, D. (2011) Competitiveness and the market for Central and Eastern European wines: a cultural good in the global wine market. *J. Wine Res*. **22**, 245-263. https://doi.org/10.1080/09571264.2011.622517
- Marques, A.P., Leitao, M.C., San Romao, M.V. (2008) Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chem.* **107**, 853-860. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.004
- Martin, A.E., Watling, R.J., Lee, G.S. (2012) The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. *Food Chem.* **133**, 1081-1089. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.013
- Martuscelli, M., Arfelli, G., Manetta, A.C., Suzzi, G. (2013) Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Food Chem*. **140**, 590–597. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.008
- Mas, A., Guillamon, J.M., Torija, M.J., Beltran, G., Cerezo, A.B., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. (2014) Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed Res. Int.*, Article ID 898045, 7 pages. https://dx.doi.org/10.1155/2014/898045
- Matthew, C., Lawoko, C.R.O., Korte, C.J., Smith, D. (1994) Application of canonical discriminant analysis, principal component analysis, and canonical correlation analysis as tools for evaluating differences in pasture botanical composition. *New Zeal. J. Agr. Res*. **37**, 509-520. https://doi.org/10.1080/00288233.1994.9513090
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U. Stefanini, M., Velasco, R. (2006) Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7692-7702. https://doi.org/10.1021/jf061538c
- McDonald, M.S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M.E.J., Matthews, D., Crozier, A. (1998) Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 368–375. https://doi.org/10.1021/jf970677e
- Meija, J., Caruso, J.A. (2004) Deconvolution of isobaric interferences in mass spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **15**, 654-658.

https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.12.016

- Meng, J.F., Shi, T.C., Song, S., Zhang, Z.W., Fang, Y.L. (2017) Melatonin in grapes and grape-related foodstuffs: A review. *Food Chem*. **231**, 185–191. https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.137
- Mikulíková, R., Běláková, S., Benešová, K.; Svoboda, Z. (2012) Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. *Food Chem.* **133**, 55–59. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.061
- Muselík, J., García-Alonso, M., Martín-López, M.P., Žemlička, M., Rivas-Gonzalo, J.C. (2012) Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* **8**, 797-809. https://doi.org/10.3390/i8080797
- Nicholas, K.A., Matthews, M.A., Lobell, D.B., Willits, N.H., Field, C.B. (2011) Effect of vineyard-scale climate variability on Pinot noir phenolic composition. *Agric. Forest Meteorol*. **151**, 1556-1567. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2011.06.010
- Nikfardjam, M.S.P., Márk, L., Avar, P., Figler, M., Ohmacht, R. (2006) Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Food Chem*. **98**, 453–462. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.014
- OIV Statistical Report on World Vitiviniculture, International Organisation of vine and wine (2018), dostupno na: http://www.oiv.int/public/medias/6371/oiv-statistical-report-on-world-vitiviniculture-2018.pdf; pristupljeno 11.05.2019.
- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., Deloire, A. (2002) Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic*. **53**, 261-267.
- Oliveras-López, M.J., Berná, G., Carneiro, E.M., López-García de la Serrana, H., Martín, F., López, M.C. (2008) An extra-virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effects in Of1 mice. *J. Nutr.* **138**, 1074–1078. https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1074
- Ou, S., Kwok, K.C. (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric*. **84**, 1261-1269. https://doi.org/10.1002/jsfa.1873

- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2**, 270-278. http://dx.doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498
- Paterson, R.R.M., Venâncio, A., Lima, N., Guilloux-Bénatier, M., Rousseaux, S. (2018) Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food Res. Int.* **103,** 478–491. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.080
- Pejić I, Maletić E. (2010) Conservation, evaluation and revitalization of native grapevine varieties in Croatia. *Mitt Klostern*. **60**, 363-368.
- Pejić, I., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Kozina, B., Mirošević, N. (2000) Diversity of autochthonous grapevine genotypes in Croatia. *Acta Hortic*. **528**, 67-73. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.528.7
- Pena, A., Cerejo, F., Silva, L.J.G., Lino, C.M. (2010) Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC–FD with direct injection. *Talanta*, **82**, 1556–1561. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.07.041
- Piljac-Žegarac, J., Martinez, S., Valek, B., Stipčević, T., Kovačević-Ganić, K. (2007) Correlation between the phenolic content and DPPH radical scavenging activity of selected Croatian wines. *Acta Aliment.* **36**, 185-193. https://doi.org/10.1556/AAlim.2007.0005
- Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., Puertas, B. (2011) Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *J. Agr. Food Chem*. **59**, 11683–11689. https://doi.org/10.1021/jf202254t
- Pohl, P. (2007) What do metals tell us about wine? *TrAC Trend Anal. Chem.* **26**, 941-949. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.07.005
- Pollastri, S., Tattini, M. (2011) Flavonols: old compounds for old roles. *Ann. Bot*. **108**, 1225-1233. https://doi.org/10.1093/aob/mcr234
- Porgalı, E., Büyüktuncel, E. (2012) Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Res. Int*. **45**, 145–154. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.025

- Potortí, A.G., Lo Turco, V., Saitta, M., Bua, G.D., Tropea, A., Dugo, G., Di Bella, G. (2017) Chemometric analysis of minerals and trace elements in Sicilian wines from two different grape cultivars. *Nat. Prod. Res.* **31**, 1000-1005. https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1261341
- Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o proizvodnji vina (NN 137/2008), dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_11_137_3851.html, pristupljeno: 11. 06. 2019.
- Pravilnik o Nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze (NN 53/2014), dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_04_53_1007.html; pristupljeno: 08. 06. 2019.
- Pravilnik o zaštićenim oznakama izvornosti i zaštićenim oznakama zemljopisnog podrijetla, tradicionalnim izrazima i označavanju vina (NN 141/2010), dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_12_141_3583.html, pristupljeno 15. 06. 2019.
- Pravilnik o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze (NN 74/2012), dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_07_74_1723.html, pristupljeno 12. 06. 2019.
- Preti, R., Antonelli, M.L., Bernacchia, R., Vinci, G. (2015) Fast determination of biogenic amines in beverages by a core–shell particle column. *Food Chem*. **187**, 555–562. https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.075
- Preti, R., Vieri, S., Vinci, G. (2016) Biogenic amine profiles and antioxidant properties of Italian red wines from different price categories. *J. Food Comp. Anal*. **46**, 7–14. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.014
- Preti, R., Vinci, G. (2016) Biogenic amine content in red wines from different protected designations of origin of Southern Italy: chemometric characterization and classification. *Food Anal. Method*. **9**, 2280-2287. https://doi.org/10.1007/s12161-016-0415-8
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302. https://doi.org/10.1021/jf0502698
- Priscilla, D.H., Mainzen Prince, P.S. (2009) Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in

experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chem. Biol. Interact.* **179**, 118-124.
https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.12.012

- Product specifications according to regulation 1308/2013, article 94. for protection of designation of origin according to article 93. Zagreb, Croatia: Ministry of Agriculture of Republic of Croatia; (in Croatian). Available from: http://www.mps.hr/datastore/filestore/75/Dingac.pdf, (Dingač); pristupljeno 10.04.2018.
- Psarra, E., Makris, D.P., Kallithraka, S., Kefalas, P. (2002) Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *J. Sci. Food Agric*. **82**, 1014-1020.
https://doi.org/10.1002/jsfa.1124
- Radovanović, B.C., Radovanović, A.N., Souquet, J.M. (2010) Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet Sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region. *J. Sci. Food Agr*. **90**, 2455-2461.
https://doi.org/10.1002/jsfa.4106
- Rastija, V., Srečnik, G., Medić-Šarić, M. (2009) Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chem.* **115**, 54-60.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.071
- Reeve, J.R., Carpenter-Boggs, L., Reganold, J.P., York, A.L., McGourty, G., McCloskey, L.P. (2005) Soil and winegrape quality in biodynamically and organically managed vineyards. *Am. J. Enol. Vitic*. **56**, 367-376.
- Reinholds, I., Pugajeva, I., Radenkovs, V., Rjabova, J., Bartkevics, V. (2016) Development and validation of new ultra-high-performance liquid chromatography–hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry method for determination of melatonin in fruits. *Journal of Chromatogr. Sci.* **54**, 977–984.
https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw030
- Remiro, R., Irigoyen, A., Gonzalez-Penas, E., Lizarraga, E., Lopez de Cerain, A. (2013) Levels of ochratoxins in Mediterranean red wines. *Food Control* **32**, 63-68.
https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.040
- Renaud, S., Gueguen, R. (1998) The French paradox and wine drinking. Alcohol and cardiovascular diseases, Wiley, Chichester, 208-222.

