

# Analiza vina pomoću spektroskopije NMR

---

Sunjka, Franka

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:229911>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Franka Sunjka

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANALIZA VINA POMOĆU SPEKTROSKOPIJE NMR**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2023. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

21. svibnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

8. rujna 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:



## Sadržaj

|   |            |
|---|------------|
| <b>§ SAŽETAK.....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1. Važnost analize vina.....  | 1          |
| 1.2. Osnova spektroskopije NMR .....  | 1          |
| <b>§ 2. KEMIJA VINA .....</b>   | <b>3</b>   |
| 2.1. Kemijski sastav vina .....   | 3          |
| 2.2. Značaj kemije vina.....  | 3          |
| <b>§ 3. METODE ANALIZE VINA .....</b>   | <b>6</b>   |
| 3.1. Početci analize vina .....   | 6          |
| 3.2. Ciljana i neciljana analiza vina .....   | 6          |
| 3.3. Fizikalno-kemijska analiza, ICP-AES i ICP-MS .....                                   | 7          |
| 3.4. UV-Vis, FT-IR i Ramanova spektroskopija .....  | 8          |
| 3.5. Spektrometrija masa.....   | 8          |
| <b>§ 4. SPEKTROSKOPIJA NMR .....</b>  | <b>10</b>  |
| 4.1. Priprema uzorka .....  | 10         |
| 4.2. Obrada signala .....   | 11         |
| 4.3. Kemometrija kao važan alat u neciljanoj analizi tehnikom NMR .....                   | 11         |
| 4.4. Dvodimenzijska spektroskopija NMR kao dio ciljane analize.....                       | 13         |
| 4.5. Prednosti i nedostaci spektroskopije NMR .....                                       | 19         |
| <b>§ 5. PRIMJENE SPEKTROSKOPIJE NMR U ANALIZI GROŽĐA I VINA .....</b>                     | <b>21</b>  |
| 5.1. Primjena spektroskopije NMR u analizi grožđa.....                                    | 23         |
| 5.1.1. Karakterizacija metaboloma grožđa.....   | 23         |
| 5.1.2. Istraživanje utjecaja terroira na sastav grožđa .....                              | 23         |
| 5.1.3. Istraživanje utjecaja tehnika uzgoja na sastav grožđa.....                         | 24         |
| 5.2. Primjena spektroskopije NMR u analizi vina .....                                     | 24         |
| 5.2.1. Grupiranje i usporedba uzoraka vina .....  | 24         |
| 5.2.2. Varijetalna klasifikacija vina .....   | 25         |
| 5.2.3. Određivanje sadržaja octene kiseline u vinu.....                                   | 25         |
| 5.2.4. Praćenje promjene koncentracije različitih spojeva tijekom fermentacije vina ..... | 25         |
| 5.2.5. Procjena kvalitete različitih uvjeta starenja vina .....                           | 26         |
| 5.2.6. Detekcija čaptalizacije i tehnika SNIF-NMR.....                                    | 26         |
| 5.2.7. Ostale primjene .....  | 27         |

---

§ 6. LITERATURNI IZVORI..... XXVIII



## § Sažetak

Kao jedan od dominantnih komercijalnih prehrambenih proizvoda, vino je podložno brojnim manipulacijama i krivotvorenjima, stoga je analiza vina neizbježna kako bi se potvrdila njegova kvaliteta i autentičnost. Nekoliko stotina različitih kemijskih spojeva prisutnih u vinu doprinose kompleksnosti njegova sastava i određivanja, te su razvijene brojne tehnike i njihove kombinacije kako bi se postigli što bolji rezultati. Kao analitičke metode za određivanje sastava vina i njegovo povezivanje sa opaženim karakteristikama, koriste se razne kromatografske tehnike, spektrometrija masa te spektroskopske tehnike. Jednodimenzijska i dvodimenzijska spektroskopija NMR predstavlja brz i učinkovit način analize vina, te zajedno sa kemometrijskom analizom podataka daje iznimne rezultate. Najčešće se koriste  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektroskopija NMR, a analiza se također može provoditi i spregnutim sustavima, pri čemu se učestalo koriste i ekstrakcija ili spektrometrija masa. Spektroskopijom NMR mogu se provoditi ciljane i neciljane analize vina, ali i samog grožđa. Tako se uspješno može karakterizirati metabolom grožđa te istražiti utjecaj *terroira* i tehnike uzgoja na metabolički profil grožđa. Upotrebom spektroskopije NMR vina se mogu grupirati prema geografskom podrijetlu i varijetalnoj srodnosti, kao i odrediti promjene prilikom oksidacije vina, alkoholne i malolaktične fermentacije te naposljetku provjeriti je li došlo do čaptalizacije tijekom proizvodnje.



## § 1. UVOD

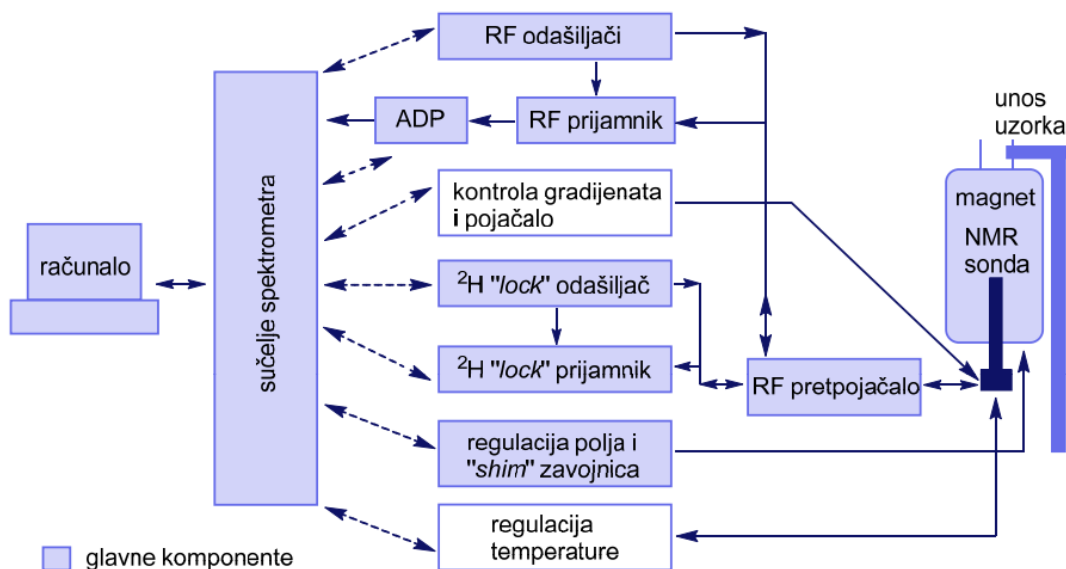
### 1.1. Važnost analize vina

Vino je izuzetno složena kemijska matrica u kojoj je ravnoteža između mnogo kemijskih spojeva zaslužna za njegovu konačnu kvalitetu i značaj. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) uslijed jednostavnosti pripreme uzoraka omogućuje raznolikost primjena za ciljanu i neciljanu analizu mnogih kompleksnih uzoraka, kao što su vino i vinski mošt. Unatoč tome što se NMR koristi već nekoliko desetljeća, stalni napredak računske tehnologije i pulsni tehnika pruža izniman potencijal za još bolje rezultate. Nadalje, koriste se različite tehnike NMR, kako jednodimenzijske, tako i dvodimenzijske te se kombiniraju s kemometrijskim metodama za kvalitetnu analizu podataka. Prekretnica u unapređenju šire upotrebe spektroskopije NMR je nabavljanje kapitalne opreme u laboratorijima, te vinski sektor sve više prihvaća diferencijaciju vina upravo na temelju rezultata dobivenih spektroskopijom NMR. Upotreba NMR znatno doprinosi procjeni vrijednosti određenog vina s obzirom na legislative o geografskom podrijetlu, poput PDO (engl. *protected denomination of origin*) i PGI (engl. *protected geographical indication*). PDO i PGI uspostavljaju intelektualno vlasništvo za specifične proizvode, poglavito hranu i vino, te su od iznimne važnosti u Europskoj uniji.<sup>1,2</sup>

### 1.2. Osnova spektroskopije NMR

Spektroskopija NMR temelji se na spoznaji da se određene atomske jezgre u vanjskom magnetskom polju mogu pobuditi oscilirajućim radiofrekvencijskim zračenjem u uvjetima blizu rezonancijskim. Tako pobuđene atomske jezgre emitiraju elektromagnetski signal čija karakteristična frekvencija otkriva podatke o kemijskom okruženju promatrane jezgre. Dakle, praćenjem relaksacije jezgri nakon pobude različitim duljinama i slijedovima primijenjenih pulseva, dolazi se do strukturnih podataka. Nadalje, interakcije magnetskih momenata povezanih jezgri uzrokuju sprezanje signala koje također nadopunjuje podatke o strukturi analita, dok integriranje površine ispod signala ili njihov intenzitet sadrže informacije o broju jezgri u rezonanciji. No, samo određene atomske jezgre mogu se detektirati spektroskopijom NMR, a nužan uvjet koji određuje aktivnost jezgri jest kvantni broj nuklearnog spina koji je različit od nule, odnosno neparan broj protona  $i$  ili neutrona. Tako se spektroskopijom NMR

mogu proučavati jezgre  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  te  $^{31}\text{P}$ . Na slici 1. prikazani su osnovni dijelovi suvremenog spektrometra NMR: supravodljivi magnet, sonda u kojoj se nalazi cjevčica s uzorkom, nekoliko vrsta zavojnica koje održavaju homogenost i stabilnost magnetnog polja te elektronički sustav koji povezuje sve kontrole.<sup>1,3,4</sup>



Slika 1. Shematski prikaz spektrometra NMR.<sup>4</sup>

Cilj analize vina je povezati kemijski sastav vina sa njegovim opaženim svojstvima te smanjiti mogućnosti krivotvorenja identiteta vina, odnosno lažnog predstavljanja bitnih značajki koje u konačnici dovode do komercijalnog razlikovanja vina. Osim geografskog podrijetla, to su svojstva poput sorte grožđa i godine berbe, a koja se mogu karakterizirati spektroskopijom NMR. Krivotvorenje u vinskom sektoru odnosi se na dodatak šećera vinskom moštu (čaptalizacija), razrjeđivanje vina vodom, dodatak alkohola, bojila i drugih aditiva, ili pak miješanje s drugim vinima manje kvalitete. Navedeno ne predstavlja samo komercijalnu prijevaru, nego i potencijalnu opasnost za zdravlje potrošača. Iako se spomenuta svojstva vina mogu ustanoviti i drugim tehnikama, u ovom je Završnom radu naglasak stavljen na primjenu tehnika NMR kao suvremene metode analize vina.<sup>5</sup>

