

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet



**ODNOS STABILNIH IZOTOPA KISEONIKA U VINSKOJ VODI KAO
POKAZATELJ AUTENTIČNOSTI VINA**

Završni rad

Mentor:

Dr Dušanka Milojković Opsenica

Student:

Jovana Basurović HE65/2023

Beograd, 2024.

Mentor:



dr Dušanka Milojković-Opsenica, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Član komisije:



dr Milica Sredojević, naučni saradnik

Inovacioni centar Hemijskog fakulteta u Beogradu

Datum odbrane:

U Beogradu, 01. 03. 2024.

Oцена: 8 (OSAM)

ZAHVALNICA

Ovaj rad je urađen na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu-Hemijskog fakulteta tokom 2016/17. godine. Temu rada predložili su tadašnji profesor dr Živoslav Tešić i asistent mr Nikola Stevanović, koji su rukovodili njegovom izradom.

Zahvalnost dugujem profesorki dr Dušanki Milojković Opsenici jer je kao šef Katedre za analitičku hemiju omogućila nastavak rada započetog pod rukovodstvom profesora dr Živoslava Tešića i pristala da bude moj mentor u odbrani Završnog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1 Vinska kultura.....	2
2.2 Vinogradarska područja u Srbiji	2
Vinogradski region Vojvodina obuhvata sledeće rejone, odnosno vinogorja:	3
2.3 Hemijski sastav vina	4
2.4 Alkoholna fermentacija, dobijanje crvenih i belih vina (osnovni pojmovi)	6
2.5 Autentičnost vina	8
2.6 IRMS metoda i instrumenti.....	10
2.6.1 Stabilni izotopi.....	10
2.6.2 Masena spektrometrija odnosa izotopa.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DEO	18
3.1 Priprema uzoraka vina za analizu	18
3.2 Priprema uzoraka vina za određivanje odnosa $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	18
4. REZULTATI i DISKUSIJA	23
4.1 Prikaz rezultata	23
4.2 Diskusija dobijenih rezultata	23
5. ZAKLJUČAK.....	27
6. LITERATURA	28

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ocena autentičnosti vina, odnosno ispitivanje mogućnosti za otkrivanje falsifikovanih vina na osnovu određivanja odnosa stabilnih izotopa kiseonika u vodi vina (vinskoj vodi) IRMS metodom (masenom spektrometrijom odnosa izotopa) koristeći gasbenč (Gas Bench II) kao ulazni interfejs.

Ispitivanja su obuhvatila pedeset pet uzoraka vina belih i crnih sorti vinove loze, iz različitih regiona Srbije, kao i iz tri uzastopne godine berbe grožđa (2012, 2013. i 2014). Najveći broj uzoraka je bio sa oglednog dobra Poljoprivrednog fakulteta „Radmilovac”, Beogradski rejon. Razmotren je uticaj klimatskih uslova (količina padavina, vlažnost vazduha i temperatura) na $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti. Na osnovu dobijenih rezultata jasno se izdvajaju jedan uzorak veštačkog vina (2013. godina) i jedan uzorak vina iz Crne Gore (2014. godina). Pored toga uočene su razlike u $\delta^{18}\text{O}$ vrednostima u vinskoj vodi u zavisnosti od godine berbe.

Ključne reči: Crvena i bela vina, određivanje $\delta^{18}\text{O}$ vinske vode, IRMS metoda, godina berbe.

1. UVOD

Vino je napitak dobijen alkoholnim vrenjem svežeg i zrelog grožđa ili soka od svežeg grožđa. Biohemijska definicija je da je vino piće dobijeno alkoholnim vrenjem šećera u soku od grožđa pomoću kvasaca (Wurz, 2019). Vino je jedinstveno piće, rasprostranjeno širom sveta još iz perioda ranih civilizacija.

Reč vino potiče od latinske reči *vinum*, dok nauka o vinu, enologija, nosi ime od grčkih reči *oinos* = vino i *logos* = nauka (Griboff i sar., 2021; Malićanin, 2022). Vina mogu da se prave se i od drugih vrsta voća, kao što su jabuke, borovnice i jagode, međutim, grožđe je postalo standard za proizvodnju vina iz dva ključna razloga. Prvi razlog je što grožđe sadrži jabučnu, vinsku i limunsku kiselinu koje „čuvaju” vino, omogućavajući mu da odleži decenijama, čak i vekovima. Drugi razlog je što grožđe ima mnogo više šećera od drugih vrsta voća što omogućava uspešnu fermentaciju i proizvodnju vina (Nemzer i sar., 2021).

Oko 90% gajenog grožđa širom sveta je plod evropske vinove loze *Vitis Vinifera* L., a unutar ove vrste postoji veliki broj različitih vinskih i stonih, belih i crnih sorti vinove loze. Vinske sorte grožđa razlikuju se od stonih (*Slika 1*) u veličini grozda, debljini pokožice i krupnoći bobica, a pored toga, vinske sorte imaju slađi i intenzivniji ukus (Introduction on Wine; the ultimate guide, 2018).



Slika 1: Vinsko grožđe i stono grožđe (Table Grapes vs Wine Grapes, 2018, Izvor - Youtube kanal, <https://www.youtube.com/watch?v=pxYCCmlUxVA>).

2. OPŠTI DEO

2.1 Vinska kultura

Najranija kultura povezana sa vinom datira između 6000 i 4000 godina p.n.e. sa područja Južnog Kavkaza, kada je vino slučajno otkriveno nakon fermentacije grožđa čuvanog u glinenom kontejneru zakopanom u zemlji (Harutyunayan and Maffieito Fereira, 2022).

Mediterranski region je bio svedok sukcesije različitih civilizacija i naroda, ali vino je bilo trajna roba među najcenjenijim dobrima. Trgovina vinom bila je jedan od glavnih podsticaja za Hanance, a zatim Feničane, Grke, Etrurce i Rimljane da prošire svoj uticaj na Sredozemno more. Širenje vina u Novi svet je počelo od strane Portugalaca i španskih moreplovaca.

U savremeno doba konzumiranja vina, osim sve boljeg kvaliteta vina, doprinela je i tradicija, jer uticaj vina nije se mogao odvojiti od njegovog nutritivnog, društvenog, duhovnog i medicinskog obeležja (Harutyunayan and Maffieito Fereira, 2022).

2.2 Vinogradarska područja u Srbiji

U zavisnosti od geografskih ali i klimatskih uslova možemo reći da je teritorija Srbije podeljena na 3 regiona: Vojvodinu, Centralnu Srbiju i Kosovo i Metohiju. U okviru njih postoji 77 vinogorja, a izdvojena su i uža područja u okviru vinogorja (Simonović i sar., 2019).

Teritorija Srbije je bogata brdskim terenima koji su uglavnom izloženi suncu tokom cele godine i zbog toga su veoma pogodni za gajenje vinove loze. Grožđe sa ovih terena je odličnog kvaliteta (Simonović i sar., 2019).

Proizvodnja vina na teritoriji Srbije ima veoma bogatu tradiciju i može se reći da srpska vina ne zaostaju po kvalitetu za mnogim francuskim, italijanskim, španskim vinima i vinima mnogih drugih renomiranih proizvođača iz drugih zemalja u svetu (Simonović i sar., 2019).

Vinogradski region Vojvodina obuhvata sledeće rejone, odnosno vinogorja:

1. Subotički rejon (3 vinogorja)
2. Rejon Telečka (3 vinogorja)
3. Banatski rejon (2 vinogorja)
4. Potiski rejon (3 vinogorja)
5. Bački rejon (1 vinogorje)
6. Južnobanatski rejon (3 vinogorja)
7. Sremski rejon (1 vinogorje)

Vinogradski region Centralna Srbija uključuje trinaest rejona i to:

1. Beogradski rejon (5 vinogorja)
2. Šumadijski rejon (4 vinogorja)
3. Rejon Tri Morave (9 vinogorja)
4. Mlavski rejon (3 vinogorja)
5. Rejon Negotinska krajina (5 vinogorja)
6. Knjaževački rejon (4 vinogorja)
7. Pocersko-valjevski rejon (3 vinogorja)
8. Čačansko-kraljevački rejon (2 vinogorja)
9. Niški rejon (6 vinogorja)
10. Toplički rejon (3 vinogorja)
11. Nišavski rejon (3 vinogorja)
12. Leskovački rejon (4 vinogorja)
13. Vranjski rejon (3 vinogorja)

Vinogradski region Kosovo i Metohija obuhvata:

1. Severnometohijski rejon (2 vinogorja) i
2. Južnometohijski rejon (5 vinogorja) (Ivanišević i Jaksić, 2018).

2.3 Hemijski sastav vina

Vino se sastoji najvećim delom od vode (70 - 90%) pored ostalih isparljivih i neisparljivih jedinjenja. Najvažniji sastojci grožđa i vina su: šećeri (ugljeni hidrati), organske kiseline, bojene i taninske supstance i drugi (Malićanin, 2022).

