

Hlapljivi spojevi bijelog i žutog muškata

Kirić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:858144>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

HLAPLJIVI SPOJEVI BIJELOG I ŽUTOG MUŠKATA
ZAVRŠNI RAD

MARIJA KIRIĆ

Matični broj:338

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

HLAPLJIVI SPOJEVI BIJELOG I ŽUTOG MUŠKATA
ZAVRŠNI RAD

MARIJA KIRIĆ

Matični broj:338

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

VOLATILE COMPOUNDS OF WHITE AND YELLOW MUSCAT
WINES
BACHELOR THESIS

MARIJA KIRIĆ

Parent number:338

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

HLAPLJIVI SPOJEVI BIJELOG I ŽUTOG MUŠKATA

Marija Kirić, 338

Sažetak:

Muškatna vina karakteriziraju tipične cvjetne i voćne arome, koje uglavnom potječu iz grožđa. Muškat je jedino grožđe od kojeg se dobiva vino koje zapravo ima okus poput samog grožđa. Dvije sorte muškata, muškat bijeli i muškat žuti, berbe 2019, proizvedeni su u Vinskoj kući Kirić u Ludbreškim Vinogradima. Za izolaciju hlapljivih aromatičnih spojeva, korištene su dvije metode, ekstrakcija tekuće-tekuće sa smjesom otapala pentan:dietil-eter, (2:1 v/v) i tehnika vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni uzorci analizirani su pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS.

Vršne pare oba muškatna vina sadržavaju veće koncentracije spojeva arome fermentacije poput estera masnih kiselina i acetatnih estera (etil-oktanoat, etil-dekanoat i izoamil acetat), masnih kiselina (oktanska, dekanska i oktadec-9-enska kiselina) i višeg alkohola izoamilnog alkohola. Uzorci dobiveni ekstrakcijom tekuće-tekuće sadržavaju veće koncentracije spojeva koji su formirani tijekom alkoholne fermentacije, poput 2-feniletanola i dietil-sukcinata u bijelom muškatu, kao i spojeve nastale tijekom zrenja i odležavanja vina, kao što su derivati furana u žutom muškatu. Spojevi primarne arome, posebno dva monoterpenska alkohola linalol i α -terpinol, identificirani su u vrlo malim količinama samo u uzorcima izoliranim HS-SPME metodom.

Ključne riječi: muškat, spojevi arome, HS-SPME metoda, ekstrakcija tekuće-tekuće, GC-MS

Rad sadrži: 41 stranica, 21 slika, 2 tablice, 17 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Marina Zekić	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član
3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	član - mentor

Datum obrane: 18. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28

Mentor: Anđ Radonić, PhD, associate professor

Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

VOLATILE COMPAUNDS OF WHITE AND YELLOW MUSCAT WINES

Marija Kirić, 338

Abstract:

Muscat wines are characterized by typical floral and fruity aromas, which are mostly of grape origin. Muscat is the only wine grape that produces wine that actually tastes like the grape itself. Two varieties of Muscat wines, Muscat white and Muscat yellow, harvest 2019, were produced in Vinska kuća Kirić in the Ludbreg vineyards. For the isolation of volatile aroma compounds, two isolation methods were used, the liquid-liquid extraction with solvent mixture pentane:diethyl ether, (2:1 v/v) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The obtained samples were analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS.

The headspaces of both Muscat wines contained higher concentrations of fermentation aroma compounds such as fatty acid esters and acetate esters (ethyl octanoate, ethyl decanoate and isoamyl acetate), fatty acids (octanoic, decanoic and octadec-9-enoic acid), and higher alcohol isoamyl alcohol. Samples obtained by liquid-liquid extraction were characterized by higher concentration of compounds formed during alcoholic fermentation, such as 2-phenylethanol and diethyl succinate in Muscat white, as well as compounds formed during wine ripening and ageing, such as furane derivatives in Muscat yellow. Primary aroma compounds, namely two monoterpene alcohols linalool and α -terpineol, were identified in very small amounts only in samples obtained by HS-SPME method.

Keywords: Muscat wines, aroma compounds, HS-SPME method, liquid-liquid extraction, GC-MS

Thesis contains: 41 pages, 21 figures, 2 tables, 17 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Marina Zekić - PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Zvonimir Marijanović - PhD, assistant prof. | member |
| 3. Anđ Radonić - PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: September 18th 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od srpnja do rujna 2020. godine.

Veliku zahvalnost dugujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na strpljenju, savjetima i susretljivosti pri izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem i doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći kod eksperimentalnog dijela rada.

Na kraju zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su bili najveća podrška i bez kojih ovo postignuće ne bi bilo moguće.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Odrediti aromatični profil vina bijelog i žutog muškata, odnosno izolirati i identificirati hlapljive spojeve
- Izolaciju hlapljivih spojeva provesti metodama mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi i kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće
- Analizu hlapljivih spojeva provesti vezanom tehnikom plinska kromatografija-masena spektroskopija

SAŽETAK

Muškatna vina karakteriziraju tipične cvjetne i voćne arome, koje uglavnom potječu iz grožđa. Muškat je jedino grožđe od kojeg se dobiva vino koje zapravo ima okus poput samog grožđa. Dvije sorte muškata, muškat bijeli i muškat žuti, berbe 2019, proizvedeni su u Vinskoj kući Kirić u Ludbreškim Vinogradima. Za izolaciju hlapljivih aromatičnih spojeva, korištene su dvije metode, ekstrakcija tekuće-tekuće sa smjesom otapala pentan:dietil-eter, (2:1 v/v) i tehnika vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni uzorci analizirani su pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS.

Vršne pare oba muškatna vina sadržavaju veće koncentracije spojeva arome fermentacije poput estera masnih kiselina i acetatnih estera (etil-oktanoat, etil-dekanoat i izoamil acetat), masnih kiselina (oktanska, dekanska i oktadec-9-enska kiselina) i višeg alkohola izoamilnog alkohola. Uzorci dobiveni ekstrakcijom tekuće-tekuće sadržavaju veće koncentracije spojeva koji su formirani tijekom alkoholne fermentacije, poput 2-feniletanola i dietil-sukcinata u bijelom muškatu, kao i spojeve nastale tijekom zrenja i odležavanja vina, kao što su derivati furana u žutom muškatu. Spojevi primarne arome, posebno dva monoterpenska alkohola linalol i α -terpinol, identificirani su u vrlo malim količinama samo u uzorcima izoliranim HS-SPME metodom.