## § 2. KEMIJA VINA

### 2.1. Kemijski sastav vina

Vino je kompleksna smjesa nekoliko stotina kemijskih spojeva prisutnih u različitim količinama. Sadrži mnoge metabolite iz grožđa, ali većina je spojeva prisutnih u vinu ipak produkt alkoholne i malolaktične fermentacije. Prilikom alkoholne fermentacije dolazi do pretvorbe šećera u etanol i ugljikov dioksid, dok u malolaktičnoj fermentaciji najbitnija reakcija uključuje pretvorbu jabučne kiseline u mliječnu kiselinu, pri čemu vina dobivaju manje kiseli i zaokruženi okus. Glavne su komponente vina: voda, etanol, glicerol, šećeri i organske kiseline, no na sastav vina utječu mnogi faktori poput: mikroorganizama, geografskog podrijetla, sorte grožđa i tehnologije korištene prilikom proizvodnje.<sup>6,7</sup>

Primjerice, vino može dozrijevati u drvenim bačvama kako bi se stabilizirala boja te poboljšala prozirnost i senzorne karakteristike vina. Prilikom tog procesa dolazi do prijenosa nekih kemijskih spojeva (npr. polifenola, laktona, steroida i karotenoida) iz drveta u vino. Najčešće se za proizvodnju vinskih bačvi koristi hrastovina, ali zabilježena je i upotreba akacije, trešnje, kestena i duda pa se tako u vinima koja dozrijevaju u hrastovim bačvama pronalaze veći udjeli vanilina i eugenola, dok uzorci dozrijevani u dudu pokazuju povećanje razine 4-etilfenola.<sup>8</sup>

### 2.2. Značaj kemije vina

Analiza vina složena je ne samo zbog složenosti matrice, nego i zbog činjenice da se razlika u vinima najčešće ne opaža na temelju specifičnih markera, već relativnih razlika u koncentracijama pojedinih metabolita i njihovim interakcijama.<sup>5</sup>

Hlapljive komponente odgovorne su za miris vina koji se osjeća mirisanjem tzv. *headspacea* (engl. natprostor) čaše, kao i arome koja se osjeti prilikom konzumiranja. Spojevi prisutni u grožđu prenose se u vino uz minimalne izmjene prilikom fermentacije (npr. metokspirazini) ili kao prekursori spojeva koji nastaju tijekom obrade i starenja vina. Identificirano je preko 800 hlapljivih spojeva odgovornih za aromu vina te su oni učestalo prisutni u vrlo niskim koncentracijama i sa niskim pragom osjetne detekcije (ng/L ili µg/L).

U grožđu su poglavito prisutni monoterpeni, C<sub>13</sub>-norizoprenoidi, derivati benzena (npr. vanilin, eugenol, acetaldehid, fenilacetaldehid), C<sub>6</sub> aldehidi te alkoholi. Oni se nalaze i u nehlapljivoj

obliku, tj. glikozidno vezani, no kao takvi nemaju direktnu aromu, nego doprinose kao prekursori za hidrolitičke reakcije koje se odvijaju tijekom proizvodnje vina. Specifične aroma koje uzrokuju neki od kemijskih spojeva prisutnih u vinu prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Neki kemijski spojevi prisutni u vinu i grožđu te karakteristične arome kojima doprinose.<sup>8</sup>

| skupina kemijskih spojeva       | predstavnici                | karakteristična aroma |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| monoterpeni                     | linalool, nerol             | ruža                  |
|                                 | geraniol                    | pelargonija           |
|                                 | vinski lakton               | kokos                 |
|                                 | mircenol                    | lavanda, citrus       |
| C <sub>13</sub> -norizoprenoidi | β-damaskenon                | voćno-cvjetna         |
|                                 | β-ionon                     | ljubičica             |
| benzenoidi                      | fenilacetaldehid            | ruža, zumbul          |
|                                 | 2'-aminoacetofenon          | mokra krpa, naftalen  |
| C <sub>6</sub> -aldehidi        | heksanal                    | vegetativna, gorkasta |
|                                 | (E)-heks-2-enal             |                       |
|                                 | (Z)-heks-3-enal             |                       |
| metoksipirazini                 | 3-izobutil-2-metoksipirazin | paprika babura        |
| esteri                          | etil-heksanoat              | voćno-cvjetna         |
|                                 | etil-oktanoat               |                       |
|                                 | etil-dekanoat               |                       |
| spojevi sa sumporom             | etantiol                    | luk                   |
|                                 | dimetil sulfid              | trava, tartuf         |
|                                 | 2-sulfaniletanol            | zagorena guma         |
|                                 | 3-sulfanilheksan-1-ol       | grejp, marakuja       |

Općenito, monoterpeni i esteri etanola zaslužni su za cvjetnu i citrusnu aromu; C<sub>13</sub>-norizoprenoidi za voćno-cvjetnu, a C<sub>6</sub>-aldehidi i (Z)-non-2-enal za vegetativnu. No, neke se

---

arome smatraju negativnima, primjerice povećana koncentracija 2'-aminoacetofenona učestalo uzrokuje aromu nalik mokroj krpi što dovodi do komercijalnog odbacivanja vina.<sup>8</sup>

## § 3. METODE ANALIZE VINA

### 3.1. Početci analize vina

S obzirom da je vino jedno od rijetkih proizvoda čija je kvaliteta usko povezana s jedinstvenošću i prepoznatljivošću, tijekom 20. stoljeća razvijale su se brojne metode kako bi se unaprijedila njegova karakterizacija. Sorta grožđa, podrijetlo, način i uvjeti proizvodnje nisu samo faktori koji diferenciraju vina, već imaju ključnu ulogu u određivanju njihova komercijalnog značaja.

Metode razvijene u sklopu analitičke kemije znatno su doprinijele spoznajama o kemiji vina. Razvoj plinske kromatografije (engl. *gas chromatography*, GC) 1950-ih godina predstavljao je prekretnicu u analizi vina. Značajan napredak podrobnosti analize ostvario se primjenom raznovrsnih spektroskopskih metoda, poput atomske apsorpcijske spektroskopije (engl. *atomic absorption spectroscopy*, AAS), spektrometrije masa (engl. *mass spectrometry*, MS) te spektroskopije NMR.<sup>1,9</sup>

Iako se spektroskopija NMR za strukturnu analizu primjenjuje još od 1940-ih godina, jedno od prvih istraživanja koje je uključivalo NMR provelo se nekoliko desetljeća poslije, 1993. godine. Tad su Vogels i sur. upotrijebili spektroskopiju <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR za klasifikaciju 53 uzorka njemačkih bijelih vina prema geografskom podrijetlu, te su predstavili mogućnost upotrebe NMR u kombinaciji sa kemometrijskim metodama za daljnju analizu vina.<sup>10</sup>

### 3.2. Ciljana i neciljana analiza vina

Ciljane metode u metabolomici vina uglavnom obuhvaćaju kvantitativnu analizu određenih, unaprijed definiranih skupina metabolita koji najčešće pripadaju klasama polifenola, hlapljivih spojeva, šećera, aminokiselina i organskih kiselina. Iako su takve metode uspješno primijenjene za diferencijaciju vina, velik dio metaboloma vina ipak ostaje nedetektiran i time se gubi znatan dio bitnih informacija o analitu, kao što su sorta grožđa ili tehnike uzgoja. Stoga se u novije vrijeme naglasak stavlja na neciljanu analizu metaboloma vina.

Neciljana analiza počiva na karakterizaciji svojstava metaboličkog profila (tzv. *fingerprinting*), a ne toliko spojeva koji ga sačinjavaju. Tako dobiveni metabolički profil učestalo sadrži informacije o identificiranim, ali i neidentificiranim molekulama, te ne služi apsolutnoj kvantifikaciji svih prisutnih metabolita. Neciljana analiza uglavnom se provodi na

sljedeći način: odabere se i pripremi uzorak, prikupe se podatci izabranim instrumentom i analiziraju upotrebom kemometrijskih metoda te se označe markeri i pretraže baze podataka kako bi se na kraju postavila hipoteza. Neke prepreke u neciljanoj analizi vina uključuju veliku strukturnu raznolikost spojeva prisutnih u vinu, posebice kad je riječ o izomerima polifenola; nedostatak dostupnih standarda za većinu metabolita prisutnih u vinu te naposljetku i objedinjenih baza podataka za metabolite vina.<sup>5</sup>

Primjerice, temeljem ciljane i neciljane analize spektroskopijom NMR, u jednom je istraživanju diferencirano nekoliko njemačkih vina. Pritom su kao ključni spojevi temeljem ciljane analize istaknuti: šikiminska kiselina, kaftarna kiselina, i butan-2,3-diol.<sup>11</sup> Na sličan su način, nakon smanjivanja signala vode i etanola u spektrima NMR, Mazzei i sur. statistički prepoznali šest metabolita odgovornih za diferencijaciju nekoliko talijanskih vina.<sup>12</sup>

### 3.3. Fizikalno-kemijska analiza, ICP-AES i ICP-MS

Može se mjeriti nekoliko varijabli koje karakteriziraju grožđe, odnosno mošt, ali klasična metoda koja se primjenjuje u vinogradarstvu za procjenu zrelosti grožđa uključuje mjerenje: pH, ukupne kiselosti, ukupnih topljivih čvrstih tvari i ukupni sadržaj antocijanina. Kiselost i pH određuju se najčešće titracijom, te se u tu svrhu koriste automatski pH-metri. Sadržaj flavonola i antocijanina može se odrediti mjerenjima optičke gustoće na uzorcima kože grožđa.

Druge analize obuhvaćaju određivanje mineralnog sastava bobica grožđa, odnosno udio ukupnog i mineralnog dušika, fosfora, kalija, kalcija i magnezija. Udio dušika i fosfora može se odrediti nakon digestije uz modificiranu proceduru koristeći sumpornu kiselinu i vodikov peroksid, dok se udio kalcija, kalija i magnezija određuje atomskom emisijskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, ICP-AES). Amonijevi i fosfatni ioni kvantificiraju se kolorimetrijom, kao i ukupni sadržaj šećera i organskih kiselina. Ukupni sadržaj topljivih čvrstih tvari određuje se pak refraktometrijom.<sup>13</sup>

Osim tehnike ICP-AES, u svrhu diferencijacije vina uspješno je upotrijebljena i spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). Azcarate i sur. upotrebom tehnike ICP-MS u kombinaciji sa kemometrijom diferencirali su 57 uzoraka bijelog vina iz četiri vinogradarske regije Argentine na temelju pet elemenata u ultratragovima: barija, arsena, olova, molibdena i kobalta.<sup>14</sup>

### 3.4. UV-Vis, FT-IR i Ramanova spektroskopija

Osim spektroskopije NMR u analizi vina često se koriste i druge spektroskopske tehnike. Spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*, UV-Vis) kao i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FT-IR) uspješno su upotrijebljene za diferencijaciju crnih vina proizvedenih u istoj vinogradarskoj regiji na temelju sorte i godine berbe. Pritom se u spektrima UV-Vis najčešće promatra raspon valnih duljina 250–600 nm u kojem apsorbiraju hlapljivi spojevi i polifenoli. Spektri FT-IR za različite uzorke vina vizualno su vrlo slični, ali postoje razlike u manjim dijelovima spektra, iako dominiraju vrpce apsorpcije vode i etanola (npr. široka vrpca istezanja veze O-H u rasponu 4000–3000  $\text{cm}^{-1}$ ). U odnosu na infracrvenu spektroskopiju, Ramanova spektroskopija pruža posebnu prednost pri analizi uzoraka s visokim udjelom vode jer je manje osjetljiva na njen signal. Primjerice, Magdas i sur. iskoristili su Ramanovu spektroskopiju sa Fourierovom transformacijom za klasifikaciju 30 vina iz tri rumunjske vinogradarske regije.<sup>15,16</sup>

### 3.5. Spektrometrija masa

Za analizu polifenola prisutnih u vinu učestalo se koristi spektrometrija masa i to u sprezi za različitim kromatografskim tehnikama poput: GC, tekućinske kromatografije (engl. *liquid chromatography*, LC) ili tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Tako se tehnika HPLC-MS uobičajeno koristi za analizu antocijanina (flavonoidi, podvrsta polifenola) u crnom grožđu kako bi se ustanovila sorta grožđa i posljedično autentičnost crnog vina. Sadržaj anocijanina može se analizirati i kombinacijom drugih tehnika kao što su: tandemna spektrometrija masa (engl. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) i tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC).