Ugljeni hidrati su primarni metaboliti koje biljke koriste u procesu disanja i kao gradivni materijal za strukturu ćelijskog zida. Sintetišu se tokom fotosinteze i njihov sadržaj se povećava kako plodovi sazrevaju. Glavni ugljeni hidrati u grožđu su glukoza i fruktoza, redukujući šećeri koji se u grožđu nalaze skoro u jednakim koncentracijama (Jakobova i sar., 2021).

Organske kiseline značajno doprinose stabilnosti, sastavu i senzorskim svojstvima vina. Glavne kiseline u vinima su vinska, jabučna, limunska i sirćetna kiselina. Vinska kiselina je dominantna, ima glavnu ulogu u stabilnosti, boji i ukusu vina (Jakobova i sar., 2021).

Fenolna jedinjenja doprinose boji, osećaju u ustima, oporosti i gorčini vina. Važan su hemijski parametar koji određuje kvalitet vina. Ove fitohemikalije u vino dospevaju iz različitih delova grožđa. Iz pokožice u vino prelaze fenolne kiseline, njihovi estri, antocijani, proantocijanidini i flavonoli. Određene količine fenolnih kiselina, njihovih estara i aldehida, u vino dospevaju i iz mezokarpa, dok se iz semenki ekstrahuju uglavnom tanini, galna kiselina i flavan-3-oli. Tokom proizvodnje i starenja vina takođe dolazi i do formiranja novih polifenolnih jedinjenja (Jakobova i sar., 2021; Sredojević, 2018).

Azotna jedinjenja vrlo često su prisutna u vinu i potiču od nitrata, amonijaka ili uree koji se koristi tokom uzgoja vinove loze. Ova jedinjenja neophodna su za proces proizvodnje vina, metabolizam kvasca i efikasnu fermentaciju. Od amino-kiselina, prolin se nalazi u najvećoj koncentraciji u vinima, jer kvasci ne koriste ovu amino-kiselinu. Arginin je takođe prisutan u velikoj koncentraciji u moštu (zgnječeni sok od grožđa koji se daljom fermentacijom koristi za proizvodnju vina), ali ne i u vinima, jer ga konzumira kvasac (Nemzer i sar., 2021).

Na sastav **mineralnih supstanci** u vinima utiču brojni faktori, kao što su sirovina (voće), primenjeni tehnološki procesi, fermentacija, flaširanje, način skladištenja. Preovlađujući

mineral u svim voćnim vinima jeste K koji čini više od 50% prisutnih minerala (Velić et al, 2018).

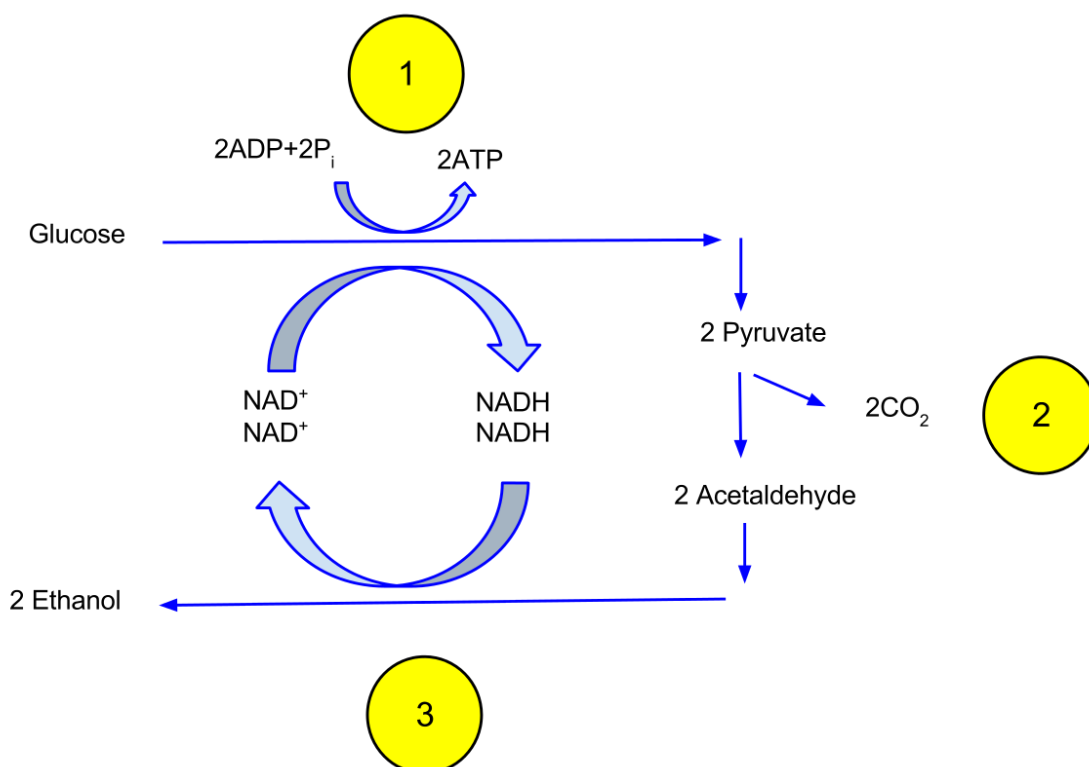
Enzimi su biološki katalizatori koji se koriste u proizvodnji vina zbog pozitivnog dejstva na krajnji kvalitet proizvedenog vina (Scuturašu i sar., 2019). Najčešće korišćeni enzimi koje proizvodi kvasac i koji ubrzavaju procese proizvodnje vina su pektinaze, proteaze i glikozidaze pomoću kojih se dobijaju aromatičnija vina. Pektolitički enzimi imaju sposobnost da hidrolizuju dugačke lance pektina u kraće i rastvorljivije segmente lanaca, doprinoseći bistrenju mošta (olakšavajući filtriranje dobijenog vina), efikasnijoj ekstrakciji jedinjenja koja utiču na boju i aromu vina. Glikozidaze su enzimi koji imaju sposobnost da hidrolizuju glikozidnu vezu i oslobađaju prekursore aromatičnih jedinjenja koji će kasnije tokom fermentacije doprineti aromi vina (Scuturašu i sar., 2019; Mojsov i sar., 2015).

2.4 Alkoholna fermentacija, dobijanje crvenih i belih vina (osnovni pojmovi)

Alkoholna fermentacija predstavlja jednu od najvažnijih faza u procesu proizvodnje vina, a počinje odmah posle muljanja grožđa i ceđenja šire. Kvasci alkoholne fermentacije koji se nalaze na pokožici bobica grožđa prelaskom u širu počinju intenzivno da se razmnožavaju i razlažu šećer do etanola i ugljen-dioksida. Pored etanola i ugljen-dioksida kao glavnih produkata alkoholne fermentacije, stvara se i čitav niz drugih jedinjenja kao što su glicerol, sirćetna kiselina, ćilibarna kiselina, diacetil, aceton, 2,3-butandiol, viši alkoholi i estri. U toku alkoholne fermentacije izdvaja se i određena količina energije u vidu toplote koju kvasci delimično koriste za svoje životne potrebe (Lakićević, 2020).

Saccharomyces cerevisiae je kvasac koji se dominantno koristi zbog veće otpornosti na visoke koncentracije etanola, dok kvasci kao što su *Schizosaccharomyces*, *Zigosaccharomyces* i *Bretanomyces* takođe mogu biti prisutni tokom alkoholne fermentacije i u daljem toku fermentacije, što može uticati na negativne senzorske karakteristike vina.

Alkoholna fermentacija je biohemijski proces pri kojem se šećer razlaže u anaerobnim uslovima bez prisustva kiseonika u živoj ćeliji kvasca. U anaerobnim uslovima transformacija šećera ne ide do kraja, već do formiranja etanola i ugljen-dioksida uz oslobađanje 40 kcal/mol (Slika 2). Ovaj proces nije ekonomičan kao disanje, pa kvasci da bi obezbedili dovoljnu količinu energije moraju fermentisati veliku količinu šećera, što je od velikog praktičnog značaja (Lakićević, 2020).



Slika 2: Šematski prikaz fermentacije pri čemu nastaje etanol, Fermentacija (Etanol) izvor Wikipedia, https://sr.wikipedia.org/sr/Fermentacija_%28etanol%29.

Na osnovu boje, vina se mogu klasifikovati na: crvena vina, bela vina i ružičasta ili roze vina, dok se vinske sorte u odnosu na kvalitet vina koja daju mogu podeliti u tri grupe: sorte za kvalitetna i visoko kvalitetna vina, sorte za kvalitetna bela vina i sorte za stona vina (Nemzer i sar., 2021; Malićanin, 2022).

Parametri kvalitetnih vina su: sorte karakteristike, kompleksnost, izražajnost aroma, izbalansiranost i autentičnost porekla (Mijatović, 2019).