Ključne riječi: muškat, spojevi arome, HS-SPME metoda, ekstrakcija tekuće-tekuće, GC-MS

SUMMARY

Muscat wines are characterized by typical floral and fruity aromas, which are mostly of grape origin. Muscat is the only wine grape that produces wine that actually tastes like the grape itself. Two varieties of Muscat wines, Muscat white and Muscat yellow, harvest 2019, were produced in Vinska kuća Kirić in the Ludbreg vineyards. For the isolation of volatile aroma compounds, two isolation methods were used, the liquid-liquid extraction with solvent mixture pentane:diethyl ether, (2:1 v/v) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The obtained samples were analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS.

The headspaces of both Muscat wines contained higher concentrations of fermentation aroma compounds such as fatty acid esters and acetate esters (ethyl octanoate, ethyl decanoate and isoamyl acetate), fatty acids (octanoic, decanoic and octadec-9-enoic acid), and higher alcohol isoamyl alcohol. Samples obtained by liquid-liquid extraction were characterized by higher concentration of compounds formed during alcoholic fermentation, such as 2-phenylethanol and diethyl succinate in Muscat white, as well as compounds formed during wine ripening and ageing, such as furane derivatives in Muscat yellow. Primary aroma compounds, namely two monoterpene alcohols linalool and α -terpineol, were identified in very small amounts only in samples obtained by HS-SPME method.

Keywords: Muscat wines, aroma compounds, HS-SPME method, liquid-liquid extraction, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1.OPĆI DIO	2
1.1. Vinova loza	2
1.2. Grožđe	2
1.2.1. Mehanički sastav grožđa	3
1.3. Vino.....	3
1.3.1. Podjela vina.....	4
1.3.2. Kemijski sastav vina	5
1.4. Aroma vina.....	9
1.4.1. Primarna aroma vina	10
1.4.2. Ostali spojevi arome vina	15
1.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva vina.....	17
1.5.1. Sorpcijske tehnike	18
1.5.2. Ekstrakcija otapalom	19
1.6. Analiza hlapljivih spojeva.....	21
1.6.1. Kromatografija	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	26
2.1. Uzorak vina	26
2.2. Aparatura i kemikalije.....	26
2.3. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	26
2.4. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	27
2.5. GC - MS analiza hlapljivih spojeva	28
3. REZULTATI.....	30
3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva	30
4. RASPRAVA	33
4.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	33
4.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	35
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURA.....	40

UVOD

Uzgoj vinove loze i umijeće spravljanja vina čovječanstvu su poznati nekoliko tisuća godina, a pretpostavka je da potječe iz Male Azije. Prije pojave vinove loze postojale su biljke slične vinovoj lozi. Fosilni ostaci tih biljaka dokaz su njihova postojanja, pronađeni su u Europi, Americi i Aziji, a u Hrvatskoj u blizini Krapine. Plemenita vinova loza (*Vitis vinifera* L.) nastala je križanjem u prirodi. Čovjek je tokom povijesti križanjem i uzgojem stvorio mnogobrojne sorte.

Vino je visoko cijenjeno piće koje se proizvodi od groždanog soka. Feničani i Egipćani koristili su vino pri vjerskim obredima i pučkim svečanostima, dok su Grci i Rimljani imali svoje vlastite vinske bogove, Dioniza i Bakha. Kršćani su jedino vino smatrali dostojnim da ga tijekom službe Božje koriste kao krv Kristovu. Vinovu lozu držali su posvećenom biljkom koju je na Zemlju postavio sam Stvoritelj. Vino je bila univerzalna medicina koja upotrebljavana izvana hladi, a uzimana na usta grije. Služilo je kao lijek i sredstvo za umirenje, bilo je izvor vitamina i kalorija, a u doba loše i nekvalitetne prehrane bilo je važan dodatak hrani.^{1,2}

Aroma grožđa, mošta i vina, koju čine hlapljivi i nehlapljivi spojevi, nije dovoljno istražena te se novim istraživanjima nastoji odgovoriti na mnoga značajna i vrlo složena pitanja. Različite sorte vinove loze u grožđu sadrže različite aromatične spojeve na čiji sastav utječu mnogobrojni čimbenici poput: klimatskih uvjeta, sastava tla, stupnja zrelosti grožđa te tehnoloških postupaka berbe i prerade. Sadržaj ukupnih spojeva arome u vinu veoma je malen, ali ima velik utjecaj na senzornu ocjenu vina. Najviše aromatičnih spojeva sadrže izrazito aromatične sorte poput muškata, cabernet sauvignona, rizlinga, traminca.³

1.OPĆI DIO

1.1. Vinova loza

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je trajna penjačica iz porodice lozica (Vitaceae) čija stabljika može narasti i do 20 metara. Grane se penju pomoću vitica, a kod starijih biljaka javlja se uzdužno ljuštenje kore. Listovi su zeleni, urezani na nekoliko režnjeva, grubo nazubljenih rubova te dugi 7-15 centimetara. Cvjetovi su sitni, žućkasto zelene boje formirani u gusti grozdasti cvat. Plodovi su okrugle bobice slatko-kiselkastog okusa, a boja varira od žute do tamnocrvene ovisno o sorti grožđa.⁴

Smatra se da na svijetu postoji preko 2000 sorti vinove loze, a otprilike polovica njih ima komercijalno značenje. Svaka sorta definirana je vlastitom bojom, veličinom bobica, aromom, odnosom šećera i kiselina i dr. Neke od najznačajnijih bijelih vinskih sorta grožđa su chardonnay, graševina, pinot, sauvignon te mnogi drugi. Kod crnih sorti najznačajniji su cabernet sauvignon, merlot, crni pinot, syrah.¹

Bijeli i žuti muškati pripadaju među najstarije sorte vinove loze. Osim ovih dviju sorti muškata postoji još oko 200 varijacija muškata. Kod nas su ove sorte najraširenije u podregiji Zagorje-Međimurje, Hrvatskom primorju i Istri te Vinodolu. Trs muškata je srednje bujnosti, a odlične rezultate postiže na vapnenim i toplim tlima, brežuljkastog reljefa, južnih i toplih ekspozicija. Grozd je srednje velik, zbijen s okruglim bobicama. Otporni su na bolest sivu plijesan te zbog toga mogu duže ostati na čokotu. To rezultira nakupljanjem veće količine šećera i dobivanjem desertnog muškarnog vina. Količina šećera u grožđu muškata varira od 17 do 21 %, a ukupne kiseline od 5,6 do 8 g/L. Vina su zelenkasto-žute boje s izraženom muškarnom aromom i obično s ostatkom neprovrelog šećera.⁵

1.2. Grožđe

"Grožđe je zdrav, zreo, prezreo, prosušen ili prirodno smrznut plod vinove loze priznatih kultivara namijenjen proizvodnji vina ili drugih proizvoda od grožđa i vina, a čiji sok sadrži minimalnu količinu šećera od 64° Oechsle." (Narodne novine, Zakon o vinu, 96/03).