Nadalje, tehnika GC-MS često se koristi za analizu hlapljivog profila vina, odnosno utvrđivanje poveznice između arome vina i kemijskog sastava. S obzirom da je većina hlapljivih spojeva u vinu prisutna u niskim koncentracijama, posebnu je pažnju potrebno posvetiti pripremi uzorka vina za analizu te se u tu svrhu poglavito provodi ekstrakcija ili pak destilacija uzorka. Ekstrakcija je učestali korak za predkoncentraciju uzorka kojeg zahtijeva većina klasičnih analitičkih tehnika, no ne i tehnika NMR. Većinski se primjenjuju: ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE), ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE) i *headspace* mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *headspace-solid phase*



*microextraction*, HS-SPME). Tehnika SPME-GC/MS tako je upotrijebljena za promatranje razvoja arome vina tijekom starenja vina u bačvama izrađenima od različitog drveta.<sup>1,5,8,17,18</sup>

## § 4. SPEKTROSKOPIJA NMR

### 4.1. Priprema uzorka

Najintenzivniji signali u spektru  $^1\text{H}$  NMR vina potječu od vode i etanola, s obzirom da su to glavne komponente koje sačinjavaju vino, te se signali etanola i vode stoga moraju eliminirati kako bi se uspješno izvršila analiza ostalih komponenti, poglavito organskih spojeva slabijih protonskih signala. To se najčešće postiže uparavanjem ili kriodesikacijom te spektroskopskim tehnikama supresije otapala. Kriodesikacijom ili koristeći atmosferu inertnog plina (dušik, argon) fizički se odstrane voda i etanol. No, ukoliko je uzorak mošt grožđa, kriodesikacija se izbjegava jer udio nefermentiranog šećera ne bi omogućio dostatnu eliminaciju vode.

Eliminacija vode tijekom pripreme uzorka mora se provoditi na način da se kontrolira pH (najčešće oko 3), kako bi se minimizirao njegov utjecaj na kemijski pomak. U tu svrhu najčešće se dodaje pufer (npr. fosfatni), kako ne bi došlo do gubitka značajnih fizikalno-kemijskih interakcija uslijed pojedinačnih korekcija pH. Titraciju je potrebno provoditi s preciznošću barem  $\pm 0,05$ , jer i mala razlika u pH među uzorcima može značajno promijeniti kemijski pomak spektra. Potom se uzorak, primjerice osušeni titrirani ekstrakt grožđa ili supernatant mošta tj. vina otapa u deuteriranoj vodi ( $\text{D}_2\text{O}$ ) te se dodaje natrijeva sol (trimetil)propionske-2,2,3,3- $d_4$  kiseline u  $\text{D}_2\text{O}$  za kalibraciju kemijskog pomaka, nakon čega se pripremljeni uzorak prenosi u cjevčicu NMR. Kao unutrašnji standard i za kalibraciju kemijskog pomaka može se koristiti i otopina 4,4-dimetil-*l*-4-silapentan-1-sulfonske kiseline (DSS). Etanolni ekstrakti razrijeđeni u deuteriranoj vodi ne dozvoljavaju identifikaciju fenolnih spojeva uslijed preklapajućih signala u spektru  $^1\text{H}$  NMR, kao i njegove kompleksnosti te se stoga u svrhu određivanja fenolnih spojeva koristi neka druga metoda, primjerice HPLC.

Kad je riječ o spektroskopiji NMR u čvrstom stanju, priprema uzorka uključuje izolaciju ciljanih spojeva prirodnim taloženjem nakon kojeg slijedi kriodesikacija. Istražen je sastav takvog tamnocrvenog taloga nastalog u vinima Merlot i Cabernet Sauvignon, te su u njemu identificirani: polifenoli, polisaharidi, kalijev bitartarat, organske kiseline i slobodne aminokiseline. Talog daje izgled nalik laku unutar prazne boce vina, a njegova nastala količina ovisi o temperaturi, godini berbe i sorti grožđa.<sup>1,3,5-7,11,13,19-21</sup>

## 4.2. Obrada signala

Uslijed kontinuiranog poboljšanja učinkovitosti spektrometara NMR, velik se broj spojeva prisutnih u vinu može detektirati istovremeno te se uglavnom dobivaju vrlo kompleksni spektri sa značajnim preklapanjima signala. Preklapanje signala može se smanjiti upotrebom tehnika supresije otapala kao što su: WET (engl. *water suppression enhanced through T<sub>1</sub> effects*), WATERGATE (engl. *water suppression by gradient-tailored excitation*) i NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect NMR spectroscopy*) pulsni sljedova prezasićenja. Izazov je upotrebom ovih tehnika postići i istovremenu supresiju signala etanola, a ne samo vode. Odabir tehnike mora biti u skladu sa ograničenjima osjetljivosti i vremena na raspolaganju za eksperiment. Primjerice, Monakhova i sur. uspješno su upotrijebili jednodimenzijski pulsni slijed NOESY za supresiju 8 signala vode i etanola u spektru <sup>1</sup>H NMR: OH singleta, CH<sub>2</sub> kvarteta i CH<sub>3</sub> tripleta.<sup>22</sup>

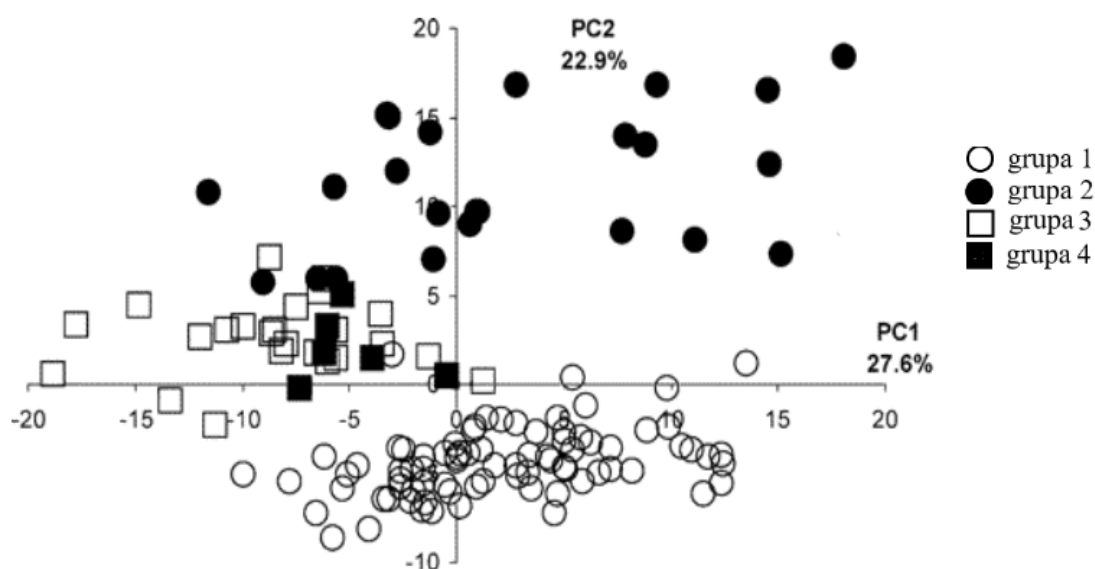
Prije potpune obrade podataka spektralni se podatci moraju predobraditi, pri čemu se uvode korekcije na baznu liniju, poravnavanje signala itd. Predobrada je nužna kako bi se reducirali dobiveni skupovi podataka i minimizirali pomaci signala uslijed varijacija instrumenata, pH te razlika u sastavu pojedinih uzoraka vina. Učestalo se provodi i tzv. *bucketing*, pri čemu se spektar dijeli na segmente (engl. *bins*). Segmenti koji sadrže ostatke vode i etanola nakon supresije ili druge nezanimljive spojeve za analizu uklanjaju se kako bi se dobili segmenti prikladni za multivarijatnu analizu.<sup>1,5</sup>

## 4.3. Kemometrija kao važan alat u neciljanoj analizi tehnikom NMR

Neciljano snimanje spektara NMR uključuje snimanje nekoliko spektara pri istim uvjetima te pronalazak ponavljajućih sljedova pomoću kemometrije, odnosno multivarijatne analize. Napredak računske tehnologije i upotreba kemometrijskih metoda na podatke dobivene analizom spektara omogućili su razvoj multivarijatne analize podataka kao korisnog alata za evaluaciju kvalitete vina i ostalih prehrambenih proizvoda (pive, sokova, rajčica itd.).

Analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) koristi se za opisivanje uzoraka u *n*-dimenzijskom prostoru početnog seta varijabli u manji broj dimenzija koje se nazivaju glavne komponente. Glavne komponente nastale nakon reduciranja velikog skupa podataka sortirane su po značajnosti, odnosno po udjelu varijance podataka koji objašnjavaju. PCA je fundamentalni pristup za nenadziranu analizu podataka (ne zahtijeva preliminarnu hipotezu) i pritom se ističu sličnosti i razlike u grupama i uključenim varijablama. Na taj se način postiže odvajanje korisnih informacija od šuma, bez gubitka informacija do

kojih bi došlo primjerice skaliranjem promatranih spektralnih regija različitih intenziteta. Na slici 2. prikazan je graf koji su Pereira i sur. dobili primjenom PCA na 134 uzorka pulpe grožđa uzgojenog na 4 različita zemljišta bordoške regije u Francuskoj.<sup>13</sup> Na grafu je vidljiva disperzija uzoraka iz sve 4 grupe, unatoč tome što su one odvojene u zasebne klasterne. No, učestalo su vidljive i značajne varijabilnosti unutar pojedinih grupa, kao što je prikazano na slici 2. za slučaj grupa 1 i 2. Pereira i sur. dobivenu su varijabilnost pripisali različitim relativnim udjelima šećera (sukroze i fruktoze) te aromatskim spojevima, dok općenita odvojenost četiri klastera potječe od razlika u relativnim udjelima šećera i aminokiselina (prolina, arginina, glutamina,  $\gamma$ -amino-*n*-butanske kiseline). Osim PCA, za nenadziranu analizu podataka koristi se i hijerarhijska analiza klastera (engl. *hierarchical cluster analysis*, HCA).<sup>1,6,7</sup>



Slika 2. Jednodimenzijaska spektroskopija  $^1\text{H}$  NMR provedena je na pulpi i kožici bobica grožđa ubranih u četiri područja regije Bordeaux na jugozapadu Francuske, kako bi se utvrdili kemijski spojevi zaslužni za distinkciju bobica po podrijetlu. Grafički prikaz PC1-PC2 objašnjava 50,5% ukupne varijance statističkog uzorka. Oznake grupa: 1– Bordeaux, 2– Saint-Emilion, 3– Buzet i 4– Pessac-Léognan.<sup>13</sup>

Ostale metode multivarijatne analize podataka uključuju: linearnu diskriminantnu analizu (engl. *linear discrimination analysis*, LDA), multivarijatnu analizu varijance (engl. *multivariate analysis of variance*, MANOVA) te diskriminantnu analizu metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA). Upotreba

kemometrijskih metoda nije ograničena samo na nenadziranu analizu, pa se tako osim LDA i PLS-DA u nadziranoj analizi podataka koriste i: K-najbliži susjedi (engl. *K-means neighbors*, KNN), SIMCA (engl. *soft-independent modeling class analogy*), te umjetne neuronske mreže (engl. *artificial neural networks*, ANN). No, modeli izgrađeni na temelju nadzirane ili nenadzirane analize svakako se trebaju validirati kako bi se izbjeglo dovođenje neispravnih zaključaka i tzv. *overfitting*.

Naposljetku, budućnost upotrebe spektroskopije NMR kao iznimne instrumentne tehnike za analizu vina usko je povezana s razvojem pristupa obrade podataka, poglavito strojnog učenja (engl. *machine learning*). Tako su Sárdy i sur. usporedili četiri modela strojnog učenja, te su ustanovili mogućnost geografske i varijetalne distinkcije mađarskih vina upotrebom modela slučajne šume (engl. *random forest*, RF) i metoda potpornih vektora (engl. *support vector machines*, SVM).<sup>3</sup> Prednost je RF i SVM klasifikacijskih metoda manji utjecaj *overfittinga*, te su naposljetku takve metode uslijed svoje rjeđe primjene potencijalni izvor novih istraživanja.<sup>1,5,19</sup>

#### 4.4. Dvodimenzijaska spektroskopija NMR kao dio ciljane analize

Ciljana analiza vina učestalo uključuje i upotrebu dvodimenzijaskih (2D) tehnika NMR poput: COSY (engl. *correlation spectroscopy*), TOCSY (engl. *total correlation spectroscopy*), HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) te HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*). Shema pulsno slijeda svake 2D tehnike NMR prikazana je na slici 3., a uključuje periode pripreme, evolucije, miješanja i detekcije.

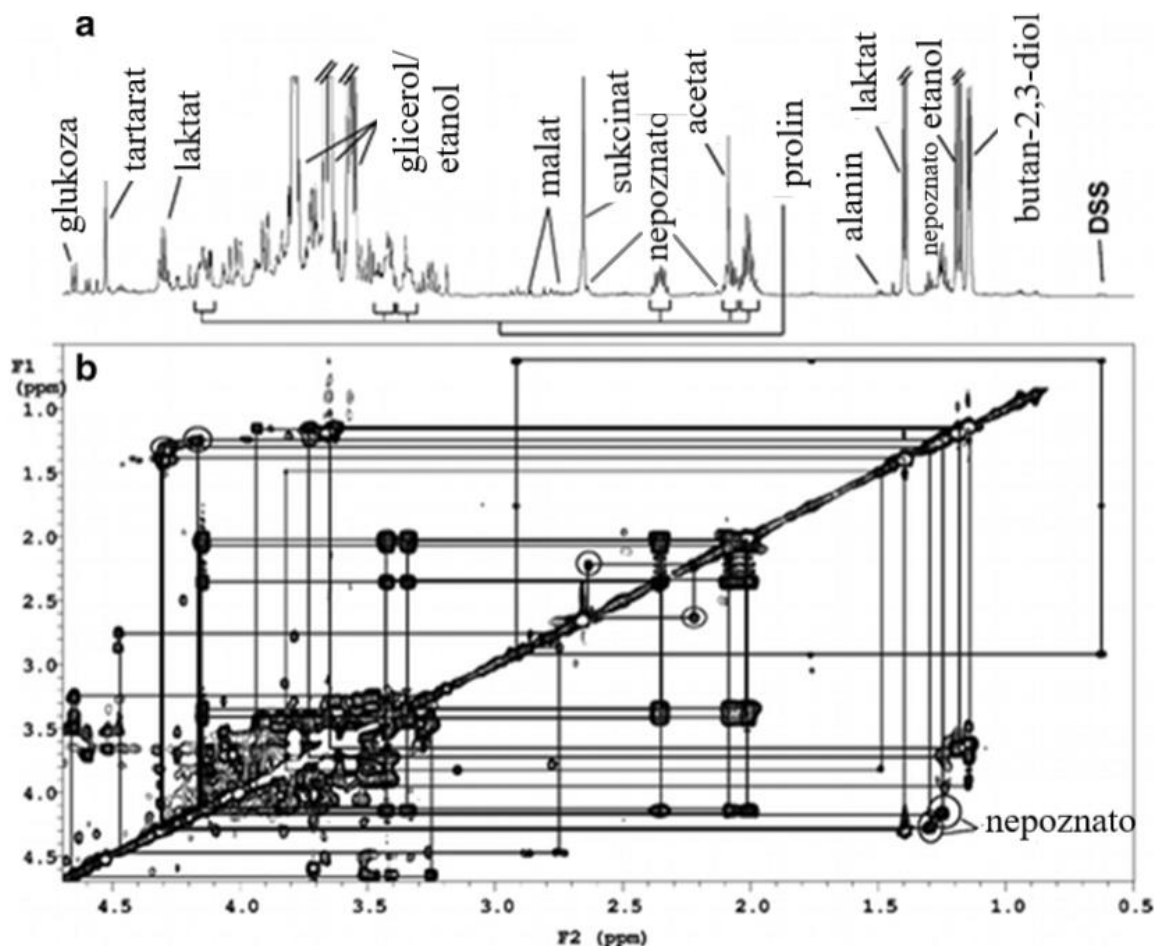


Slika 3. Opća shema 2D tehnike NMR.<sup>4</sup>

Osnovna razlika između 1D i 2D tehnika NMR jest ta što 2D spektri NMR sadrže drugu frekvencijsku dimenziju koja se generira povećavanjem vremena evolucije za isti iznos u svakom sljedećem ponavljanju pulsno slijeda tijekom evolucijskog perioda. Dvodimenzijaska spektroskopija NMR dijeli se na homonuklearnu (npr.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY) i heteronuklearnu (npr.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC). Dvodimenzijaska spektroskopija pomaže u rješavanju problema preklapanja

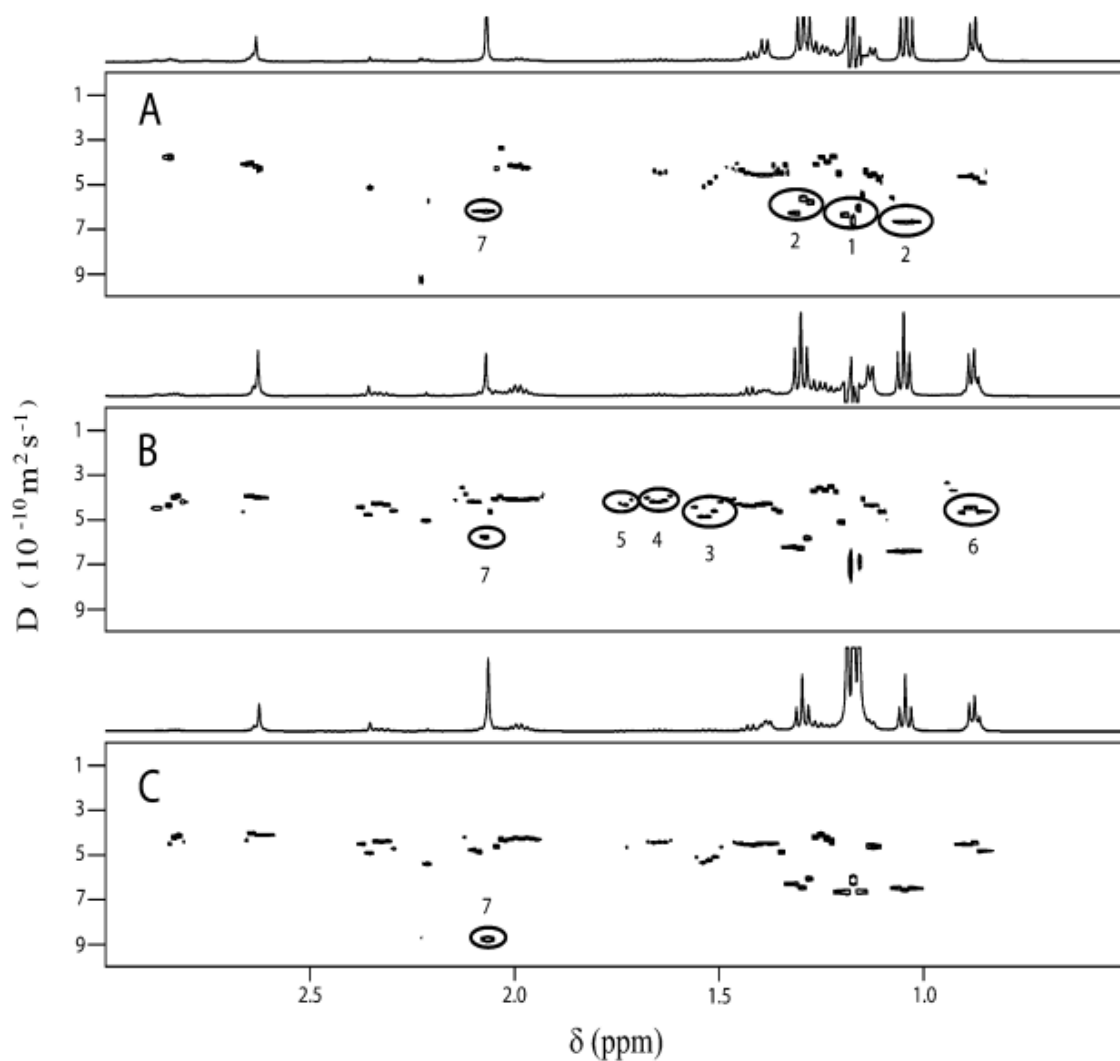
signala i slabih intenziteta nekih rezonancija tako što se uočava dodatna korelacija, ali i razlučuju signali čime se olakšava asignacija. Nedostatak 2D tehnika je veće vrijeme akvizicije potrebno za analizu uzorka.<sup>4,5,23</sup>

COSY je homonuklearna 2D tehnika NMR koja daje informacije o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. TOCSY daje informacije o korelaciji među protonima unutar istog spinskog sustava, ako postoji neprekinuti lanac spregnutih spinova. Tehnika HSQC koristi se za detekciju sprege između protona i heterojezgri (poput  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ ) kroz jednu vezu, dok HMBC daje informacije o korelaciji protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze. Na slici 4. prikazan je 2D spektar  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY Cabernet Sauvignona koji su snimili Son i sur.<sup>24</sup> Postojanje izvandijagonalnih signala ukazuje na to koje su jezgre u sprezi, dok njihovo odsustvo indicira na manjak sprege među odgovarajućim jezgrama.