2.5 Autentičnost vina

Falsifikovanje hrane i pića je sve veći globalni problem. Autentičnost predstavlja važan parametar kvaliteta i bezbednosti hrane i pića (Smajlović, 2019; Dordevic i sar., 2013; Kercher Mallman i sar., 2022).

Autentičnost i komercijalna vrednost vina se često povezuju sa geografskim poreklom, a neke zemlje ili regioni su poznati po proizvodnji kvalitetnih vina visoke komercijalne vrednosti.

Vino je proizvod koji se često falsifikuje dodavanjem šećera i/ili vode, kao i kroz namerno pogrešno obeležavanje porekla radi sticanja ekonomske dobiti. Dodavanje česemske vode, dodavanje stranih supstanci, poput kiselina ili čak korišćenje jeftinijih vina ili dodavanje vina od drugog voća i razblaživanje vodom, smatra se nedozvoljenim radnjama, odnosno krivotvorenjem (falsifikovanjem) vina (Leder i sar., 2021; Kercher Mallman i sar., 2022).

Dodavanje šećera u mošt od grožđa pre ili tokom alkoholne fermentacije može biti dozvoljeno ali samo za određene vinorodne regije i berbe koje pate od nedostatka sunčanih sati tokom perioda sazrevanja grožđa što dovodi do niskog sadržaja šećera.

Vino je nestabilno bez određenog sadržaja alkohola, a dodatak šećera pre fermentacije može biti od vitalnog značaja za stabilnost vina. Međunarodna organizacija za vinovu lozu (OIV, <https://www.oiv.int/>) predložila je izotopske analize za otkrivanje dodavanja vode vinima i derivatima. Prisustvo vode u vinu ne predstavlja zdravstveni problem ali, ako nije deklarirano, okarakterisano je kao prevara potrošača u vinskom sektoru.

Usvajanje analitičkih metoda, po mogućnosti standardizovanih ili harmonizovanih, se pokazalo kao najefikasniji način za sprečavanje falsifikovanja voćnih sokova i vina.

Na osnovu pripreme uzoraka i analitičke tehnike koja se koristi u proceni autentičnosti hrane i pića, analitičke metode mogu se klasifikovati u dve glavne kategorije - destruktivne i nedestruktivne tehnike.

Prateći ove glavne kategorije kao najčešće primenjena destruktivna tehnika koja se široko primenjuje za otkrivanje falsifikovanja vina je analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika, vodonika i kiseonika (Mac i sar., 2023).

Merenje $\delta^{18}\text{O}$ vinske vode pomoću masene spektrometrije odnosa izotopa (*Isotope-ratio mass spectrometry*, IRMS metoda) i D-H nuklearna magnetna rezonancija za merenje D u vinskom etanolu su postale zvanične analitičke metode u autentifikaciji vina i proceni falsifikovanja voćnih sokova i vina (Wang i sar., 2021).

Pored analize izotopa, najčešće korišćenje destruktivne tehnike obuhvataju fizičko-hemijske metode, elementalne analize (određivanje mako- i mikroelemenata), hromatografske tehnike (metode gasne i tečne hromatografije sa različitim vrstama detekcije) i tehnike zasnovane na DNK analizama.

Nedestruktivne tehnike koje su istraživači razvili kako bi prevazišli ograničenja destruktivnih tehnika (dugotrajna analitička procedura koja je složena i nekompatibilna u kontroli kvaliteta usled tretmana uzoraka pre analize, nestabilnost nekih markerskih jedinjenja, kao što su fenolna jedinjenja ili DNK) su raznovrsne i obuhvataju: spektroskopske tehnike (IR spektroskopska tehnika, Ramanova spektroskopija), elektronske tehnike (elektronski jezik, E-jezik i elektronski nos, E-nos) i tehnike zasnovane na slikama, odnosno njihovoj obradi (digitalna analiza slike i snimanje povratnog rasejanja svetlosti) (Mac i sar., 2023). Nedestruktivne tehnike ne zahtevaju gotovo nikakvu pripremu uzoraka čime se postiže lakoća upotrebe, smanjeni troškovi analize, visoka prenosivost i nema potrebe za reagensima (Mac i sar., 2023).

Pored sofisticiranih analitičkih za ocenu autentičnosti vina neophodne su i moderne statističke, odnosno hemometrijske tehnike kako bi se iz dobijenih rezultata izvuklo što je moguće više informacija.

2.6 IRMS metoda i instrumenti

2.6.1 Stabilni izotopi

Izotopi su dva ili više oblika istog elementa sa istim brojem protona, a različitim brojem neutrona. Mogu postojati u obe stabilne i nestabilne forme. Stabilni izotopi se razlikuju po masi. Gotovo svi prirodni elementi na Zemlji su stabilni izotopi. Oni se ne raspadaju, za razliku od radioaktivnih izotopa koji nisu stabilni i podležu radioaktivnom raspadu (Simonova and Kalashikova, 2019; Meier Augenstein and Kemp, 2012).

Najčešći stabilni izotopi koji se razmatraju u naukama o biljkama i životnoj sredini su oni koji uključuju elemente C, H, O i N.

Kiseonik ima tri stabilna izotopa sa prirodnom zastupljenošću za svaki izotop od: ^{16}O (99,75%), ^{17}O (0,018%) i ^{18}O (0,205%) (Santesteban i sar., 2014).

Rezultati merenja zastupljenosti stabilnih izotopa izražavaju se pomoću δ vrednosti koja predstavlja relativnu razliku mera zastupljenosti težeg i lakšeg izotopa u uzorku (R_{uzorka}) i standardu ($R_{\text{standaarda}}$), a računa se prema formuli:

$$\delta \text{ (‰)} = \frac{R_{\text{uzorka}}}{R_{\text{standaarda}}} - 1$$

U slučaju H_2 i O_2 δ vrednosti se označavaju sa $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$, a odgovarajući izotopski odnosi su $^2\text{H}/^1\text{H}$ i $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Pozitivnu δ vrednost imaju uzorci sa većom zastupljenošću težeg izotopa u odnosu na standarde i za takve uzorke se kaže da su „teži” u odnosu na standarde. Negativnu δ vrednost imaju uzorci kod kojih je zastupljenost „težeg” izotopa manja u odnosu na standarde i za takve uzorke se kaže da su „lakši” u odnosu na standarde.

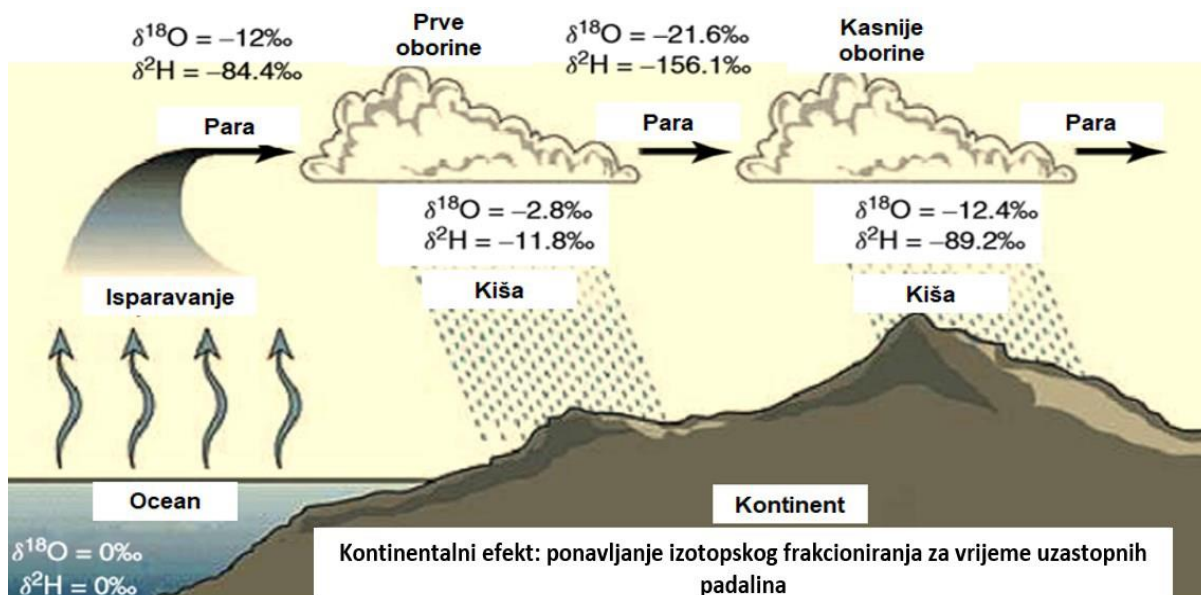
Međunarodni standard prema kojem se izražavaju $\delta^2\text{H}$ i $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti u vodi je VSMOW2 (eng. *Vienna Standard Mean Ocean Water*) koji predstavlja δ vrednost okeanske vode (najvećeg vodenog tela na Zemlji) a njegove vrednosti iznose 0‰ za H_2 i O_2 (Saratlija, 2020). Kako se izotopi razlikuju u masi, dolazi do bitne razlike u energiji veze.