Grožđe je plod vinove loze koje se može jesti svježe, kao stolno grožđe ili se može upotrijebiti za proizvodnju vina, soka, groždica, ulja od sjemenki i mnogih drugih proizvoda.⁶

1.2.1. Mehanički sastav grožđa

Mehanički sastav grozda svojstven je svakoj sorti, a čini ga peteljkovina te bobica, dok bobicu čini kožica, sjemenke i meso.

Peteljkovina je pri punoj zrelosti grožđa drvenasta, čini 2-8% mase grozda i utječe na kemijski sastav vina. Sadrži malo šećera, 5-7% mineralnih spojeva, od čega najviše sadrži kalija. Peteljka sadrži veliku količinu topljivih polifenolnih spojeva, što je izraženo kod crnih sorti. Ako se peteljka ne ukloni u primarnoj preradi grožđa, vina imaju manju kiselost jer ekstrahirani kalijev kation veže vinsku kiselinu i taloži se kao tartarat.

Kod zrelog grozda bobica čini 92-98% mase grozda. Po veličini i obliku bobica razlikuju se sorte, a u pravilniku vinske sorte imaju sitnije bobice od zobatica. Kožica bobice ima elastične stanice, a sorte se razlikuju i po debljini kože. Prekrivena je voštanim slojem koji sadrži eterična ulja i spoj metilni ester antranilne kiseline. Kožica je siromašna šećerima i kiselinama, ali sadrži dosta mineralnih tvari, aromatičnih i dušikovih spojeva te pigmenata. Crne sorte sadrže i modrocrvne pigmente antocijane. Sjemenke sadrže do 16% ulja, 65-70% linolenske kiseline i 0,1% vitamina E. Od čvrstih dijelova grozda sjemenke sadrže najviše taninskih spojeva koji su smješteni u njihovom vanjskom omotaču te lako prelaze u masulj tijekom maceracije. Meso bobice ima velike stanice koje su ispunjene sokom, stoga unutrašnji dio bobice u najvećem dijelu čini groždani sok ili mošt.¹

1.3. Vino

Vino je poljoprivredno prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg, i za preradu u vino pogodnoga, grožđa (Narodne novine, Zakon o vinu, 96/03).

Vino je vrlo kompleksan proizvod na što ukazuju najnovija istraživanja koja pokazuju da vino sadrži više od 1200 hlapljivih i nehlapljivih spojeva, od kojih neki još do danas nisu identificirani. Na raznolikost velikog broja spojeva utječu mnogi čimbenici:

- prirodni čimbenici: sorta (kultivar), klima i tlo
- utjecaj čovjeka vinogradara-podrumara: gnojidba, zaštita od bolesti i štetnika, opterećenje loze, berba
- tehnološki postupak proizvodnje vina.^{1,2}

1.3.1. Podjela vina

Vino se može podijeliti na nekoliko načina, prema sorti, podrijetlu, kemijskom sastavu, vremenu i načinu berbe, tehnološkom postupku proizvodnje, namjeni i po drugim osnovama. Prema Zakonu o vinu, NN 96/2003, vina se dijele na:

Vina u užem smislu riječi:

- mirna vina,
- pjenušava vina,
- biser vina,
- gazirana vina,

Specijalna vina:

- desertna vina,
- aromatizirana vina,
- likerska vina.

Po boji vina se dijele na bijela, ružičasta (rose, opolo) i crna (crvena).

Po sadržaju neprovrelog šećera vina se dijele:

- Mirna vina: suha, polusuha, poluslatka i slatka,
- Pjenušava, biser i gazirana vina: vrlo suha, suha, polusuha, poluslatka i slatka.

Po kakvoći mirna se vina dijele na:

- Stolna vina: - stolno vino bez oznake zemljopisnog podrijetla,
- stolno vino s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom,
- Kvalitetna vina: - kvalitetno vino s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom,
- Vrhunska vina: - vrhunsko vino s kontroliranih i ograničenih vinorodnih područja,
- vrhunsko vino s kontroliranih i ograničenih specifičnih vinorodnih područja,
- predikatna vina s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom.⁷

1.3.2. Kemijski sastav vina

Svi spojevi vina potječu od grožđa. Neki spojevi nepromijenjeni ulaze u vino, a velik broj ih se sintetizira tijekom alkoholne fermentacije ili u malolaktičnoj fermentaciji, dok ih se dio formira tijekom dozrijevanja vina.

Kakvoća vina uvjetovana je njegovim kemijskim sastavom. Međusobni odnos nekih sastojaka vina ukazuje na prirodnost vina, a neki ukazuje na zdravstveno stanje vina.

Stanica kvasca u fermentaciji sintetizira aktivne spojeve koje su podijeljeni u šest glavnih skupina: hlapljivi esteri, fenolni spojevi, karbonilni spojevi, spojevi koji sadrže sumpor, viši alkoholi i organske kiseline.

Hlapljivi spojevi odgovorni su za formiranje mirisa vina. Velika većina ih se formira tijekom alkoholne fermentacije u kojoj kvasac proizvodi širok raspon aromatičnih aktivnih supstanci koje su bitne za složenu aromu fermentiranih pića.