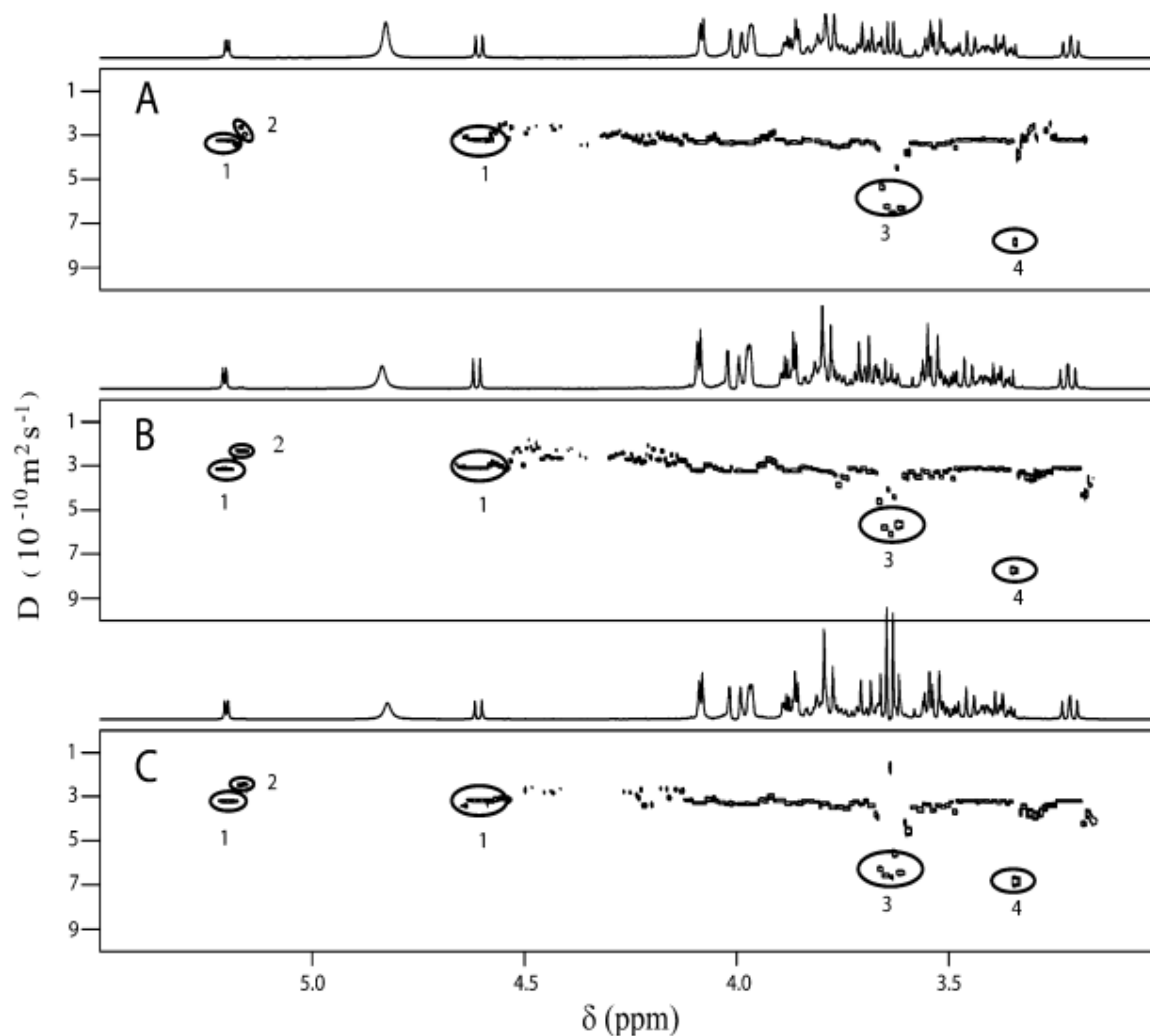
Slika 4. 2D spektar NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, uz asignirane dominantne signale za uzorak francuskog vina Cabernet Sauvignon.<sup>24</sup>

Zabilježena je i upotreba pseudo-dvodimenzijske tehnike DOSY (engl. *diffusion ordered spectroscopy*) koja omogućuje karakterizaciju više spojeva u odnosu na konvencionalne 1D i 2D tehnike NMR. Tehnika DOSY se koristi za odvajanje rezonancija prema hidrodinamičkom radijusu odgovarajućih spojeva, a na temelju izračunatih difuzijskih koeficijenata. Kemijski pomaci nalaze se na horizontalnoj osi, dok su difuzijski koeficijenti na vertikalnoj osi. DOSY takvim prikazom može poslužiti i kao metoda odjeljivanja, dajući informacije o veličini i sastavu kompleksnih matrica, kao i smanjenje preklapanja signala. Primjenjuje se gradijentno polje, a mjerenja se provode metodom spinske jake, pri čemu pulsni slijed počinje s pulsom od  $90^\circ$  te nakon vremenskog intervala slijedi puls od  $180^\circ$ . Difuzijski koeficijenti računaju se uzimajući u obzir žiromagnetski radijus jezgre ( $\gamma$ ), snagu gradijentnog pulsa ( $G$ ), pulsnu širinu gradijenta polja ( $\delta$ ), vrijeme difuzije ( $\Delta$ ) i intenzitet signala ( $I$ ). Tako su Absalon i sur. upotrijebili tehniku DOSY za određivanje sadržaja procijanidina (tanina) prisutnih u obliku monomera ili oligomera u crnom vinu,<sup>25</sup> a Nilsson i sur. za određivanje promjena u sastavu uzoraka portugalskog vina Porto različite starosti.<sup>23</sup> Spektar koji su snimili Nilsson i sur. prikazan je u četiri dijela na slikama 5, 6, 7 i 8. U konačnici, tehnika DOSY predstavlja potencijal za poboljšavanje eksperimenata NMR u svrhu analize vina, s obzirom da može dodati novu dimenziju konvencionalnim 2D spektrima NMR efektivno tvoreći 3D NMR.<sup>1,19,26</sup>

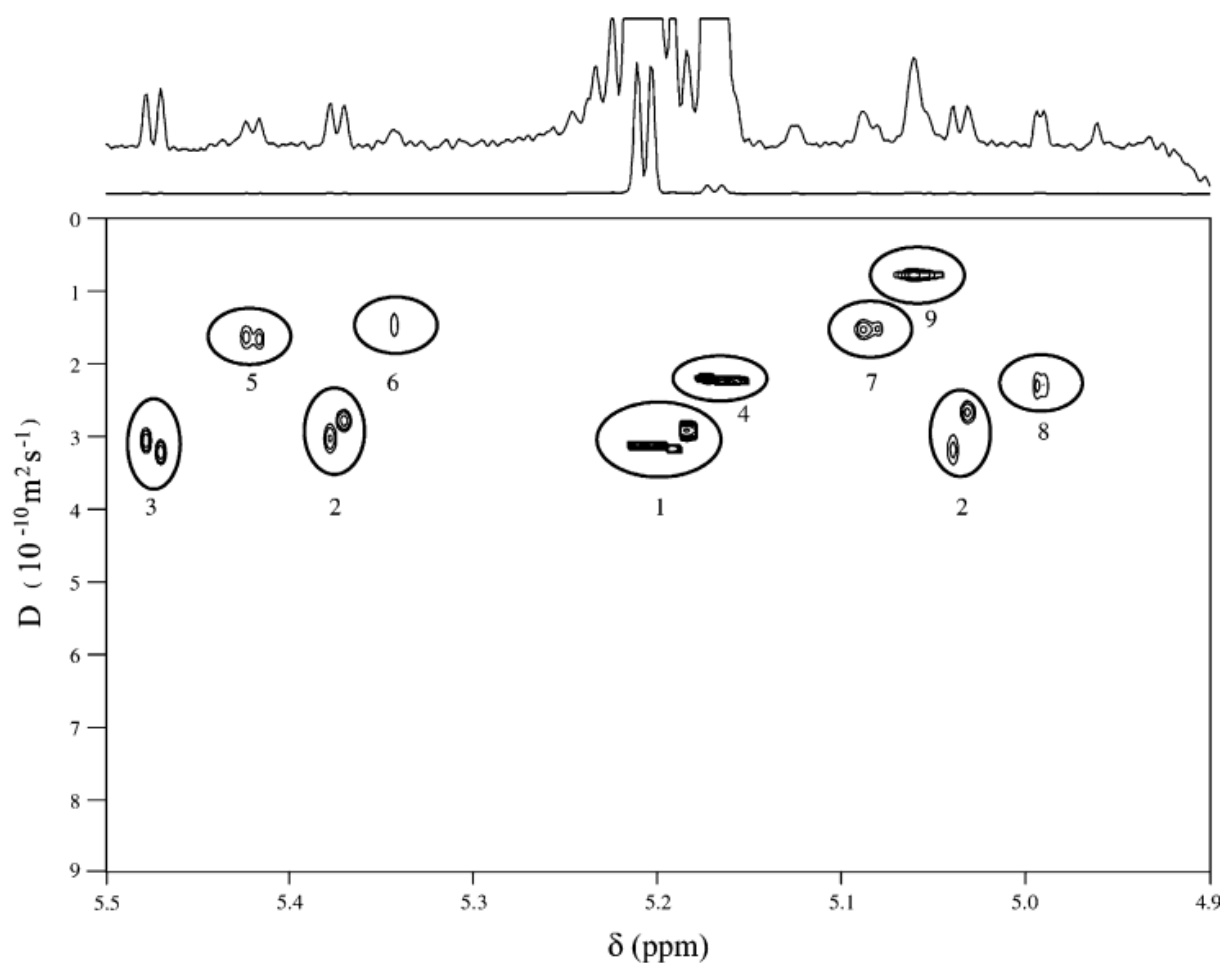


Slika 5. Spektar DOSY visoke rezolucije za regije 0,5–3,0 ppm vina Porto različite starosti: A– Porto (20 godina), B– Porto (3 godine), C– Porto (1 godina). Označeni signali odgovaraju: etanolu (1),  $^{13}\text{C}$  satelitima etanola (2), propan-1-olu i 2-metilbutan-1-olu (3), 3-metilbutan-1-olu (4), 2-metilpropan-1-olu (5), mješavini signala 3–5 (6) te acetatima (7).<sup>23</sup>