- Restuccia, D., Sicari, V., Pellicanò, T.M., Spizzirria, U.G., Loizzoa, M.R. (2017) The impact of cultivar on polyphenol and biogenic amine profiles in Calabrian red grapes during winemaking. *Food Res Int*. **102**, 303–312. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.012
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res*. **22**, 375-383. https://doi.org/10.3109/10715769509145649
- Robinson J. (Ed.) (2006) The Oxford Companion to Wine, 3rd Ed. Oxford University Press, New York, 840 p.
- Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J.L., Martínez Gascueña, J., García Romero, E. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687-693. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.003
- Rodriguez-Naranjo, M.I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A.M., Cantos, E., Garcia-Parrilla, M.C. (2011) Melatonin: A new bioactive compound in wine. *J. Food Comp. Anal*. **24**, 603–608. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.12.009
- Romero, R., Sánchez-Viñas, M., Gázquez, D., Bagur, M. G. (2002) Characterization of selected Spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4713-4717. https://doi.org/10.1021/jf025514r
- Russo, M., Spagnuolo, S., Tedesco, I., Bilotto, S., Russo, G. (2012) The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 6-15. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.010
- Russo, P., Capozzi, V., Spano, G., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2016) Metabolites of microbial origin with an impact on health: ochratoxin A and biogenic amines. *Front. Microbiol.* **7***,* 482. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00482
- Sarigiannis, Y., Kapolos, J., Koliadima, A., Tsegenidis, T., Karaiskakis, G. (2014) Ochratoxin A levels in Greek retail wines, *Food Control* **42***,* 139-143. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.003

- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* **36**, 177–187. https://doi.org/10.1080/10715760290006411
- SCOOP (2002) Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on Tasks for Scientific Cooperation, task 3.2.7.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Hardy, M.L., Heber D (2004) Total cranberry extract versus its phytochemical constituents, antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J. Agric. Food. Chem.* **52**, 2512–2517. https://doi.org/10.1021/jf0352778
- Semwal, D.K., Semwal, R.B., Combrinck, S., Viljoen, A. (2016) Myricetin: a dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients* **8**, 90. https://doi.org/10.3390/nu8020090
- Sen, I., Tokatli, F. (2014) Authenticity of wines made with economically important grape varieties grown in Anatolia by their phenolic profiles. *Food Control* **46**, 446-454. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.015
- Sen, I., Tokatli, F. (2014) Characterization and classification of turkish wines based on elemental composition. *Am. J. Enol. Vitic*. **65**, 134-142. https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13081
- Serapinas, P., Venskutonis, P.R., Aninkevičius, V., Ežerinskis, Ž., Galdikas, A., Juzikienė, V. (2008) Step by step approach to multi-element data analysis in testing the provenance of wines. *Food Chem.* **107**, 1652-1660. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.003
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A. (2003) Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 63-68. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00085-0
- Serra, R., Braga, A., Venâncio, A. (2005) Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Res. Microbiol.* **156**, 515–521. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.12.005
- Sindhu, G.,Nishanthi, E., Sharmila, R. (2015) Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: A biochemical and molecular study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **39**, 392-404. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.008

- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*. **16**, 144-158.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M. (1997) Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal*. **11**, 287–313. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1997)11:5<287::AID-JCLA6>3.0.CO;2-4
- Soufleros, E., Barrios, M. L., Bertrand, A. (1998) Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **49,** 266–278.
- Spadaro, D., Lorè, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2010) Occurrence of ochratoxin A before bottling in DOC and DOCG wines produced in Piedmont (Northern Italy). *Food Control* **21**, 1294–1297. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.017
- Staško, A., Brezová, V., Mazúr, M., Čertík, M., Kaliňák, M.,Gescheidt, G. (2008) A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. *LWT - Food Sci. Technol*. **41**, 2126-2135. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.021
- Stege, P.W., Sombra, L.L. , Messina, G., Martinez, L.D., Silva, M.F. (2010) Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase. *Electrophoresis* **31**, 2242-2248. https://doi.org/10.1002/elps.200900782
- Stratil P., Kubáň V., Fojtová J. (2008) Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech J. Food Sci*., **26**, 242–253.
- Stürtz, M., Cerezo, A.B., Cantos-Villar, E., Garcia-Parrilla, M.C. (2011) Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (Lycopersicon esculentum) and strawberries (Fragaria ananassa). *Food Chem*. **127**, 1329–1334. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.093
- Sutherland, B.A., Rahman, R.M.A., Appleton, I. (2006) Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 291-306. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.10.005

- 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 Chem.* **153**, 414–423. https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.081
- Šeruga, M., Novak, I., Jakobek, L. (2011) Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem.* **124**, 1208-1216. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Rosales Corral, S., Coto-Montes, A., Boga, J.A., Reiter, R.J. (2012) Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature. *J. Pineal Res.* **53**, 113–121. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00979.x
- Tan, D.X., Zheng, X., Kong, J., Manchester, L.C., Hardeland, R., Kim, S.J., Xu, X., Reiter, R.J. (2014) Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15858-15890. https://doi.org/10.3390/ijms150915858
- Tanasi, D., Greco, E., DiTullio, V., Capitani, D., Gullì, D., Ciliberto, E. (2017) ^{1}H-^{1}H NMR 2D-TOCSY, ATR FT-IR and SEM-EDX for the identification of organic residues on Sicilian prehistoric pottery. *Microchem. J.* **135**, 140-147. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.08.010
- Tariba, B. (2011) Metals in wine—impact on wine quality and health outcomes. *Biol. Trace Elem. Res.* **144**, 143–156. https://doi.org/10.1007/s12011-011-9052-7.
- Tauchen, J., Marsik, P., Kvasnicova, M., Maghradze, D., Kokoska, L., Vanek, T., Landa, P. (2015) In vitro antioxidant activity and phenolic composition of Georgian, Central and West European wines. *J. Food Comp. Anal.* **41**, 113–121. https://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.029
- Teixeira, E.I., Fischer, G., van Velthuizena, H., Walter, C., Ewert, F. (2013) Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agric. Forest Meteorol.* **170**, 206–215. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2011.09.002
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis in 't Veld, J.H.J. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 73-84.

https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90040-C

- Tsavova-Savova, S., Ribarova, F. (2002) Free and conjugated myricetin, quercetin and kaempferol in Bulgarian red wines. *J. Food Compos. Anal*. **15**, 639-645. https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1099
- Ujević, M., Duić, Ž.,Casiot, C., Sipos, L., Santo, V., Dadić, Ž., Halamić, J. (2010) Occurrence and geochemistry of arsenic in the groundwater of Eastern Croatia. *Appl. Geochem*. **25**, 1017-1029. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2010.04.008
- 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. Dostupno na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A32013R1308; pristupljeno 03.02.2019.
- Van Leeuw, R., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. (2014) Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *J. Food Comp. Anal.* **36**, 40-50. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.07.001
- van Leeuwen, C., Seguin, G. (2006) The concept of terroir in viticulture. *J. Wine Res*. **17**, 1–10. https://doi.org/10.1080/09571260600633135
- Var, I. Kabak, B. (2007) Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. *Microchem. J.*, **86**, 241–247. https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.04.002
- Varga, J., Kiss, R., Mátrai, T., Mátrai, T., Téren, J. (2005) Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. *Acta Aliment.* **34**, 381–392. https://doi.org/10.1556/AAlim.34.2005.4.6
- Versari, A., Laurie, V.F., Ricci, A., Laghi, L., Parpinello, G.P. (2014) Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Res. Int.* **60**, 2-18. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.007