Nehlapljivi spojevi vina sastavni su dio ekstrakta vina. Spojevi kao što su organske kiseline, mineralni spojevi, polifenoli, glicerol, dušikovi spojevi, pektini, pigmenti i drugi, sudjeluju u formiranju okusa vina. Fenolni spojevi mogu sudjelovati u mirisnim značajkama, boji i okusu vina.^{1,2}

VODA

Vino sadrži biološki najčišću vodu te je ona glavni sastojak vina. Udio vode mijenja se u ovisnosti o udjelu alkohola. Prosječno vina imaju 12 vol.% alkohola pa na

vodu otpada oko 85 vol.%. Veliki udio vode daje veliku sposobnost otapanja različitih spojeva u vinu prvenstveno alkohola, kiselina, soli te male količine ulja, voska i drugih sličnih sastojaka.⁸

ALKOHOLI

Metabolizmom šećera nastaju etanol, glicerol, viši alkoholi i butan-2,3-diol. Metanol (metil-alkohol) oslobađa se razgradnjom pektina, a neki viši alkoholi nastaju biokemijskom transformacijom aminokiselina.

Etanol je drugi najzastupljeniji sastojak vina, a njegov udio u vinima varira. U suhim vinima nalazi se 12-14 vol. % etanola. Etanol je glavni produkt alkoholne fermentacije šećera, a nastaje metaboličkom aktivnošću kvasaca koji reduciraju acetaldehid uz oslobađanje ugljikovog dioksida. Fermentacijom šećera najčešće nastaje do 16 vol. % alkohola, a za nastanak 1 vol. % alkohola kvasci trebaju razgraditi 16-17 g šećera.

Metanol je jednovalentni alkohol koji nastaje tijekom muljanja grožđa enzimskom hidrolizom pektina. Za vrijeme fermentacije koncentracija metanola ostaje konstantna. Stupanj zrelosti grožđa, način berbe, postupak prerade, odnosno duljina maceracije utječu na količinu metanola u vinu. Visoke koncentracije metanola djeluju toksično na ljudski organizam.

Glicerol je trovalentni alkohol s tri hidroksilne skupine te je količinski najvažniji sekundarni produkt alkoholne fermentacije. Nastaje redukcijom dihidroxiaceton-fosfata u prvoj fazi fermentacije. Količina glicerola u vinu ovisi o sastavu mošta, tj. o sadržaju šećera, vrsti kvasaca, temperaturi i tijeku fermentacije. Glicerol uvelike utječe na okus vina dajući mu slatkoću, punoću i zaobljenost. Sastavni je dio ekstrakta vina.

Viši alkoholi imaju vrelište više od etanola. Ishodni spojevi za biosintezu viših alkohola su aminokiseline i šećeri. Najveća količina viših alkohola nastaje enzimskim reakcijama dekarboksilacije i deaminacije određenih aminokiselina, a manje količine nastaju iz šećera. Izopentanol (izoamilni alkohol), pentan-1-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, heksan-1-ol i 2-feniletanol su najvažniji viši alkoholi vina. Oni izravno sudjeluju u

formiranju mirisa vina jer reakcijom esterifikacije s kiselinama daju hlapljive estere voćnih mirisa. Viši alkoholi utječu na aromu tako da povišuju hlapljivost drugih spojeva vina, ali njihova visoka koncentracija je nepoželjna jer neki imaju neugodan i oštar miris.¹

ŠEĆERI

Šećeri (ugljikohidrati) nastaju iz vode i ugljikova dioksida djelovanjem sunčeve svjetlosti u procesu fotosinteze. Dije se monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Neproverli šećer u vinu ostaje ciljanim prekidanjem vrenja te utječe na kiselost i gorčinu vina.

Pentoze su monosaharidi koji sadrže 5 ugljikovih atoma. U vinu je prisutno oko 11 pentoza, a najzastupljenije su arabinoza, ramnoza i ksiloza. Pentoze nastaju degradacijom pektina, aminošećera i polisaharida u vinu. Kvasci pentoze ne mogu alkoholno provreti te im se količina smanjuje tijekom starenja vina.

Heksoze su monosaharidi koji sadrže 6 ugljikovih atoma i čine glavnu skupinu šećera grožđa. Glukoza je heksoza i, s obzirom na glavnu funkcijsku skupinu, aldoza (aldoheksoza), a postoji u D- ili L-izomernoj formi. U grožđu se nalazi isključivo D-glukoza koja s fenolima i aromatskim spojevima tvori složene spojeve - glukozide. Glukozu u etanol pretvaraju kvasci, u glukonsku i octenu kiselinu octene bakterije, a u mliječnu kiselinu mliječne bakterije.

Fruktoza je također heksoza, a s obzirom da sadrži keto funkcijsku skupinu ona je ketoza. Kao i glukozu, fruktozu u grožđu nalazimo u D-izomernoj formi. Podložna je mikrobiološkoj razgradnji i kvasci je teže fermentiraju od glukoze.¹

ESTERI

Esteri su organski spojevi koji nastaju reakcijama esterifikacije alkohola i karboksilnih kiselina te su odgovorni za voćne mirise vina. Najveća količina estera sintetizira se tijekom fermentacije, a manja količina nastaje tijekom dozrijevanja i starenja vina. Složenim enzimskim reakcijama u stanicama kvasaca ili kiselom kataliziranom reakcijom formiraju se hlapljivi esteri. Dvije skupine hlapljivih estera su važne u vinu: acetatni esteri, odnosno esteri octene kiseline, i etilni esteri masnih kiselina. U sintezi hlapljivih estera najvažnije komponente su etanol i viši alkoholi te octena kiselina i masne kiseline srednje duljine lanca. Acetatni esteri nastaju enzimskom reakcijom esterifikacije

etanola i viših alkohola s octenom kiselinom. Etilni esteri produkt su esterifikacije etanola i prekursora - zasićenih karboksilnih kiselina. Za njihovo nastajanje bitna je koncentracija supstrata i ravnoteža u reverzibilnim reakcijama esterifikacija-hidroliza. Hlapljivi esteri značajni su za aromatski profil bijelih vina, ali njihov utjecaj na aromu se smanjuje tijekom dozrijevanja vina jer su skloni hlapljenju i hidrolizi.¹

KISELINE

Kiseline su vrlo bitne za aromu, okus i postojanost vina. pH vrijednost vina je 3,0-4,0 što je bitan čimbenik za brojne biokemijske procese koje provode enzimi u fermentaciji i drugim mikrobiološkim procesima. U vinu se nalazi najviše organskih kiselina, dok se anorganske kiseline nalaze u tragovima. Izvor organskih kiselina u vinu je grožđe, a najzastupljenije su vinska, limunska, jabučna i jantarna.