Razlika između izotopskog sastava početnog i krajnjeg proizvoda neke reakcije zove se frakcionizacija (Saratlija, 2020). Frakcionizacija se može dogoditi kao posledica promene jednog stanja u drugo, npr. promena iz CO₂ u biljni organski ugljenik. U procesu fotosinteze biljka uzima iz atmosferskog CO₂ pretežno lakši molekul ¹²CO₂, te kao posledicu biljke sadrže više „lakšeg“ ugljenika nego atmosfera ($\delta^{13}\text{C}$ vrednost za atmosferski CO₂ je -8‰, a u biljkama oko -25‰).

Frakcionisanje se može manifestovati i kao razlika u izotopskom sastavu između dva jedinjenja koja su u hemijskoj ili fizičkoj ravnoteži. Razlike u hemijskim i fizičkim svojstvima izotopskih jedinjenja uslovljene su razlikom u masi atomskih jezgara, a posledice te razlike su da teži izotopi imaju manju pokretljivost i veću energiju vezivanja (Bilic Rajs,2019).

Procesi izotopskog frakcionisanja odvijaju se priridno tokom ciklusa formiranja pare, kondenzacije pare i transporta vode. Do izotopskog frakcionisanja dolazi usled zagrevanja, a obim ovog frakcionisanja zavisi od faktora kao što su: relativna vlažnost, brzina vetra, pritisak, padavine i temperatura. Odnos izotopa u padavinama je rezultat uticaja klime i geografskog položaja (KercherMallman i sar.,2022;Horacek i sar.,2021).

Prilikom promene faze, tj. isparavanja iz okeana i kondenzacije u oblacima događa se najznačajnija izotopska frakcionizacija (*Slika 3*). Vodena para koja isparava sa površine okeana je izotopski osiromašena u odnosu na vodu iz koje potiče, dakle imaće negativne δ vrednosti. Ovo izotopsko frakcionisanje zavisi od temperature, sa jakim frakcionisanjem na niskim temperaturama i slabijim frakcionisanjem na povišenim temperaturama (temperaturni efekat). Vodena para migrira u oblake i postaje sukcesivno sve više i više osiromašena u težim izotopima ²H i ¹⁸O (kontinentalni efekat) kao teški O₂, a izotopi H₂ prvenstveno ulaze u tečnu fazu (sneg, kiša) i na taj način se uklanjaju iz oblaka. Ovaj fenomen se koristi u određivanju geografskog porekla proizvoda pomoću stabilnih izotopa (Horacek i sar., 2021; Bilić Rajs, 2019).



Slika 3: Izotopsko frakcioniranje tokom formiranja oblaka i kasnijih padavina (Bilić Rajs, 2019).

Analiza stabilnih izotopa je primenjena u brojnim studijama sa ciljem da se utvrdi geografsko poreklo vina, jer ono ima fundamentalan uticaj na profil i kvalitet vina (Griboff i sar., 2021). Obrasci stabilnih izotopa i izotopske zastupljenosti posebno za ^2H , ^{18}O i ^{13}C u vodi i etanolu vina, kontrolišu se različitim stepenom izotopskog frakcionisanja tokom gajenja grožđa i samim tim karakteristični su za autentična vina. Dakle, ovi stabilni izotopski obrasci mogu da karakterišu: sortu grožđa, način fermentacije, klimatske uslove vezane za geografsko poreklo i godinu berbe (Wang i sar., 2021).

Kako je odnos većine izotopa biogenih elemenata, a posebno biljnih tkiva pod uticajem uslova životne sredine, može se vršiti i kontrola deklarisanog geografskog porekla primenom ovih izotopskih obrazaca. Istraživanje geografskog porekla i izotopskog obrasca je zasnovano na ideji da svaki region ima jedinstvene uslove životne sredine. Stabilna izotopska merenja za kontrolu deklarisanog porekla vina i hrane istražuju odnos izotopa elemenata na koje utiču npr. vremenske prilike i dostupnost vode, udaljenost od mora, nadmorska visina, tlo, prirodne i antropogene pojave (Horacek i sar., 2021).

Jedna od primena određivanja stabilnih izotopa je u analizi autentičnosti hrane. Pomoću IRMS tehnike moguće je otkriti informacije o geografskom, hemijskom i biološkom poreklu supstanci koje se analiziraju. IRMS tehnika primenjuje se u različitim disciplinama počevši od arheologije, medicine, geologije, biologije, forenzike i određivanja autentičnosti hrane.

Dokazivanje autentičnosti hrane obuhvata dokazivanje neusaglašenosti između datog proizvoda i opisa na deklaraciji, kao npr. pogrešno označenog botaničkog ili geografskog porekla, zamene sličnim, ali jeftinijim sastojkom, izvođenja nedeklarisanih procesa pri preradi hrane, korišćenje nedozvoljenih sastojaka hrane itd. Neki od proizvoda koji se najčešće falsifikuju su vino, sir, prirodni sokovi, med i maslinovo ulje. Osim za dokazivanje autentičnosti u pogledu geografskog porekla, odnos stabilnih izotopa u vinima može se koristiti i kao pokazatelj falsifikovanja dodatkom šećera i vode preko $\delta^{13}\text{C}$ u etanolu i $\delta^{18}\text{O}$ u vodi (Bilić Rajs, 2019).

2.6.2 Masena spektrometrija odnosa izotopa

IRMS je jedna od metoda za određivanje koncentracije lakih elemenata (C, H, O i N) i njihovog izotopskog sastava u prirodnim objektima. Jedna od glavnih IRMS primena je određivanje geografskog, hemijskog i biološkog porekla supstance (Simonova i Kalashikova, 2019). Masena spektrometrija odnosa izotopa je tehnika sa primenama u brojnim oblastima: nauci o hrani, paleontologiji, forenzičkoj nauci, nauci o životnoj sredini i medicini. IRMS analize se koriste za izotopsko profilisanje proizvoda u istraživanjima falsifikovanja hrane, praćenja geografskog porekla i potvrđivanje organskog statusa. Ova tehnika je efikasna jer izotopski profil biljnog materijala je pod velikim uticajem okruženja u kojem je biljka rasla (klimatski faktori, nadmorska visina i geografska širina, postupci gajenja, itd.) (Giannioti i sar., 2024).

IRMS metodom je moguće ostvariti potrebnu konverziju uzoraka u gasove povezivanjem masenog spektrometra odnosa izotopa sa ulaznim sistemom koji se naziva elementalni analizator (EA). EA-IRMS obezbeđuje nižu cenu i visoku propusnost analiza. Za $\delta^{18}\text{O}$ analizu i $\delta^2\text{H}$ analizu kiseonik i vodonik iz uzorka se konvertuju u ugljen-dioksid i vodonik, koji se potom odvajaju u gasno-hromatografskoj koloni.

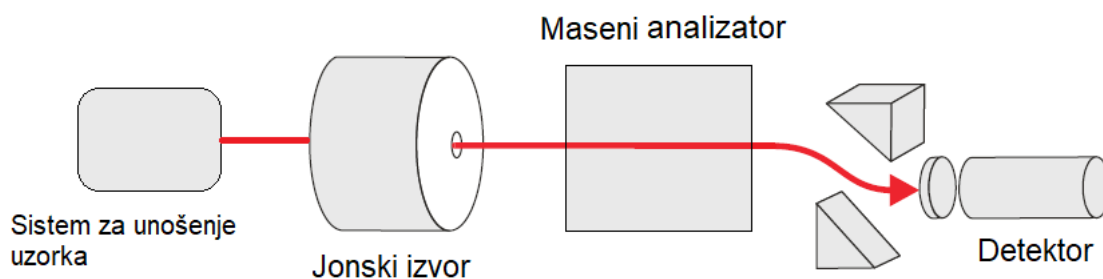
Alternativni metod uvođenja uzoraka uključuje sprezanje (kuplovanje) gasnog ili tečnog hromatografa na IRMS (GC-IRMS ili LC-IRMS) (Giannioti i sar., 2024).

Masena spektrometrija koristi se za:

- određivanje sastava nepoznatog uzorka (kvalitativna analiza)
- određivanje izotopskog sastava uzorka
- određivanje strukture molekula posmatrajući fragmentaciju molekula
- određivanje molarne mase molekula
- određivanje količine određene supstance u uzorku (kvantitativna analiza)
- određivanje fizičkih i hemijskih svojstava supstanci
- proučavanje ponašanja jona u vakumu (Saratlija, 2020).