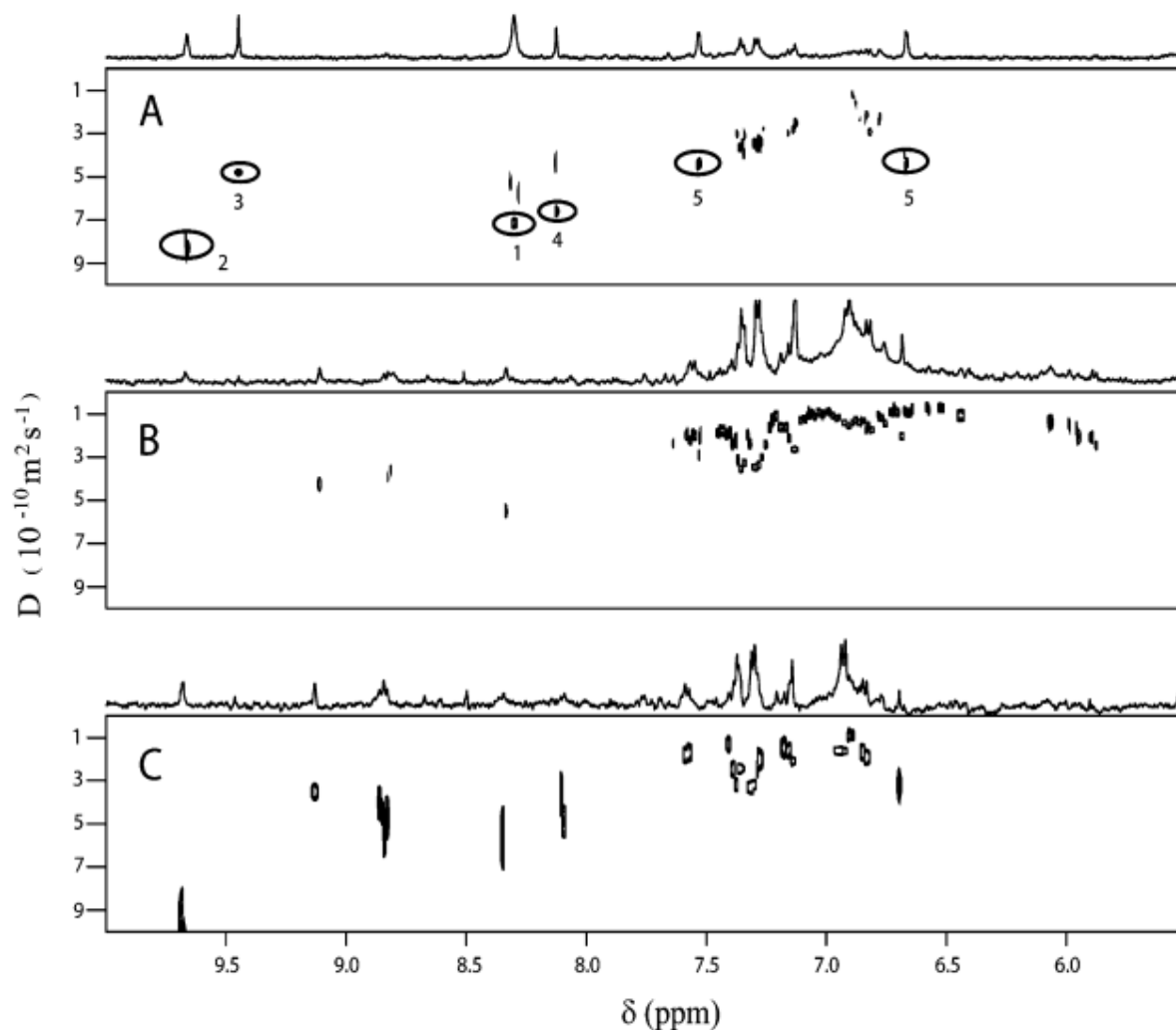




Slika 6. Spektar DOSY visoke rezolucije regije 3,0 –5,5 ppm za vino Porto različite starosti: A– Porto (20 godina), B– Porto (3 godine), C– Porto (1 godina). Označeni signali odgovaraju: glukozi (1), neidentificiranim mogućim disaharidima (2), etanolu (3) i metanolu (4).<sup>23</sup>



Slika 7. Obradeni spektar DOSY visoke rezolucije, regije 4,9 –5,5 ppm, za vino Porto B (3 godine). Spektar je obraden da se smanji rezidualni signal vode kao i dodatno poboljša rezolucija te izvrši korekcija bazne linije. Označeni signali su: glukoza (1),  $^{13}\text{C}$  sateliti glukoze (2), neidentificirani monosaharid (3), neidentificirani disaharid (4), neidentificirani ugljikohidrati (5–8) te neidentificirani veći spojevi (9).<sup>23</sup>



Slika 8. Spektar DOSY visoke rezolucije regije 5,5 –10,0 ppm za vino Porto različite starosti: A– Porto (20 godina), B– Porto (3 godine), C– Porto (1 godina). Označeni signali odgovaraju: mravljoj kiselini (1), etanalu (2), neidentificiranom spoju  $M_r \approx 190$  (3), neidentificiranom spoju  $M_r \approx 70$  (4) i *p*-hidroksibenzojevoj kiselini (5).<sup>23</sup>

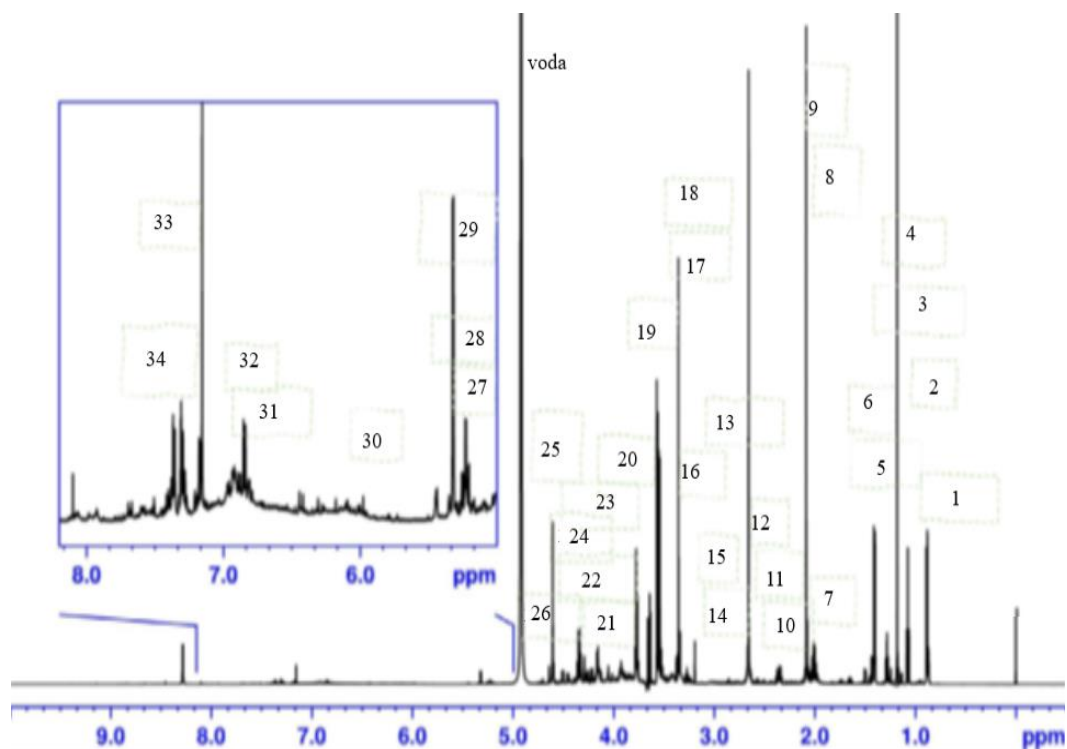
#### 4.5. Prednosti i nedostaci spektroskopije NMR

U analizi prehrambenih proizvoda, spektroskopija NMR koristi se za analizu kemijskog sastava, određivanje autentičnosti, geografskog podrijetla sastavnica te utjecaja procesiranja i skladištenja na kvalitetu. Tako je zabilježena upotreba spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR u metaboličkom profiliranju maslinovog ulja, čaja, krumpira, piva, mošta i vina. NMR se može koristiti za detekciju i kvantifikaciju kemijskih spojeva prisutnih u vinu, poput šećera, polifenola i organskih kiselina, iako se u tu svrhu često koriste i spregnute tehnike kao GC-MS, LC-MS itd. Prednost spektroskopije NMR u odnosu na druge tehnike je minimalno razaranje uzorka za

analizu kao i detekcija većine kemijskih spojeva iz samo jednog snimljenog spektra. Nadalje, znatno je jednostavnija priprema uzorka, čime se i smanjuje utjecaj tvari zaostalih uslijed potrebnih manipulacija te ubrzava cijeli proces. Osim toga, spektri NMR mogu se odmah obraditi jer su visoko reproducibilni te se gubi minimalna količina bitnih podataka. Nedostatak spektroskopije NMR je niža osjetljivost u odnosu na neke druge tehnike koje se koriste za analizu vina, poput tehnike MS, kao i nedostupnost spektrometara NMR u brojnim laboratorijima te skupocjenost njihova održavanja. Nadalje, potreban je obučeni stručnjak za rukovanje sa uređajem.<sup>1,5,13,27</sup>

## § 5. PRIMJENE SPEKTROSKOPIJE NMR U ANALIZI GROŽĐA I VINA

Za analizu vina poglavito se koriste spektrometri od 400, 500 ili 600 MHz, iako postoje spektrometri veće frekvencije (2020. godine proizveden je Brukerov spektrometar od 1,2 GHz).<sup>28</sup> Većinom se koristi spektroskopija  $^1\text{H}$  NMR, uslijed veće osjetljivosti u odnosu na  $^{13}\text{C}$  NMR. No, tehnike  $^{13}\text{C}$  NMR nalaze svoju primjenu u nekim metabolomičkim istraživanjima kao dodatak rezultatima dobivenima iz spektara  $^1\text{H}$  NMR. Prednost je spektroskopije  $^{13}\text{C}$  NMR veća rasprostranjenost frekvencija ugljika (između 0 i 220 ppm), u odnosu na frekvencije vodika koje se nalaze u rasponu od 0 do 12–20 ppm. Veći raspon frekvencija može poboljšati rezoluciju signala i smanjiti preklapanja do kojih dolazi kod složenih matrica kao što je vino. Upotreba spektroskopije  $^{13}\text{C}$  NMR predstavlja kompromis između vremena potrebnog za akviziciju zadovoljavajuće osjetljivosti i potrebne rezolucije. Na slici 9. prikazan je spektar  $^1\text{H}$  NMR komercijalnog vina te su asignirani pikovi kao i kemijski spojevi kojima pripadaju navedeni u tablici 2.<sup>5</sup>



Slika 9. Primjer spektra  $^1\text{H}$  NMR komercijalnog vina, uz asignirane signale prikazane u tablici

2.<sup>5</sup>

Tablica 2. Asignirani signali u spektru  $^1\text{H}$  NMR komercijalnog vina, prikazanog na slici 9.