- Vigentini, I., Gardana, C., Fracassetti, D., Gabrielli, M., Foschino, R., Simonetti, P., Tirelli, A., Iriti, M. (2015) Yeast contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan ethyl ester during alcoholic fermentation of grape musts. *J. Pineal Res*. **58**, 388-396. https://doi.org/10.1111/jpi.12223
- Villamiel, M., Polo, M.C., Moreno-Arribas, M.V. (2008) Nitrogen compounds and polysaccharides changes during the biological ageing of sherry wines. *Food Sci. Technol.* **41**, 1842–1846. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.02.012
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. (1999) Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **864**, 89–101. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00996-6
- Vlase, L., Kiss, B., Leucuta, S.E., Gocan, S. (2009) A rapid method for determination of resveratrol in wines by HPLC-MS. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. **32**, 2105–2121. https://doi.org/10.1080/10826070903126989
- Vrček, I.V., Bojić, M., Žuntar, I., Mendaš, G., Medić-Šarić, M. (2011) Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chem.* **124**, 354-361. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.118
- Walle, T. (2011) Bioavailability of resveratrol, *Ann. N. Y. Acad. Sci*. **1215**, 9–15. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x
- Waterhouse, A.L. (2002) Alcohol and wine in health and disease: wine phenolics. *Ann. NY Acad. Sci.* **957**, 21-36. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x
- Yoo, J.Y., Prenzler, P.D., Saliba, A.J., Ryan, D., 2011. Assessment of some Australian red wines for price, phenolic content, antioxidant activity, and vintage in relation to functional food prospects. *J. Food Sci.* **76**, 1355-1364. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02429.x
- Zakon o vinu (NN 96/2003), dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2003_06_96_1219.html; pristupljeno 28.01.2018.
- Zakon o vinu (NN 32/2019), dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_03_32_641.html; pristupljeno 29.06.2019.

- Žurga, P., Vahčić, N., Pasković, I., Banović, M., Malenica Staver, M. (2019) Occurence of ochratoxin A and biogenic amines in Croatian commercial red wines. *Foods* **8**, 8.

ŽIVOTOPIS

Paula Žurga rođena je 22.07.1976. u Rijeci gdje je stekla osnovnoškolsko i gimnazijsko obrazovanje. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer biokemijsko inženjerstvo, upisala je 1995., a diplomirala 2000. godine s odličnim prosjekom. Dobitnica je Dekanove nagrade za postignuti uspjeh u studiju prigodom obilježavanja 40. obljetnice Fakulteta, 1996 godine. Magistrirala je 2007. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, završivši poslijediplomski studij Medicinska biokemija.

Od 2000. do 2001. godine zaposlena je kao znanstveni novak u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2001. do danas radi u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo PGŽ, prvo kao stručna suradnica, zatim od 2012.-2018. u svojstvu voditeljice Odsjeka za zajedničke analitičke tehnike, a od 2019. u svojstvu koordinatorice tehnika ICP-MS, AAS, AMA254. Uže područje rada su joj instrumentalne tehnike: tekućinska kromatografija, atomska apsorpcijska i masena spektrometrija. Kao vanjski suradnik sudjeluje u izvođenju nastave na Medicinskom fakultetu i Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci. Članica je Odbora za upravljanje i unaprijeđenje kvalitete Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

Bila je suradnica na međunarodnim projektima ˝Cjelovit pristup liječenju te socijalnoj i ekonomskoj reintegraciji ovisnika o drogama: IPA-CLOUD˝ (2015.-2016.); ˝Ekološka potpora upravljanju prometom u obalnim područjima korištenjem inteligentnog sustava: ECOMOBILITY¨ (2018.-2019.). Trenutno surađuje na međunarodnom projektu ˝Nove tehnologije za detekciju i analizu mikro i makro plastike u jadranskom bazenu – NET4mPlastic˝ (2019.-2021.) te domaćem projektu (HRZZ): ˝Bilinogojstvom do sekundarnih biljnih metabolita: primjena mineralnih hraniva i elicitora za povećanje koncentracije fenola u listu masline PhytoFarmOL˝ (2017.-2022.)