Titracijsku ili ukupnu kiselost vina čine nehlapljive kiseline koje se izražavaju kao vinska kiselina u g/L, a hlapljiva kiselost se izražava kao octena kiselina u g/L. Titracijska kiselost vina obuhvaća anorganske i organske kiseline te njihove soli, a zbroj kiselina koje hlape pomoću vodene pare čine hlapljivu kiselost. U hlapljive kiseline vina ubrajaju se octena, mravlja, maslačna, propionska, kaprilna, kapronska i kaprinska kiselina.

Vinska kiselina, 2,3-dihidroksibutanska dikiselina, formira se na dva načina, iz askorbinske kiseline tijekom rasta bobica i oksidacijom glukoze u procesu glikolize. Za vrijeme dozrijevanja grožđa vinska kiselina prelazi u soli tartarate. Soli vinske kiseline u vinu najviše nastaju vezanjem s kalcijem i kalijem te su odgovorne za fizikalne i kemijske nestabilnosti vina.

Octena kiselina je nusprodukt alkoholne fermentacije, a može nastati iz pentoza i u procesu razgradnje limunske kiseline. Veće koncentracije upućuju na metabolizam octenih bakterija, odnosno na kvarenje ili bolest vina. Potpunom razgradnjom šećera u alkoholnoj fermentaciji sprječava se nastanak većih koncentracija hlapljivih kiselina. Hlapljive kiseline imaju velik utjecaj na miris vina ovisno o postotku alkohola i tipu vina.¹

POLIFENOLI

Polifenoli su organski spojevi vrlo rašireni u biljnom svijetu. Imaju velik utjecaj na boju i aromu vina iako se u vinu nalaze u malim koncentracijama. Njihova nazočnost utječe na stabilizaciju i čuvanje vina jer talože bjelančevine te inhibiraju rast mikroorganizama. Većina fenola djeluju kao antioksidansi i pripisuju im se neka terapijska djelovanja kao što su protuupalno, protualergijsko, antivirusno, antibakterijsko i antikancerogeno djelovanje.¹

1.4. Aroma vina

Općenito, aroma se može opisati kao kombinirana impresija okusa i mirisa. Aroma je prepoznatljiva karakteristika određene hrane i pića, a rezultat je međudjelovanja velikog broja spojeva prisutnih u hrani i piću. Ti spojevi se dijele u dvije velike skupine: spojeve odgovorne za okus i spojeve odgovorne za miris. Spojevi odgovorni za miris hrane i pića se često nazivaju spojevima arome (engl. *aroma compounds or substances*). Spojevi odgovorni za okus su općenito nehlapljivi pri sobnoj temperaturi, dok su spojevi arome hlapljivi te ih ljudi, i životinje, mogu osjetiti svojim organom njuha - nosom.⁹

Aromu vina čini međusobno djelovanje više stotina kemijski različitih hlapljivih i nehlapljivih spojeva. Sadržaj ukupnih spojeva arome, nehlapljivih i hlapljivih, u vinu je malen, oko 0,8-1,2 g/L. Iako je koncentracija hlapljivih spojeva arome vrlo mala, oni imaju veliki utjecaj na senzornu ocjenu vina. Dokazano je da neke aromatične tvari, iako prisutne u vinu u vrlo niskoj koncentraciji, mogu sinergijski utjecati na aromu vina. Neki hlapljivi aromatični spojevi se nalaze u slobodnom stanju u grožđu i nepromijenjeni prelaze iz grožđa u vino, a neki nastaju iz nehlapljivih prekursora koji se nalaze u grožđu i iz grožđa prelaze u mošt i vino. Najznačajniji prekursori spojeva arome su nezasićene masne kiseline, fenolne kiseline, karotenoidi, glikozidi i aminokiseline (npr. cistein). Koncentracija spojeva arome u vinu ovisi o sorti i stupnju zrelosti grožđa, klimi, tlu, fermentaciji, doradi vina i duljini dozrijevanja vina u boci. Esteri, kiseline i viši alkoholi kvantitativno su dominantni spojevi u aromi vina i veoma važni za kvalitetu vina.¹

Prema podrijetlu spojeva arome razlikuje se: originalna ili primarna aroma, sekundarna aroma, aroma fermentacije i aroma dozrijevanja vina.

Originalna ili primarna aroma vina odnosi se na aromatične spojeve koji nastaju u grožđu, a ovise o sorti grožđa. Grožđe većine sorti vinove loze koje se koriste za proizvodnju vina nema karakterističnu aromu osim izrazito aromatičnih sorti kao što su muškat, cabernet sauvignon, rizling, traminac. Aromatični spojevi nalaze se u kožici i ispod kožice (u pokožici), a manje u mesu bobice. Najznačajniji spojevi ove skupine su terpeni, posebno monoterpeni i donekle seskviterpeni, C₁₃-norizoprenoidi, metoksipirazini i hlapljivi tioli. Terpeni se u grožđu nalaze u slobodnom i vezanom obliku, kao glikozidi. Tijekom procesa proizvodnje vina dolazi do enzimske ili kiselinske hidrolize glikozida, oslobađaju se hlapljivi spojevi koji prelaze u vino.¹⁰

U razdoblju od berbe do početka vrenja mošta zbivaju se složeni enzimski procesi u kojima se razvija sekundarna aroma. Ova aroma naziva se još i predfermentativnom aromom i o njoj znatno ovisi kakvoća budućeg vina.

Aroma fermentacije (bouquet vrenja) označava se kao tercijska aroma vina. Nastaje kao proizvod metabolizma kvasaca i bakterija za vrijeme alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije. Tijekom tih fermentacija nastaje oko 80% spojeva arome poput hlapljivih kiselina i fenola, viših alkohola, estera masnih kiselina te karbonilnih spojeva.

Aroma dozrijevanja razvija se za vrijeme dozrijevanja i skladištenja vina u drvenim bačvama ili u boci. Dozrijevanje vina u bačvi znači povećanje sadržaja kisika i vanilina, a dozrijevanjem u boci smanjuju se acetati. U oba slučaja vina gube svježinu, voćne note i sortne karakteristike, a dobivaju poseban bouquet starosti koji se cijeni kod crnih vina.^{3,11}

1.4.1. Primarna aroma vina

Glavni spojevi primarne arome vina su terpeni, C₁₃-norizoprenoidi, fenolni spojevi, metoksipirazini i hlapljivi tioli (merkaptani). Najznačajnija skupina spojeva primarne arome vina su terpeni i to posebno monoterpeni.