Oznake: s–singlet, d–dublet, dd–dublet dubleta, t–triplet, m–multiplet.<sup>5</sup>

| asignacija pika | kemijski spoj           | $\delta$ / ppm | multipletnost |
|-----------------|-------------------------|----------------|---------------|
| 1               | izopentanol             | 0,88           | d             |
| 2               | valin                   | 1,04           | d             |
| 3               | butan-2,3-diol          | 1,14           | m             |
| 4               | treonin                 | 1,34           | d             |
| 5               | mliiječna kiselina      | 1,40           | d             |
| 6               | alanin                  | 1,49           | d             |
| 7               | prolin                  | 2,01           | m             |
| 8               | etil-acetat             | 2,07           | s             |
| 9               | octena kiselina         | 2,08           | s             |
| 10              | acetoin                 | 2,23           | s             |
| 11              | etanal                  | 2,24           | d             |
| 12              | GABA                    | 2,50           | t             |
| 13              | jantarna kiselina       | 2,65           | s             |
| 14              | jabučna kiselina        | 2,88           | dd            |
| 15              | limunska kiselina       | 2,96           | d             |
| 16              | kolin                   | 3,19           | s             |
| 17              | metanol                 | 3,34           | s             |
| 18              | izobutanol              | 3,36           | d             |
| 19              | glicerol                | 3,55           | dd            |
| 20              | manitol                 | 3,86           | dd            |
| 21              | fruktoza                | 4,01           | dd            |
| 22              | inozitol                | 4,05           | t             |
| 23              | etil-laktat             | 4,21           | d             |
| 24              | arabinoza               | 4,50           | d             |
| 25              | vinska kiselina         | 4,60           | s             |
| 26              | glukoza ( $\beta$ )     | 4,63           | d             |
| 27              | ksiloza                 | 5,17           | d             |
| 28              | glukoza ( $\alpha$ )    | 5,22           | d             |
| 29              | galaktouronska kiselina | 5,32           | d             |
| 30              | katehin                 | 6,09           | d             |
| 31              | šikiminska kiselina     | 6,81           | m             |
| 32              | tirozin                 | 6,88           | m             |
| 33              | galna kiselina          | 7,15           | s             |
| 34              | feniletil alkohol       | 7,29           | dd            |

## 5.1. Primjena spektroskopije NMR u analizi grožđa

### 5.1.1. Karakterizacija metaboloma grožđa

Istražena je upotreba spektroskopije NMR za karakterizaciju metaboloma bobica grožđa, odnosno njihovog kompleksnog kemijskog profila. Portugalska vina tradicionalno se proizvode kombinacijom nekoliko varijeteta, ali Touriga Nacional, Trincadeira i Aragonês koriste se u proizvodnji monovarijetalnih crnih vina te je stoga istražen značaj mikroklima i tla na njihov uzgoj. Uzgajivačima vinove loze bitne su karakteristike grožđa poput: veličine, boje, zrelosti, kiselosti te udjela hlapljivih i nehlapljivih komponenti. Spregom spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR i multivarijatne analize podataka, poput PCA i PLS-DA, uočene su razlike u stadijima razvoja navedenih portugalskih sorti.<sup>29</sup>

### 5.1.2. Istraživanje utjecaja terroira na sastav grožđa

Genetski i okolišni čimbenici esencijalni su za kvalitetu grožđa i vina čije se podrijetlo pak utvrđuje na dva načina. Prvi uključuje navođenje sorte grožđa na deklaraciji vina, dok drugi opisuje sve okolišne čimbenike, poput tla, klime i tehnika, a obuhvaćen je pojmom *terroir* (fr. tlo). *Terroir* uključuje dinamičke interakcije okolišnih faktora i onih vezanih uz sami uzgoj vina, a karakterizira specifičan vinograd kao i grožđe i vino proizvedeno na njemu. Varijabilnost koja se također može uočiti spektroskopijom  $^1\text{H}$  NMR jest i u sastavu kožice i pulpe grožđa, te je tako opažena razlika u grožđu iz 4 skupine Merlot noira, Cabernet Sauvignona i Cabernet franca, uzgojenih na različitim zemljištima u bordoškom području u Francuskoj.<sup>13</sup> Nadalje, upotrebom tehnike HRMAS NMR identificiran je primarni metabolom pulpe grožđa Aglianicone te su opažene promjene ovisno o lokaciji berbe odražavale razlike u lokalnom *terroiru*.<sup>30</sup>

Spektroskopija NMR visoke rezolucije uz vrtnju pri magičnom kutu (engl. *high-resolution magic-angle-spinning*, HRMAS) temelji se na smanjenju ili potpunom uklanjanju anizotropnih interakcija vrtnjom uzorka pri tzv. „magičnom kutu“ koji iznosi  $54,7^\circ$ . Tehnika se praktično primjenjuje smještanjem uzorka u cilindrični rotor koji se potom brzo vrti oko osi zakrenute za iznos „magičnog kuta“ u odnosu na smjer vanjskog magnetnog polja. Tehnika HRMAS NMR omogućava direktno dobivanje spektra NMR polu-krutih uzoraka poput svježeg biljnog tkiva, pri čemu se dolazi do metabolomičkog profila uzoraka. Posebno je pogodna jer ne zahtijeva prethodne ekstrakcije uzoraka.<sup>4,30–32</sup>

### 5.1.3. Istraživanje utjecaja tehnika uzgoja na sastav grožđa

Spektroskopijom  $^1\text{H}$  NMR istražen je sastav grožđa, ali i način kultivacije, odnosno upotreba biodinamičkih ili organskih metoda. Biodinamičke metode razlikuju se od organskih u upotrebi specifičnih fermentiranih pripravaka koji se primjenjuju na usjeve ili zemlju u malim količinama, kako bi se poboljšala njihova kvaliteta. Iako je analiza pokazala složen metabolički profil grožđa, distinkcija se zapravo temelji na svega nekoliko molekula. Tako je u organskom grožđu opažen viši udio šećera, kumarinske i kafeinske kiseline te  $\gamma$ -aminobutanske kiseline (GABA). Važnost mogućnosti distinkcije počiva na rastućoj potražnji za prirodnim prehrambenim proizvodima i time alternativnim strategijama njihove proizvodnje. Tako mnoge države imaju posebne regulacije o definiciji organskog vina, primjerice da ona potječu iz organskog grožđa uz ograničenu upotrebu sumporova dioksida tijekom procesa vinifikacije i skladištenja.<sup>27</sup>

Također, De Pascali i sur. analizirali su metabolički profil 32 crna vina iz talijanske regije Negroamaro primjenom spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR uz multivarijatnu statističku analizu te su usporedili tri tehnike proizvodnje vina: ultrazvučnu, kriomaceraciju sa suhim ledom i tradicionalnu.<sup>33</sup> Nadalje, promatrali su i razlike u uzgoju grožđa, obrađivanju tla ili upotrebi pokrovnog usjeva te su ustanovili da razlike u tehnikama koje utječu na gospodarenje zemljom značajnije doprinose identitetu vina u odnosu na razlike u samim tehnikama proizvodnje vina.

## 5.2. Primjena spektroskopije NMR u analizi vina

### 5.2.1. Grupiranje i usporedba uzoraka vina

Zahvaljujući svojoj popularnosti, vino je podložno različitim manipulacijama: dodatcima aditiva, stabilizatora, aroma, šećera i dr.<sup>34</sup> Stoga je potražnja kupaca za proizvode certificirane izvornosti i geografskog podrijetla u novije vrijeme sve veća. U svrhu diferencijacije podrijetla vina koja dolaze iz različitih regija učestalo se koristi multivarijatna statistička analiza brojnih kemijskih parametara. Prikupljanje većeg broja varijabli vremenski je zahtjevno i učestalo uključuje pripremu uzorka, no kad se koristi spektroskopija NMR, omogućena je simultana detekcija velikog broja organskih spojeva koji su prisutni u vinu.

Primjerice, tehnike  $^{13}\text{C}$  NMR mogu se iskoristiti za detekciju šećera i kiselina. Aminokiseline prisutne u vinima mogu se identificirati spektroskopijom  $^1\text{H}$  NMR, te je opažena razlika u njihovom sastavu za slovenska vina, ovisno o regiji Slovenije iz koje su potjecala.<sup>35</sup> Metaboličko profiliranje vina iskorišteno je i u svrhu grupiranja i usporedbe uzoraka vina koji potječu iz talijanske regije Apulije.<sup>36</sup> Vina su se mogla podijeliti na ona koja dolaze iz sjevera,



središta ili juga Apulije, a uzrok većinske diskriminacije podataka bili su teški metali i aminokiseline.

Spektroskopija NMR može poslužiti i kao alat za promatranje i kontroliranje bioloških procesa koji se odvijaju tijekom proizvodnje vina, poglavito alkoholne i malolaktične fermentacije. U istraživanju procesa proizvodnje vina u španjolskoj regiji Rioja, koristeći  $^1\text{H}$  NMR metabolomičko profiliranje i kemometriju uspješno su diferencirana vina pojedinog dijela Rioje.<sup>6</sup>

#### 5.2.2. Varijetalna klasifikacija vina

Spektri NMR mogu pokazivati genotipske varijacije među pojedinim varijetetima vina čak i kad su genetski blisko povezani. Tako je u istraživanjima sorti grožđa određena genetička povezanost nekih komercijalno bitnih sorti. Primjerice, proučavanjem spektara  $^1\text{H}$  NMR uočena je srodnost između Cabernet Sauvignona, Merlota i Ruby Caberneta. Osim toga, opažena je i srodnost Zinfandela, sorte podrijetlom iz Hrvatske gdje je poznata i kao Tribidrag ili Crljenak kaštelanski, i Shiraza, iako su te dvije sorte genetski udaljenije.<sup>7</sup>

#### 5.2.3. Određivanje sadržaja octene kiseline u vinu

Vino se kvari uslijed stvaranja octene kiseline tijekom oksidacije etanola katalizirane bakterijama *acetobacter* u prisutnosti kisika. Nepravilne metode začepljivanja boca vina ili nekvalitetni čepovi mogu dovesti do ulaska kisika u bocu i time utjecaja na kvalitetu skupocjenog vina. Spektroskopijom NMR može se odrediti sadržaj octene kiseline u vinu i bez otvaranja same boce, zahvaljujući postojećoj sondi NMR i stalnom magnetskom polju koje homogeno obuhvaća cijelu bocu. Time se ni na koji način ne uništava začepljena boca niti sami čep, čime se omogućava analiza vrlo skupih vina bez otvaranja boce koje bi dovelo do pada njihove vrijednosti. Prilikom analize sadržaja octene kiseline u vinu spektroskopijom  $^1\text{H}$  NMR mjere se intenziteti signala vode, etanola i octene kiseline.<sup>37</sup>

#### 5.2.4. Praćenje promjene koncentracije različitih spojeva tijekom fermentacije vina

Praćenje procesa fermentacije može doprinijeti unapređenju procedura za kontrolu kvalitete proizvodnje vina. Primjerice, mogu se pratiti koncentracije jabučne i mliječne kiseline tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije. Avenoz i sur. istražili su simultanu kvantifikaciju navedenih kiselina u rasponu 1–3,2 mmol/L.<sup>38</sup> Razina jabučne kiseline predstavlja važan faktor

kvalitete crnih vina, te se za određena vina komercijalno prihvatljivim smatraju samo niže koncentracije jabučne kiseline (0,4–0,5 g/L). U nekim se slučajevima može odvititi pretvorba jabučne kiseline u octenu, te se upotrebom spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR takva pretvorba može i pratiti.