Dosad je objavila osam a1 radova, od čega tri iz područja Biotehnologije i jedan iz područja Prehrambene tehnologije, te dva a2 rada. Sudjelovala je na 6 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova.

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA

A1

- Žurga, P., Vahčić, N., Pasković, I., Banović, M., Malenica Staver, M. (2019) Occurence of ochratoxin A and biogenic amines in Croatian commercial red wines. *Foods* **8**, 8. IF=3,011

- Žurga, P., Vahčić, N., Pasković, I., Banović, M., Staver Malenica, M. (2019) Croatian wines from native grape varieties have higher distinct phenolic (nutraceutic) profiles than wines from non-native varieties with the same geographic origin. *Chem. Biodivers*. **16**, 8. IF=1,617

- Pasković, I., Soldo, B., Talhaoui, N., Palčić, I., Brkljača, M., Koprivnjak, O., Majetić Germek, V., Ban, D., Klanjac, J., Franić, M., Žurga, P., Grozić, K., Lukić, I., Goreta Ban, S. (2019) Boron foliar application enhances oleuropein level and modulates volatile compound composition in olive leaves. // *Sci. Hortic*. **257**, 108688. IF=1,961

- Varga, M., Horvatić, J., Žurga, P., Brusić, I., Moslavac, M. (2019) Phytotoxicity assessment of isoproturon on growth and physiology of non-targeted aquatic plant *Lemna minor L.* - A comparison of continuous and pulsed exposure with equivalent time-averaged concentrations. *Aquat. Toxicol*. **213**, 105225. IF=3,794

- Broznić, D., Ratkaj, I., Malenica Staver, M., Kraljević Pavelić, S., Žurga, P., Bubalo, D., Gobin, I. (2018) Evaluation of the antioxidant capacity, antimicrobial and antiproliferative potential of Fir (Abies alba Mill.) honeydew honey collected from Gorski kotar (Croatia). *Food Technol. Biotechnol*. **56**, 533-545. IF=1,54

- Cenov, A., Perić, L., Glad, M., Žurga, P., Vukić Lušić, D., Traven, L., Tomić Linšak, D., Linšak, Ž., Devescovi, M., Bihari, N. (2018) A baseline study of the metallothioneins content in digestive gland of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* from Northern Adriatic Sea: Body size, season, gender and metal specific variability. *Mar. Pollut. Bull.* **131**, 95-105. IF=3,782

- Kraljević Pavelić, S., Micek, V., Filošević, A., Gumbarević, D., Žurga, P., Bulog, A., Orct, T., Yamamoto, Y., Preočanin, T., Plavec, J., Peter, R., Petravić, M., Vikić-Topić, D., Pavelić, K. (2017) Novel, oxygenated clinoptilolite material efficiently removes aluminium from aluminium chloride-intoxicated rats in vivo. *Micropor. Mesopor. Mat*. **249**, 146-156. IF=4,182

- Perić, L., Nerlović, V., Žurga, P., Žilić, L., Ramšak, A. (2017) Variations of biomarkers response in mussels Mytilus galloprovincialis to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere* **174,** 554-562. IF=5,108

A2

- Ratkaj, I., Žurga, P., Bulog, A., Peter-Katalinić, J., Kraljević Pavelić, S. (2015) 70-kDa heat shock cognate protein expression as a putative biomarker of heavy-metal burden in *Mytilus galloprovincialis*. *SpringerPlus*. **4**. Indeksiran u SCI-EXP.
- Širić, I., Žurga, P., Barkić, D., Malenica Staver, M. (2015) Trace element contents in the edible mushroom *Boletus edulis Bull. ex Fries*. *Agric. Conspect. Sci*. **80**; 223-227. Indeksiran u Scopus.