1.4.1.1. Terpeni

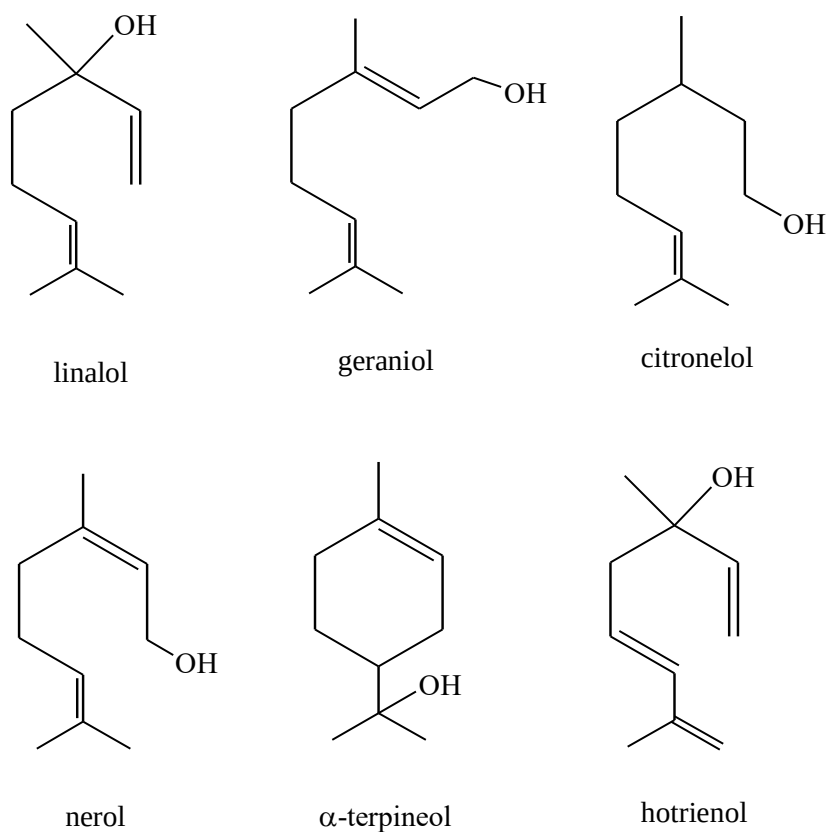
Terpeni su velika i strukturno raznolika grupa prirodnih spojeva rasprostranjena u biljnom svijetu. Osnovni strukturni element terpena je spoj od 5 ugljikovih atoma, 2-metilbuta-1,3-dien, trivijalnim imenom izopren. Uobičajena podjela terpena temelji se na broju izoprenskih ili C₅ jedinica. Tako monoterpeni sadrže dvije izoprenske jedinice (C₁₀

spojevi), seskviterpeni tri (C_{15} spojevi), diterpeni četiri (C_{20} spojevi), triterpeni šest (C_{30} spojevi), a tetraterpeni ili karotenoidi 8 izoprenskih jedinica (C_{40} spojevi). Terpeni su strukturno vrlo raznoliki spojevi. Mogu biti ugljikovodici i oksidirani derivati ugljikovodika: alkoholi, eteri, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri. Nadalje, terpeni mogu biti alifatski i aromatski spojevi, aciklički, ciklički (mono-, bi-, tri-policiklički, homociklički i heterociklički).¹⁰

Nositelji primarne arome vina iz skupine terpena su mono- i seskviterpeni. Monoterpeni su spojevi sa 10 C atoma i sastoje se od dviju izoprenskih jedinica, dok su seskviterpeni spojevi sa 15 C atoma i sadrže tri izoprenske jedinice. Mono- i seskviterpeni su hlapljivi spojevi. Terpeni su u grožđu prisutni u malim količinama, ali svojim cvjetnim mirisima definiraju prepoznatljivost sorte te utječu na senzorna svojstva grožđa i vina. S obzirom na sadržaj terpena vinske sorte dijele se na aromatične ili muškatne sorte s više od 6 mg/L monoterpena, poluaromatične ili polumuškatne s 1-4 mg/L i neutralne sorte s manje od 1 mg/L monoterpena.

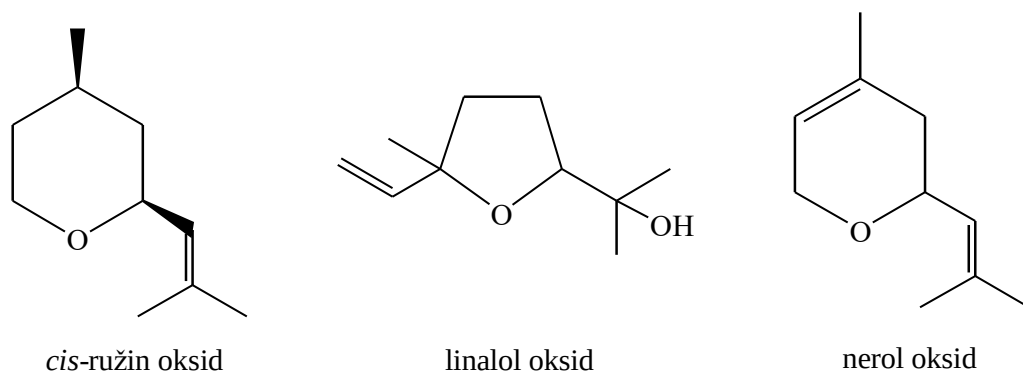
Terpeni u grožđu postoje u dva oblika: slobodni i vezani terpeni. Većina terpena nalazi se u kožici grožđa u glikozidno vezanoj formi, a manja količina nalazi se u slobodnoj formi. Glikozidno vezani terpeni su nehlapljivi i nemaju utjecaj na miris, a slobodni terpeni su hlapljivi i mirisni spojevi. Iako vezani terpeni nemaju utjecaj na miris, tijekom dozrijevanja vina može doći do cijepanja glikozidnih veza i oslobađanja hlapljivih aglikona koji će intenzivirati aromu vina.

U grožđu i vinu najzastupljeniji su monoterpenski alkoholi linalol, geraniol, citronelol, nerol, hotrienol, α -terpineol (slika 1). Navedeni spojevi posebno su značajni sastojci primarne arome vina sorte muškat, traminac mirisavi i rizling. Najvažniji monoterpenski alkohol primarne arome vina je linalol (karakterističan za vino sorte muškat), a slijedi geraniol.