#### 5.2.5. Procjena kvalitete različitih uvjeta starenja vina

Antioksidansi su aktivni kemijski spojevi koji mogu „zarobiti“ slobodne radikale koji u mnogim prehrambenim proizvodima i biološkim sustavima mogu biti prisutni kao štetne visoko reaktivne vrste. Mjerenjem antioksidirajuće aktivnosti i usporedbom 1D i 2D spektara NMR, Oliveira i sur. usporedili su različite metode starenja vina, odnosno uobičajenu i prisilnu uslijed mijenjanja određenih parametara (temperature i sadržaja kisika).<sup>39</sup> Signali u spektrima  $^1\text{H}$  NMR asignirani su uz potvrdu spektrom COSY, a asignacija u spektrima  $^{13}\text{C}$  NMR potvrđena je u spektrima HSQC i HMBC.

#### 5.2.6. Detekcija čaptalizacije i tehnika SNIF-NMR

G. J. Martin i M. L. Martin 1980-ih godina uveli su novu tehniku, SNIF-NMR (engl. *site-specific natural isotope fractionation-nuclear magnetic resonance*) ili poznatu i kao irm-NMR (engl. *isotopic ratio measurement by NMR*). SNIF-NMR prvenstveno je osmišljen u svrhu detekcije čaptalizacije, odnosno dodatka šećera moštu prije početka fermentacije, a omogućuje određivanje izotopnih omjera u analitu.

Iako je teže promatrati rezonanciju deuterijeve jezgre ( $^2\text{H}$ ) u odnosu na protonsku ( $^1\text{H}$ ), uslijed njene male prirodne zastupljenosti (0,015%) i manjeg žiromagnetskog omjera,  $^2\text{H}$  jezgre imaju mali kvadrupolni moment te i dalje mogu proizvesti spektre visoke rezolucije sa prihvatljivom osjetljivošću. Tehnika SNIF-NMR ne provodi se direktno na uzorku vina, već se kao ciljani analit iz vina destilacijom izolira etanol. Određuje se omjer  $^2\text{H}$  i  $^1\text{H}$  za metilne skupine etanola, koji je povezan sa podrijetlom šećera, te drugi omjer za metilenske skupine etanola koji pak upućuje na klimatsko i regionalno podrijetlo vina. Tako se na temelju tehnike SNIF-NMR može ustanoviti i vrsta šećera koji je dodan vinu, primjerice je li riječ o šećeru iz cikla ili šećernoj trski te geografski klasificirati uzorke vina.<sup>1,40</sup>

---

### 5.2.7. Ostale primjene

Spektroskopija NMR može se koristiti i za istraživanje razlika u sastavu u vinima nastalima iz grožđa kontaminiranog različitim mikroorganizmima. Spektroskopija NMR poslužila je i kao dobra analitička tehnika za uspostavu poveznice između metaboloma i svih parametara koji utječu na kvalitetu vina poput: sorte grožđa, tehnike uzgoja i proizvodnje, *terroira*, osjetnog profila, godine berbe i starenja. Dvodimenzijskim tehnikama NMR određena je kompleksna struktura antocijanina prisutnih u grožđu i vinu, kao i produkti antocijanina i flavan-3-ola koji dovode do promjene boje vina. Identificirane su i molekule koje utječu na arome vina, poput onih navedenih u tablici 1. Spektroskopijom HRMAS  $^1\text{H}$  NMR i drugim 2D tehnikama NMR, u kombinaciji sa cirkularnim dikroizmom (engl. *circular dichroism*, CD), MS i molekulskim modeliranjem istražene su interakcije tanina crvenog vina i proteina ljudske slinje kao uzročnika oporosti vina opisane kao „suhoće u ustima“.<sup>1,41,42</sup>

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. M. Viskiđ, L. Maslov Bandiđ, A. Jagatiđ Korenika, A. Jeromel, *Foods* **10** (2021) 120, 1–21, doi: <https://doi.org/10.3390/foods10010120>.
2. [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes/geographical-indications-and-quality-schemes-explained\\_en](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes/geographical-indications-and-quality-schemes-explained_en) (datum pristupa: 15. svibnja 2023.)
3. Á. D. N. Sárđy, M. Ladányi, Z. Varga, Á. P. Szövényi, R. Matolcsi, *Diversity* **14** (2022) 74, 1–16, doi: <https://doi.org/10.3390/d14020074>.
4. P. Novak, T. Jednađak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varađdin, Varađdin, 2013, str. 5, 7, 13, 14, 40, 41, 45, 48, 49, 59.
5. J. V. Fonayet, G. Loupit, T. Richard, *Adv. Bot. Res.* **98** (2021) 297–357.
6. E. López-Rituerto, F. Savorani, A. Avenoza, J. H. Busto, J. M. Peregrina, S. B. Engelsen, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 3452–3461.
7. B. Hu, Y. Yue, Y. Zhu, W. Wen, F. Zhang, J. W. Hardie, *PloS ONE* **10** (2015), 1–16, doi: 10.1371/journal.pone.0142840.
8. A. Panighel, R. Flamini, *Molecules* **19** (2014) 21291–21309.
9. S. E. Ebeler, *Food Rev. Int.* **17** (2001) 45–64.
10. J. T. W. E. Vogels, A.C. Tas, F. van den Berg, J. van der Greef, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **21** (1993) 249–258.
11. R. Godelmann, F. Fang, E. Humpfer, B. Schütz, M. Bansbach, H. Schäfer, M. Spraul, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 5610–5619.
12. P. Mazzei, N. Francesca, G. Moschetti, A. Piccolo, *Anal. Chim. Acta* **673** (2010) 167–172.
13. G. E. Pereira, J. Gaudillere, C. Van Leeuwen, G. Hilbert, O. Lavalie, M. Maucourt, C. Deborde, A. Moing, D. Rolin, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 6382–6389.
14. S. M. Azcarate, L. D. Martinez, M. Savio, J. M. Camiña, R. A. Gil, *Food Control* **57** (2015) 268–274.
15. E.-I. Geană, C. T. Ciucure, C. Apetrei, V. Artem, *Molecules* **24** (2019) 4166, 1–15, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24224166>.
16. D. A. Magdas, F. Guyon, I. Feher, S. C. Pinzaru, *Food Control* **85** (2018) 385–391.
17. K. Fraige, E. R. Pereira-Filho, E. Carrilho, *Food Chem.* **145** (2014) 395–403.

18. P. Alberts, M. A. Stander, A. de Villiers, *J. Chromatogr. A* **1235** (2012) 92–102.
19. M. Amargianitaki, A. Spyros, *Chem. Biol. Technol. Agric.* **4** (2017) 126–138.
20. E. J. Waters, Z. Peng, K. F. Pocock, G. P. Jones, P. Clarke, P. J. Williams, *J. Agric. Food Chem.* **42** (1994) 1761–1766.
21. S. Prakash, N. Iturmendi, A. Grelard, V. Moine, E. Dufourc, *Food Chem.* **199** (2016) 229–237.
22. Y. B. Monakhova, H. Schäfer, E. Humpfer, M. Spraul, T. Kuballa, D. W. Lachenmeier, *Magn. Reson. Chem.* **49** (2011) 734–739.
23. M. Nilsson, I. F. Duarte, C. Almeida, I. Delgadillo, B. J. Goodfellow, A. M. Gil, G. A. Morris, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 3736–3743.
24. H. S. Son, M. K. Ki, F. Van Den Berg, G. S. Hwang, W. M. Park, C. H. Lee, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 8007–8016.
25. C. Absalon, S. Fabre, I. Tarascou, E. Fouquet, I. Pianet, *Anal. Bioanal. Chem.* **401** (2011) 1485–1495.
26. R. Cao, F. Komura, A. Nonaka, T. Kato, J. Fukumashi, T. Matsui, *Anal. Sci.* **30** (2014) 383–388.
27. G. Picone, A. Trimigno, P. Tessarin, S. Donnini, A. D. Rombolà, F. Capozzi, *Food Chem.* **213** (2016) 187–195.
28. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mr/nmr/ascend-ghz-class.html> (datum pristupa: 19. svibnja 2023.)
29. K. Ali, F. Maltese, A. M. Fortes, M. S. Pais, Y. H. Choi, R. Verpoorte, *Food Chem.* **124** (2011) 1760–1769.
30. P. Mazzei, G. Celano, A. M. Palese, E. Lardo, M. Drosos, A. Piccolo, *Food. Chem.* **283** (2019) 215–223.
31. C. Van Leeuwen, P. Friant, X. Choné, O. Tregoat, S. Koundouras, D. Dubourdieu, *Am. J. Enol. Vitic.* **55** (2004) 207–217.
32. V. N. Bandaru, P. Kumar, R. R. Reddy, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **99** (2020) 1–56.
33. S. A. De Pascali, A. Coletta, L. Del Coco, T. Basile, G. Gambacorta, F. P. Fanizzi, *Food Chem.* **161** (2014) 112–119.
34. A. Rajchl, H. Čížková, M. Voldřich, D. Lukešová, Z. Panovská, *Czech J. Food Sci.* **27** (2009) 259–266.
35. I. J. Košir, J. Kidrič, *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 77–84.

36. M. A. Brescia, V. Caldarola, A. De Giglio, D. Benedetti, F. P. Fanizzi, A. Sacco, *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 177–186.
37. A. J. Weekly, P. Bruins, M. Sisto, M. P. Augustine, *J. Magn. Reson.* **161** (2003) 91–98.
38. A. Avenoza, J. H. Busto, N. Cana, J. M. Peregrina, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 4715–4720.
39. C. M. Oliveira, A. C. S. Ferreira, P. G. de Pinho, A. M. S. Silva, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 10326–10331.
40. G. J. Martin, B. L. Zhang, N. Naulet, M. L. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 5116–5122.
41. S. Remy-Tanneau, C. Le Guernevé, E. Meudec, V. Cheynier, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 3592–3597.
42. C. Simon, K. Barathieu, M. Laguerre, J. Schmitter, E. Fouquet, I. Pianet, E. J. Dufourc, *Biochemistry* **42** (2003) 10385–10395.