Masenom spektrometrijom odnosa izotopa (*Isotope-Ratio Mass Spectrometry*, IRMS) može se izmeriti odnos izotopa uzorka u odnosu na standard. Postoje dve osnovne IRMS metode: metoda dvostrukog ulaza DI-IRMS (*Dual-inlet Isotope Ratio Mass Spectrometry*), koja je preciznija, i sastav kontinuiranog protoka CF-IRMS (*Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry*) koja omogućava unos višekomponentnih uzoraka (Kreč, 2021).

Uređaj koji radi na principu masene spektrometrije naziva se maseni spektrometar. Sastoji se od četiri osnovna dela (*Slika 4*): sistema za unošenje uzorka, jonskog izvora koji stvara i ubrzava jone u električnom polju, masenog analizatora koji razdvaja putanje jona zavisno o odnosima njihove mase i naelektrisanja i detektora u kojem se skupljaju i karakterišu razdvojeni joni (Mitrović, 2021).



Slika 4: Komponente masenog spektrometra (Mitrović, 2021).

Sastav stabilnog izotopa kiseonika obično se može meriti pomoću EA-IRMS sistema.

Sastav izotopa kiseonika definisan je kao:

$$\delta^{18}O = \left[\frac{\left(\frac{18O}{16O}\right)_{uzorka} - \left(\frac{18O}{16O}\right)_{standarda}}{\left(\frac{18O}{16O}\right)_{standarda}} \right] \times 1000 [‰]$$

Rezultat se odnosi na odgovarajući međunarodni referentni materijal (Simonova and Kalashikova, 2019).

Odnosi zastupljenosti izotopa u gasovima mere se IRMS uređajima pa se tako $^2\text{H}/^1\text{H}$ meri u vodoniku, a $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ u CO_2 . Zbog toga je pre merenja tečni uzorak neophodno prevesti u odgovarajući gas. Pomoću odgovarajućih metoda i perifernih jedinica u sprezi sa IRMS aparaturom dobijaju se gasovi čiji izotopski sastav odgovara izotopskom sastavu rastvora čije se δ vrednosti žele odrediti. Dobijeni gasovi se na taj način uvode u jonski izvor IRMS-a u kojem se neutralni molekuli gasa sudaraju sa termionskim elektronima. Tako nastali joni se ubrzavaju te se usmeravaju u magnetni analizator sistemom elektrostatičkih sočiva. U zavisnosti od odnosa mase i naelektrisanja joni se u magnetnom analizatoru razdvajaju prema njihovim (m/z) vrednostima. Istovremeno merenjem razdvojenih jonskih struja određuje se odnos izotopa (npr. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) a iz njega i odgovarajuća δ vrednost kao (npr. $\delta^{18}\text{O}$) (Saratlija, 2020).

GasBench II je interfejs kontinuiranog protoka sa autosemplerom potpomognutim injekcionom petljom u kojem je preciznost postignuta sa dvostrukim dovodnim sistemom i realizovan tehnikom kontinuiranog protoka (Hikert and Avak, 2016). GasBench II je inovativno rešenje za visoko precizno određivanje izotopa i molekulskog odnosa uzoraka uključujući ekvilibraciju vode, karbonate i atmosfere gasove (CO_2 , O_2 , H_2). Preciznost i tačnost ulaznog sistema sa dvostrukim dovodnim sistemom se postižu koristeći savremene tehnike kontinuiranog protoka. Ovaj interfejs nije samo alternativna tehnika dvostrukog ulaznog sistema već značajno proširuje praksu masene spektrometrije odnosa izotopa (Hikert and Avak, 2016).

Pripremanje uzoraka se vrši na sledeći način (šematski prikaz):

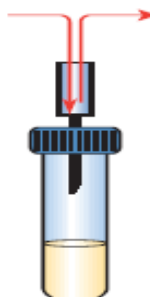
1. **500 μL vodenog uzorka**



1. Injektovanje 500 μL uzorka pomoću
He/ CO_2

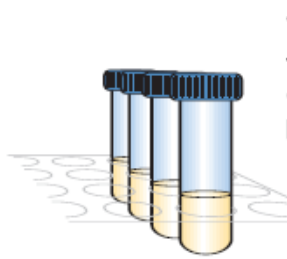
šprica od 1ml

2. **1% CO_2 u helijumu**



2. Ispiranje unutrašnjosti sa smešom

3. **^{18}O transfer iz vode u CO_2 na površini**

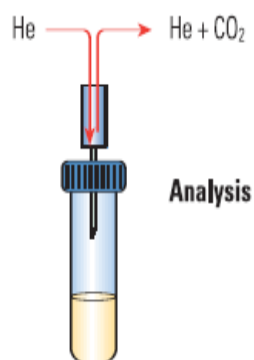


3. Pomeranje svih viala sa uzorcima u kasetu

autosemplera sa stabilizovanom

temperaturom, uravnotežavanje 24 h na 24 $^{\circ}\text{C}$

4.



4. Početak akvizicije sekvenci

U uravnotežavanju sistema CO_2 –voda, mala količina CO_2 koja je dospela u prostor između poklopca i uzorka viala je izotopski u ravnoteži sa vodom zahvaćenom u tečnom uzorku. Veoma mala količina CO_2 koja se nalazi u ovom prostoru obezbeđuje kompletan prenos ^{18}O informacija tokom uravnotežavanja (Hikert and Avak , 2016).

Princip rada na gasbenču je sledeći: Nakon dodavanja 500 μL uzorka u otvorene bočice pomoću šprica za jednokratnu upotrebu, bočice se zapečate novim septama. Preostali vazduh iz bočica se uklanja pomoću automatizovanog postupka ispiranja koji koristi smešu od 0,3% do 0,5% CO_2 u He. Ispiranje se vrši pri protoku od 100mL/min u toku pet minuta sa 0,3% do 0,5% CO_2 u spiranju mlaza He korišćenog kao gas za ravnotežu. Merenje se vrši nakon merenja ekvibracije od 24h na 24°C. Temperaturna stabilnost potrebna za $\delta^{18}\text{O}$ ekvibraciju je $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Pomoću He uzorak se pomera kroz vodenu zamku ispunjavajući petlju uzorka i ostavljajući je otvorenom. Vodena para se kvantitativno uklanja iz gasnog toka. Petlja za uzorkovanje daje alikvote od 100 μL uzorka u izotermni gasni hromatograf, gde je CO_2 odvojen od bilo koje vrste gasa. Upotreba ponavljajuće injekcione petlje omogućava da se preciznost približi onoj koja je uporediva sa sistemom sa dvostrukim dovodom (Hikret and Avak, 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Priprema uzoraka vina za analizu

Za ispitivanja u okviru ovog rada prikupljeno je 55 uzoraka vina iz tri sukcesivne godine berbe grožđa (Tabele 1, 2 i 3). Analizirani su uzorci belih i crnih sorti vinove loze, odnosno bela i crvena vina, iz različitih regiona Srbije. Do analize (destilacije), uzorci vina u dobro zatvorenim staklenim bocama čuvani su u prostorijama Hemijskog fakulteta na hladnom i tamnom mestu.

Za potrebe analize uzeto je 0,5 L vina, od kojeg je zatim na aparaturi za destilaciju predestilovan etanol. Ostatak nakon destilacije (vinska voda) uzet je za dalju analizu.

3.2 Priprema uzoraka vina za određivanje odnosa $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

Analize uzoraka vinske vode nakon destilacije su urađene protočnom tehnikom na GasBencII interfejsu sa autosemplerom povezanim sa Delta V Advantage masenim spektrometrom.

$\delta^{18}\text{O}$ merenja iz vina i ostataka koji je ostao posle destilacije ne mogu se izvoditi na tačnom uzorku, jer imaju korozivno dejstvo unutar metalne strane spektrometra. Zbog toga se u spektrometar uvodi gas CO_2 . Najjednostavniji metod koji se koristi za pripremu uzoraka za ^{18}O izotopske analize je izotopska ravnoteža $\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2$ primenjena u uzorcima vina ostataka nakon destilacije vina. Balansiranje se vrši između vina i CO_2 . Metoda se zasniva na reakciji između vode iz vina i ostataka nakon destilacije i ugljen-dioksida, pri čemu nastaje ugljena kiselina. Ugljena kiselina je nestabilna i ponovo se razgrađuje na ugljen-dioksid i vodu. U sistemu $\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2$ postoje O-C veze koje pokazuju mogućnost izmene izotopskog sastava kiseonika iz vode od interesa i ugljen-dioksida. Izotopske koncentracije za prirodne varijacije izotopa se ne izražavaju apsolutnim odnosima nego relativnim varijacijama δ (‰, u promilima). Pozitivne vrednosti ukazuju na bogatije prisustvo u težem izotopu iz uzorka, u poređenju sa referentnim standardom, dok negativne vrednosti ukazuju na smanjenje u težem izotopu iz uzorka (Niculaua i sar., 2006).