Slika 1. Monoterpenški alkoholi primarne arome vina

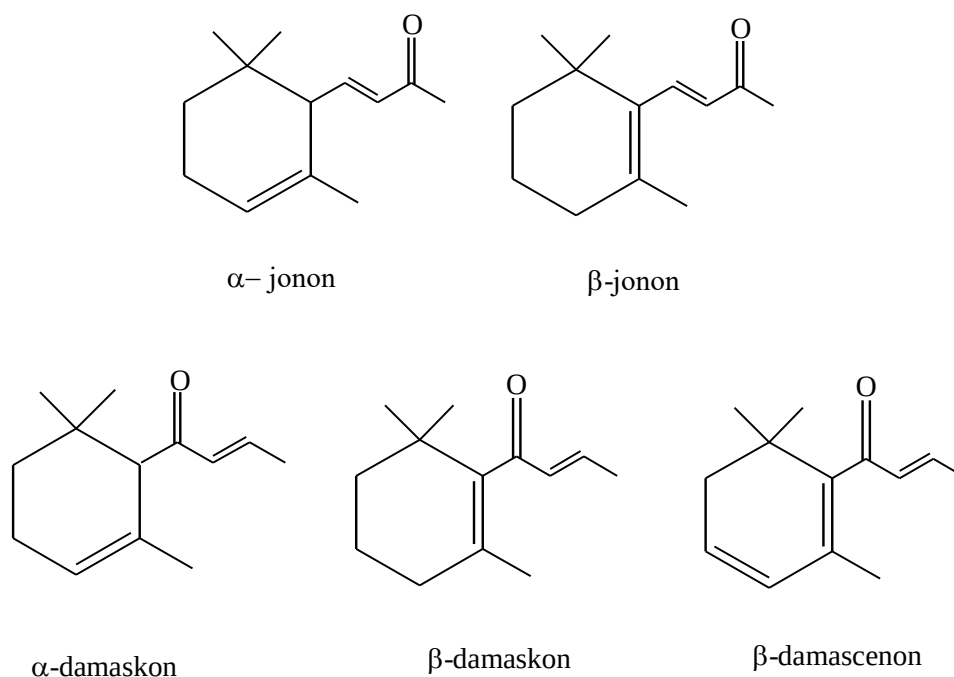
Važni sastojci primarne arome su i oksidi linalola i nerola, linalol oksid i nerol oksid, i posebno *cis*-ružin oksid (slika 2). *Cis*-ružin oksid, izrazito aromatičan spoj, karakterističan je sastojak primarne arome vina sorte traminac koji je odgovoran za njegovu cvjetnu aromu.^{1,8,10}



Slika 2. Monoterpenški oksidi primarne arome vina

1.4.1.2. C₁₃ -norizoprenoidi

Oksidacijskom razgradnjom karotenoida prisutnih u grožđu nastaju spojevi sa 13 i 14 C atoma, ali i C₉ i C₁₀ derivati. Među njima posebno su aromatični C₁₃ derivati karotenoida koji se nazivaju C₁₃-norizoprenoidi. C₁₃-norizoprenoidi se dijele na jonone i damaskone. Tri izomerna jonona, α -, β - i γ -jonon razlikuju se po položaju dvostruke veze unutar prstena. Miris jonona je snažan, sladak, nalik na ljubičice s primjesama drvenastih nota. Damaskoni su strukturni izomeri jonona koji također postoje u tri izomerna oblika, α -, β - i γ -damaskon, a damascenoni imaju dodatnu dvostruku vezu u prstenu. Damaskoni i damascenoni imaju intenzivne voćno-cvjetne mirise. Na slici 3 prikazane su strukturne formule najpoznatijih C₁₃-norizoprenoida.

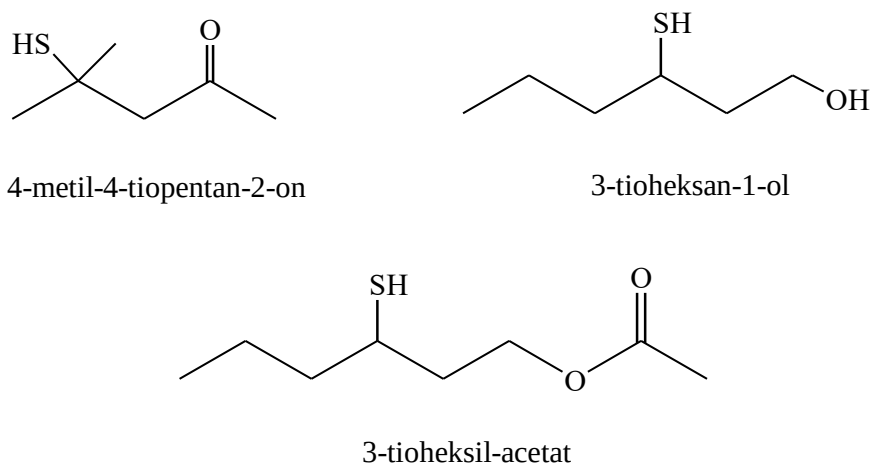


Slika 3. C₁₃-norizoprenoidi

Glavni sastojci primarne arome vina iz skupine C₁₃-norizoprenoida su β -damascenon i β -jonon. β -damascenon je izrazito aromatičan spoj intenzivno cvjetnog mirisa i mirisa tropskog voća. Identificiran je u gotovo svim vinima u koncentracijama od 1 – 4 $\mu\text{g/L}$. Miris β -jonona je cvjetni, a podsjeća na miris ljubičica.^{10,11}