U izotopskim analizama vode koje su sprovedene masenom spektrometrijom u okviru ovog rada korišćen je sledeći referentni, međunarodni standard: SMOW (Standard Mean Ocean Water) for $^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = (1993,4 \pm 2,5) \times 10^{-6}$ (Niculauai sar, 2006).

Tabela 1: $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti crvenih i belih vina, iz berbe 2012. godine.

		Vrsta vina	Godina berbe grožđa	Rejon podrejon	Vinogorje	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	SD	Mesto
<i>Crne sorte vinove loze</i>	1	<i>Kaberne sovinjon</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	8,00	0,14	Radmilovac
	2	<i>Merlo</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	5,15	0,02	Radmilovac
	3	<i>Kaberne fran</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	6,90	0,24	Radmilovac
	4	<i>Prokupac</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	7,74	0,04	Radmilovac
	5	<i>Burgundac</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	6,41	0,05	Radmilovac
	6	<i>Širaz</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	4,66	0,03	Radmilovac
	7	<i>Sandoveze</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	4,57	0,07	Radmilovac
	8	<i>Burgundac</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	6,94	0,04	Radmilovac
<i>Bele sorte vinove loze</i>	9	<i>Šardone</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	5,36	0,18	Radmilovac
	10	<i>Rizling italijanski</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	5,86	0,11	Radmilovac
	11	<i>Rizling rajnski</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	2,74	0,13	Radmilovac
	12	<i>Sovinjon beli</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	6,42	0,07	Radmilovac
	13	<i>Sivi Burgundi</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	6,63	0,02	Radmilovac
	14	<i>Petra</i>	2012	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	5,14	0,04	Radmilovac

Tabela 2: $\delta^{18}O$ vrednosti crvenih i belih vina, iz berbe 2013. godine.

	Vrsta vina	Godina berbe grožđa	Rejon podrejon	Vinogorje	$\delta^{18}O$ (‰)	SD	Mesto	
<i>Crne sorte vinove loze</i>	1	<i>Kaberne sovinjon</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,14	0,01	Radmilovac
	2	<i>Merlo</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	1,28	0,13	Radmilovac
	3	<i>Merlo</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,88	0,05	Radmilovac
	4	<i>Merlo022</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	1,36	0,12	Radmilovac
	5	<i>Kaberne fran</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-1,07	0,00	Radmilovac
	6	<i>Kaberne fran standard</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,20	0,14	Radmilovac
	7	<i>Kaberne fran02</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,17	0,14	Radmilovac
	8	<i>Burgundac</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	1,66	0,05	Radmilovac
	9	<i>Crveno 20</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,18	0,01	
	10	<i>Crveno 30</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,16	0,19	
	11	<i>Crveno 40</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,06	0,03	
	12	<i>Crveno 50</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,20	0,05	
	13	<i>Kontrola Crveno</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,46	0,12	

Bele sorte vinove loze	14	<i>Šardone</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	2,19	0,08	Radmilovac
	15	<i>Rizling italijanski</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,87	0,09	Radmilovac
	16	<i>Rizling rajnski</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,13	0,08	Radmilovac
	17	<i>Sovinjon beli</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	2,36	0,08	Radmilovac
	18	<i>Belo 20</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,61	0,099 74	
	19	<i>Belo 30</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,60	0,04	
	20	<i>Belo 40</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,24	0,045 191	
	21	<i>Belo 50</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,33	0,09	
	22	<i>Kontrola Belo</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,44	0,06	
	23	<i>Veštačko Belo</i>	2013	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-9,59	0,04	

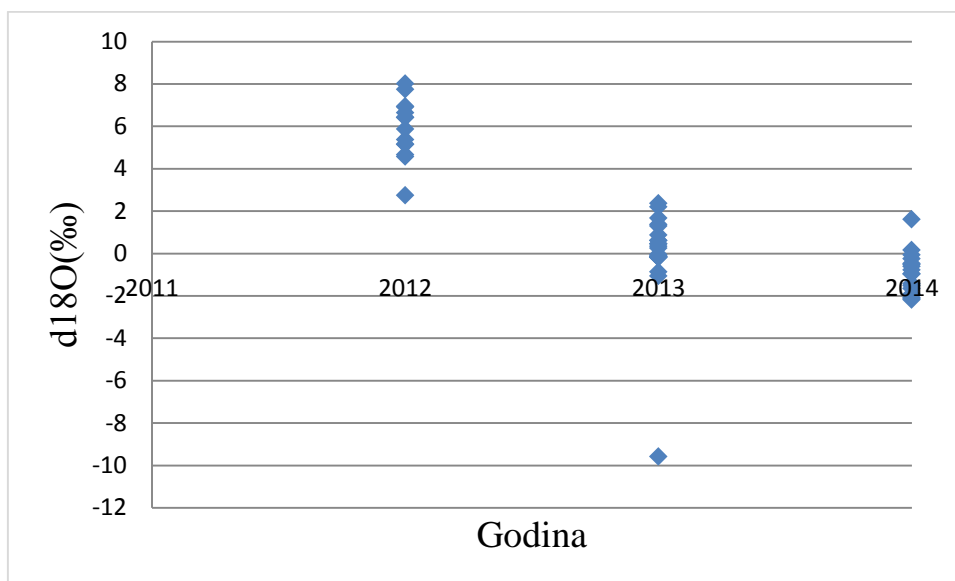
Tabela 3: $\delta^{18}O$ vrednosti crvenih i belih vina, iz berbe 2014. godine.

		Vrsta vina	Godina berbe grožđa	Rejon podrejon	Vinogorje	$\delta^{18}O$ (‰)	SD	Mesto
<i>Crne sorte vinove loze</i>	1	<i>Kaberne sovinjon</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	0,15	0,01	Radmilovac
	2	<i>Kaberne sovinjon</i>	2014	Toplički rejon	Prokupačko vinogorje	-0,08	0,09	Blace
	3	<i>Merlo</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,98	0,03	Radmilovac
	4	<i>Kaberne fran</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,78	0,08	Radmilovac
	5	<i>Prokupac</i>	2014	Toplički rejon	Prokupačko vinogorje	-0,62	0,08	Blace
	6	<i>Prokupac I</i>	2014	Vojvodina	Sremsko vinogorje	-0,52	0,09	
	7	<i>Vranac Prokupac</i>	2014	Crna Gora		1,61	0,03	
	8	<i>Burgundac</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-1,43	0,05	Radmilovac
	9	<i>Crna Tamjanika</i>	2014	Toplički rejon	Prokupačko vinogorje	-1,52	0,05	Blace
	10	<i>Jovanovic Rade</i>	2014	Kruševac		-1,66	0,05	
<i>Bele sorte vinove loze</i>	11	<i>Šardone</i>	2014	Toplički rejon	Prokupačko vinogorje	-2,08	0,06	Blace
	12	<i>Šardone</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,25	0,07	Radmilovac
	13	<i>Rizling rajnski</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-2,19	0,16	Radmilovac
	14	<i>Sovinjon beli</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-0,48	0,08	Radmilovac
	15	<i>Plovdina</i>	2014	Rejon Tri Morave	Trsteničko vinogorje	-2,12	0,06	Aleksandrovac
	16	<i>Smederevka</i>	2014	Beogradski rejon	Gročansko vinogorje	-1,95	0,07	Radmilovac
	17	<i>Bela Tamjanika</i>	2014	Rejon Tri Morave	Trsteničko vinogorje	-1,93	0,08	Aleksandrovac
	18	<i>Kreaca</i>	2014	Južnobanatski vinogradski rejon	Vršачko vinogorje	-0,96	0,07	Vršac

4. REZULTATI i DISKUSIJA

4.1 Prikaz rezultata

Merenje odnosa izotopa $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ je jedna od najvažnijih primena masene spektrometrije odnosa izotopa u kontroli autentičnosti vina. U Tabelama 1 – 3 i na *Slici 5* prikazani su rezultati dobijeni analizom 55 uzoraka vina belih i crnih sorti vinove loze, različitih geografskih lokacija i godina berbe.



Slika 5: Zavisnost $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti u vodi vina od godine berbe.

4.2 Diskusija dobijenih rezultata

Iz berbe 2012. godine analizirano je ukupno 14 uzoraka, od toga 8 crvenih vina i 6 belih vina (*Tabela 1*). Dobijene vrednosti parametra δ su iznosile:

» $\delta^{18}\text{O}$ za crvena vina u opsegu od (4,57‰ do 8,00‰)

» $\delta^{18}\text{O}$ za bela vina u opsegu od (2,74‰ do 6,63‰)

Svih 14 uzoraka imaju pozitivne vrednosti δ (nešto više vrednosti za crvena vina) što znači da svi uzorci obiluju težim izotopom kiseonika.

Godina 2012. je bila sa najmanjom količinom padavina. Godišnje količine padavina iznosile su 563,7 mm, a prosečna vlažnost vazduha je bila 72% sa srednjom godišnjom temperaturom oko 14°C (Šuković, 2017).

Tokom 2013. godine je analizirano ukupno 23 uzorka, od toga 14 crvenih i 9 belih uzoraka vina (*Tabela 2*), a dobijene vrednosti parametra δ su iznosile:

» $\delta^{18}\text{O}$ za crvena vina u osegu od (-1,07‰ do 1,66 ‰).

» $\delta^{18}\text{O}$ za bela vina u osegu od (-9,59‰ do 2,36‰).

Od svih 23 uzorka, 11 uzoraka je imalo negativne vrednosti (negativnije za bela u odnosu na crvena vina), što pokazuje da obiluju lakšim izotopom kiseonika. Izdvaja se vestačko vino čija je $\delta^{18}\text{O}$ vrednost veoma negativna (-9,59‰) što ukazuje da je vino falsifikovano. Ako se izostavi ova vrednost, koja očigledno značajno odstupa od ostalih, $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti za bela vina bile su u opsegu od -0,13‰ do 2,36‰ i nisu međusobno mnogo odstupale.

Ova godina donosi niže vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ (izrazita varijacija) u odnosu na prethodnu godinu, što je povezano sa količinom padavina koja je bila veća (607,1 mm), a time i veća prosečna vlažnost vazduha, dok se temperatura nije bitnije menjala (Šuković, 2017).

Iz 2014. godine ukupno je analizirano 18 uzoraka, od toga 10 crvenih i 8 belih vina čije su δ vrednosti iznosile:

» $\delta^{18}\text{O}$ za crvena vina u ospegu od (-1,66‰ do 1,61‰)

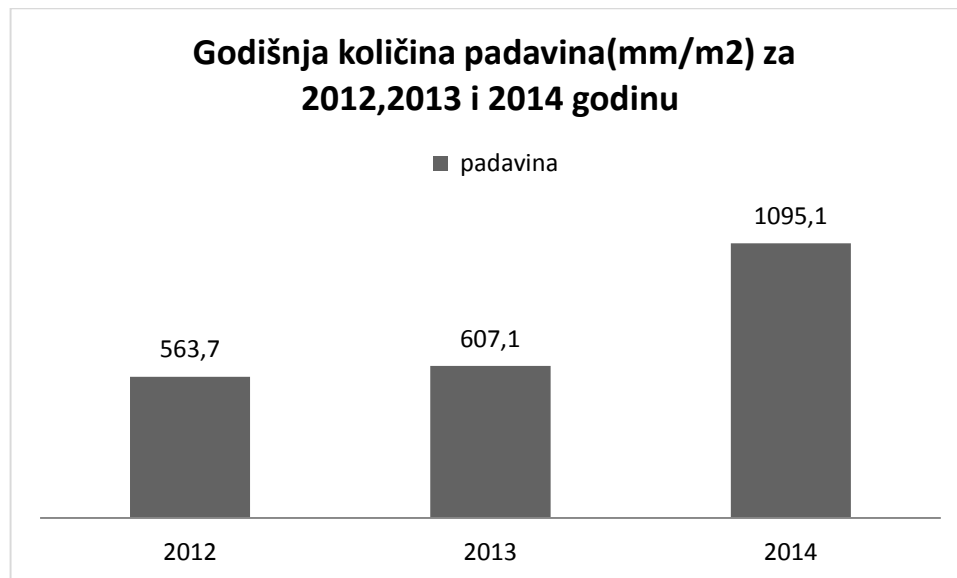
» $\delta^{18}\text{O}$ za bela vina u osegu od (-2,19‰ do -0,48‰).

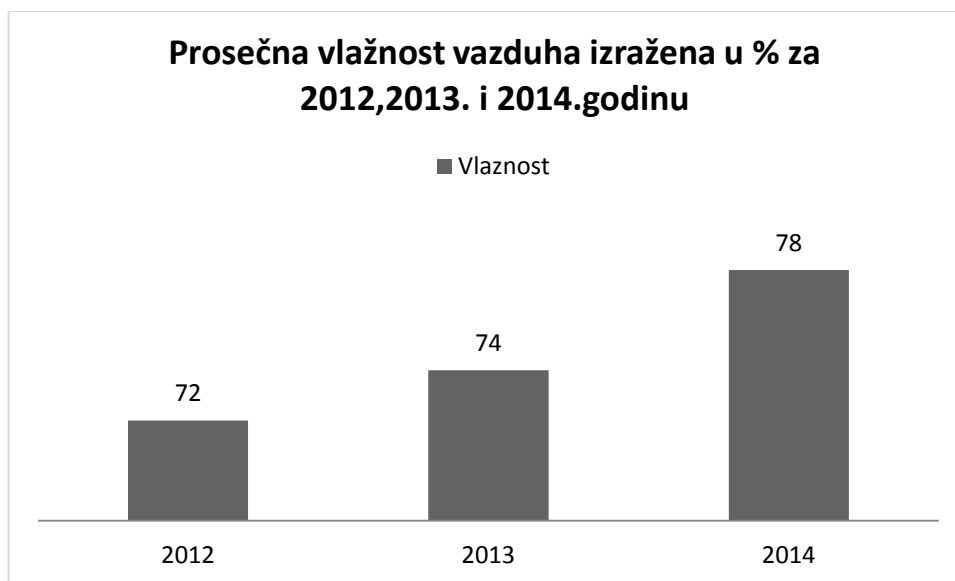
Od svih 18 uzoraka, 2 uzorka imaju pozitivne vrednosti, ostalih 16 uzoraka vina imaju negativne vrednosti za $\delta^{18}\text{O}$ (niže za bela vina) što ukazuje da obiluju lakšim izotopom kiseonika. Ovde imamo uzorke koji potiču iz Beogradskog rejona ali i 4 uzorka koja potiču iz Topličkog rejona, Prokupačko vinogorje, Vojvodina/Sremsko vinogorje, Rejon Tri Morave/Trsteničko vinogorje i Južnobanatski vinogradski rejon/Vršačko vinogorje.

Godina 2014. je bila najkišovitija u odnosu na prethodne dve godine, sa najvećom količinom padavina (1095,1 mm) i samim tim i najvećom prosečnom vlažnosti vazduha i nešto većom temperaturom (Šuković, 2017).

U ovoj godini izdvaja se vino iz Crne Gore koje ima najveću pozitivnu vrednost- $\delta^{18}\text{O}=1,61\text{‰}$.

Date godine berbe u kojima su analizirani uzorci vina ukazuju da postoje varijacije u $\delta^{18}\text{O}$ vrednostima što je objašnjeno klimatskim uslovima. Na $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti najviše utiču prosečne godišnje količine padavina i prosečne godišnje vlažnosti vazduha koje su se menjale iz godine u godinu (*Slika 6*).





Slika 6: Prikaz prosečne godišnje količine padavina u Srbiji izražen u mm/m² i prosečne godišnje vlažnosti vazduha u Srbiji po godinama izražen u %.

Iste sorte grožđa gajene u različitim klimatskim uslovima mogu davati vina različitog kvaliteta:

- U hladnijim uslovima (veća količina padavina, niža temperatura) u bobicama grožđa se tokom sazrevanja sakuplja manje šećera što rezultuje manjim procenom alkohola u vinima, pa su takva vina suva, laganija i kiselkastijeg ukusa.
- U toplijim uslovima (manja količina padavina, viša temperatura) grožđe lakše i brže sazreva, sadrži više šećera, što daje veći procenat alkohola u vinima, tamniju boju i puniji ukus.

Tako je 2012. godina donela velike gubitke srpskoj poljoprivredi, ali je vinarijama pogodovala jer su proizvedena visokokvalitetna vina, dok, sa druge strane, jedna od najlošijih berbi u Srbiji bila je 2014. godine, koja je bila izuzetno topla i kišovita što je pogodovalo razvoju bolesti vinove loze.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata očigledno je odstupanje veštačkog vina iz 2013. godine koje ima izrazito negativnu vrednost $\delta^{18}\text{O}$ što ukazuje da je vino falsifikovano. Takođe, uočeno je odstupanje uzorka vina iz 2014. godine koje potiče sa podneblja Crne Gore i koje ima najveću pozitivnu $\delta^{18}\text{O}$ vrednost. Ovo odstupanje je verovatno posledica uticaja blizine mora, jer na osnovu frakcionizacije, padavine koje sve kasnije padaju na putu od obale preko kontinenta, imaju sve negativnije δ vrednosti.

Kada su u pitanju sorte vina, rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da iste sorte vina imaju različite vrednosti $\delta^{18}\text{O}$, što ukazuje da se za pouzdanu procenu vrednosti $\delta^{18}\text{O}$ vina godina berbe, odnosno klimatski uslovi moraju uzeti u obzir.

Uzimajući u obzir uočene varijacije u $\delta^{18}\text{O}$ vrednostima, može se zaključiti da primenjena IRMS metoda može biti pogodna za procenu autentičnosti vina ali izvođenje pouzdanih zaključaka, odnosno ocena autentičnosti zahteva opsežnija ispitivanja koja bi uključila statistički značajan broj uzoraka za svaku ispitivanu vrstu vina i koja bi uzela u obzir očigledan, veoma izražen uticaj sezonskih varijacija koje su posledica različitih klimatskih uslova.

6. LITERATURA

1. Bilić Rajs B. (2019) *Primjena stabilnih izotopa i mineralnih tvari u određivanju botaničkog i zemljopisnog podrijetla izabranih vrsta hrvatskog meda*. Doktororska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-Tehnološki fakultet, Osijek, Hrvatska.
2. Dordevic N., Camin F., Marianella R.M., Postma G.J., Buydens L., Wehrens R. (2013) *Detecting the addition of sugar and water to wine*: Australian Journal of Grape and Wine Research, 19, 324-330.
3. Giannioti Z., Ogrinc N., Suman M., Camin F., Bontempo L. (2024) *Isotope ratio mass spectrometry methods for distinguishing organic from conventional food products: A review*: Trends in Analytical Chemistry, 170, 1-20.
4. Griboff J., Horacek M., Monferrán V.M. (2021) *Differentiation Between Argentine and Austrian Red and White Wines Based on Isotopic and Multi Elemental Composition*, Frontiers in Sustainable Food Systems, 5, 1-9.
5. Harutyunyan M., Ferreira-Malfeito M. (2022) *The Rise of Wine among Ancient Civilizations across the Mediterranean Basin*: Heritage, 5, 788-812.
6. Hikert W., Avak H. (2016) *Isotope of Fruit Juice and Wine using the Thermo Scientific GasBenchII IRMS*: Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany, 1-4.
7. Horacek M., Kolar K., Hola M., Tobolkova B., Vaculovic T., Philipp C., Marosanovic B., Lojovic M., Belajova E., Dasko L., Jankura E., Eder P. (2019) *Investigation of geographic origin of wine from border regions: Potential limitations and possibilities of different analytical methods and combinations of methods to identify the correct side of the border*: BIO web of Conferences, 12, 1-3.
8. Horacek M., Ogrinc N., Magdas Alina D., Wunderlin D., Sucur S., Maras S., Papesch W. (2021) *Isotope Analysis (^{13}C , ^{18}O) of Wine from Central and Eastern Europe and Argentina, 2008 and 2009 Vintages: Differentiation of Origin, Environmental indications, and Variations Within Countries*: Frontiers in Sustainable Food Systems, 5, 1-10.
9. Introduce to Wine: The ultimate guide (2018), 1-57.
10. Ivanišević D., Jakšić D. (2018) *Vinogradarstvo Srbije kroz statistiku i rejonizaciju*. Rad. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
11. Jakobova S., Fikselová M., Mendelová A., Ševčík M., Jakab I., Aláčová Z., Petropulus Ivanovna V. (2021) *Chemical Composition of White Wines Produced from Different Grape Varieties and Wine Regions in Slovakia*: Applied Sciences, 11, 1-13.
12. Kercher Mallman M., Leonardelli S., Cargnel J.G., Vanderlinde R. (2023) *Determination of exogenous water in grape juice through the isotopic analysis of $^{18}O/^{16}O$* : Brazilian journal of food technology, 26, 1-14.
13. Kioroglou D., Lleixá J., Mas A., Del Carmen Portirio M. (2018) *Massive Sequencing: A new tool for the Control of Alcoholic Fermentation in Wine*: Fermentation 4, 7, 1-11.

14. Kreč H. (2021) *Izotopi dušika u istraživanju okoliša*. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu. Geotehnički fakultet, Varaždin, Hrvatska.
15. Lakićević S. (2020) *Kinetika alkoholne fermentacije i karakterizacija vina dobijenog od šire sa dodatkom lekovitog bilja*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu. Tehnološki fakultet. Leskovac, Srbija.
16. Leder L., Petric V.I., Jusup J., Banović M. (2021) *Geographical Discrimination of Croatia Wines by Stable Isotope Ratios and Multielemental Composition Analysis: Frontiers in Nitrition*, 8, 1-14.
17. Mac H.X., Pham T.T., Ha N.T.T., Ngyjen L.L.P., Friedrich I. (2023) *Current Techiques for Fruit Juice and Wine Adulterant Detection and Authentication-Review*, Beverages, 9, 84, 1-20.
18. Malićanin M. (2022) *Proizvodnja belih vina Srbije, Vodič za proizvodnju vina*: Univerzitet u Nišu, Poljoprivredni fakultet, Kruševac, Srbija.
19. Meir-Augenstein W., Kemp F.H. (2012) *Stable Isotope Analyses: General Principles and Limitations*: 1-15.
20. Mitrović T. (2021) *Hemometrijske metode za predviđanje parametara kvaliteta rečnih voda i razgradnje zagađujućih materija*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
21. Mojsov K., Andronikov S., Janevski A., Jordeva S., Zezova S. (2015) *Enzymes and wine: The enhanced quality and yield*: Savremene tehnologije, 4, 94-100.
22. Nemzer B., Kalita D., Yashin I. A., Yashin I.Y. (2021) *Chemical Composition and Polyphenolic compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities effects on Human Health - A review*, Beverages, 8, 1-18.
23. Niculaua M., Cosofret S., Coteav V., Nechita C.B., Odageri G. (2006) *Consideration on stable isotopic determination in Romanian Wines*: Cercetari agronomice in Moldova (Agronomic Research in Moldavia), 128, 25-31.
24. Santesteban L.G., Miranda C., Barbarin I., Royo J.B. (2015) *Application of the measurement of the natural abundance of stable isotopes in viticulture: A review*: Australian Journal of Grape and Wine Research; 21, 157-167.
25. Saratlija K. (2020) *Primjena stabilnih izotopa ¹⁸O u istraživanju klimatskih promjena*. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu. Geotehnički fakultet, Varaždin, Hrvatska.
26. Scutarasu C., Cotea V., Luchian C., Colibaba C. (2019) *Influence of enzymatic treatments on White Wine Composition*: Bio Web of Conferences, 15, 1-7.
27. Simonova G., Kalashnikova D. (2019) *Isotope Ratio Mass Spectrometry application for environmental investigation*: E3S Web of Conferences, 98, 1-6.
28. Simonovic Z., Petrovic D., Curcic N. (2019) *Production of grapes and wine in Serbia*: Ekonomika, 65, 11-20.

29. Smajlovic I., Wang D., Turi M., Qiding Z., Futo I., Veres M., Sparks K.I., Jakšić D., Vuković A., Vujadinović M. (2019) *Quantitative analysis and detection of chaptalization and watering down of Wine using Isotope ratio Mass Spectrometry*: BIO Web of Conferences,15, 1-9.
30. Sredojević M. (2018) *Hemijska karakterizacija grožđa i sortnih vina iz različitih vinogorja u Srbiji*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Hemijski fakultet, Beograd, Srbija.
31. Šuković N. (2017) *Određivanje relativnog odnosa stabilnih izotopa kiseonika ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) u vodi vina primenom izotopske masene spektrometrije (IRMS - Isotope Ratio Mass Spectrometry)*.Završni rad. Univerzitet u Beogradu. Hemijski fakultet, Beograd, Srbija.
32. Velić D., Klarić Amidžić D., Velić N., Klarić I., Tominac Petravić V., Mornar A. (2018) *Chemical Costituents of Fruit Wines as Descriptors of their Nutritional, Sensorial and Health-Related Properties*: BIO Web of Conferences, 12, 1-4.
33. Wang H., Jansen G.H., Duin H., Meijer A.J.H. (2021) *Measurement of $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ of water and ethanol in Wine by off-Axis Integrated Cavity output Spectroscopy and Isotope Ratio Mass Spectrometry*: European Food Research and Technology, 247, 1-4.
34. Wurz D.A. (2019) *Wine and Health: A review of its benefits to human health*: BIO Web of Conferences, 12, 1-4.
35. Darko Bogdanović, *Tajna Savršenog vina: Otkrijte kako fermentacija vina utiče na ukus vašeg omiljenog pića*, 22.04.2023: Seosajt, dostupno na <https://www.enolog.rs/fermentacija-vina/> (pristupljeno 5.12.2023).
36. Dragutin Mijatović, *Parametri kvaliteta vina*, 24.06.2019: dostupno na <https://ovinu.info/parametri-kvaliteta-vina/> (pristupljeno 7.2.2024).
37. Fermentacija (Etanol), Wikipedia: Wikipedia, dostupno https://sr.wikipedia.org/sr/Fermentacija_%28etanol%29 (pristupljeno 5.12.2023).
38. The Home Winemaking Channel, 22.10.2018, YouTube sajt, dostupno na <https://www.youtube.com/watch?v=pxYCCmlUxVA> (pristupljeno 5.12.2023).