1.4.1.3. Hlapljivi tioli

Spojevi sa sumporom općenito se smatraju odgovornim za neugodne mirise, ali neki od njih daju značajan doprinos ukupnoj aromi vina. Hlapljivi tioli (merkaptani) značajni su kod aromatičnih sorti grožđa, a iako su prisutni u malim koncentracijama imaju veoma nizak prag detekcije. Dijelev se na spojeve koji pozitivno pridonose i koji negativno pridonose aromatičnom profilu vina. Tioli negativnog utjecaja podsjećaju na miris pokvarenih jaja, luk i kupus. Miris tropskog voća vinu daju tioli pozitivnog utjecaja na aromu koji se zbog toga još nazivaju i sortni tioli. Karakteristični spojevi arome vina iz skupine tiola su 4-metil-4-tio-pentan-2-on, 3-tioheksan-1-ol i 3-tioheksil-acetat (slika 4). 4-Metil-4-tio-pentan-2-on ima karakterističan miris na šimšir, a identificiran je u vinima sorte sauvignon blanc i smatra se da pridonosi svježim voćnim notama u vinu. Aroma 3-tioheksan-1-ola je vrlo složena, mijenja se s koncentracijom i aromatičnim okolišem u kojem se nalazi, a podsjeća na zeleni mango i šimšir s primjesama mirisa gume. 3-tioheksil-acetat je prvi put identificiran u vinima sorte sauvignon blanc, ali se nalazi i u mnogim drugim tipovima vina.^{1,10,12}



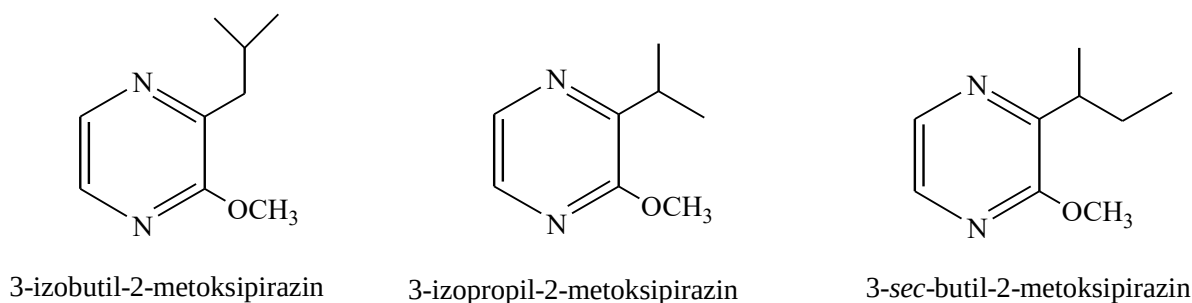
Slika 4. Hlapljivi tioli primarne arome vina

1.4.1.4. Metoksipirazini

Metoksipirazini su derivati pirazina, šesteročlanih heterocikličkih spojeva s dva atoma dušika. Prekursori ovih spojeva su aminokiseline prisutne u grožđu. Metoksipirazini su spojevi intenzivnih mirisa i niskog praga detekcije (1–2 mg/L u vodi), a odgovorni su za karakteristične zelene, biljne arome vina, posebno sorti sauvignon blanc

i cabernet sauvignon. Utvrđeno je da izlaganje grožđa UV zračenju i jakoj sunčevoj svjetlosti dovodi do razgradnje metoksipirazina te gubitka herbalnih aroma. Sadržaj metoksipirazina smanjuje se i zrenjem grožđa. Spojevi nositelji herbalne arome daju miris vinu na svježije pokošeni travnjak ili na sirovi krumpir i zelenu papriku.

Najznačajniji spoj u grupi metoksipirazina je 3-izobutil-2-metoksipirazin (IBMP), a slijede 3-izopropil-2-metoksipirazin (IPMP) i 3-*sec*-butil-2-metoksipirazin (SBMP) (slika 5).^{1,10,12}



Slika 5. Najvažniji metoksipirazini u vinu

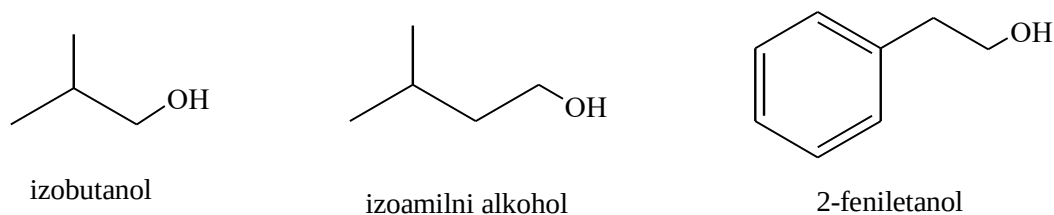
1.4.2. Ostali spojevi arome vina

Ostali spojevi arome vina su spojevi sekundarne arome, arome fermentacije i arome dozrijevanja (starenja).

Sekundarna aroma razvija se tijekom tehnoloških postupaka obrade grožđa koji prethode fermentaciji. Kroz to vrijeme odvijaju se razne kemijske i biokemijske (enzimatske) reakcije kojima nastaju aromatični spojevi koji vinu daju cvjetne i voćne note.

Najvažniji dio arome vina, oko 80% aromatičnih spojeva, nastaje tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije kao proizvod metabolizma kvasaca i bakterija. Najvažniji spojevi arome fermentacije su viši alkoholi, hlapljive karboksilne kiseline i esteri, karbonilni spojevi i hlapljivi fenoli.

Najvažnija skupina hlapljivih spojeva koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije šećera pomoću kvasaca su alkoholi. Glavni predstavnici alkohola u vinu su izobutanol (2-metilpropan-1-ol), izoamilni alkohol (3-metilbutan-1-ol) i 2-feniletanol (slika 6) te propan-1-ol i amilni alkohol (2-metil-1-butanol). Sadržaj ovih alkohola niži je u bijelim nego u crnim vinima.



Slika 6. Najvažniji alkoholi arome vina

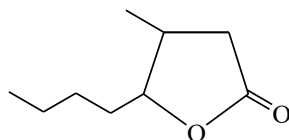
Esteri su odgovorni za voćne arome bijelih i crnih vina. U vinima su identificirane dvije glavne skupine estera: acetati (acetatni esteri) i etilni esteri masnih kiselina. Od acetata najzastupljeniji je etil-acetat, izoamil-acetat, heksil-acetat i 2-feniletal-acetat. Iz skupine etilnih estera masnih kiselina u vinima su identificirani etil-butanoat, etil-heksanoat, etil-oktanoat i etil-dekanoat kao i etilni esteri razgrananih i cikličkih karboksilnih kiselina (etil-izobutanoat, etil-izovalerat, etil-cikloheksanoat).¹²

Najzastupljenija kiselina u vinima je octena kiselina, a od masnih kiselina sekundarnu aromu vina čine butanska (maslačna), heksanska (kapronska), oktanska (kaprilna) i dekanska (kaprinska) kiselina.

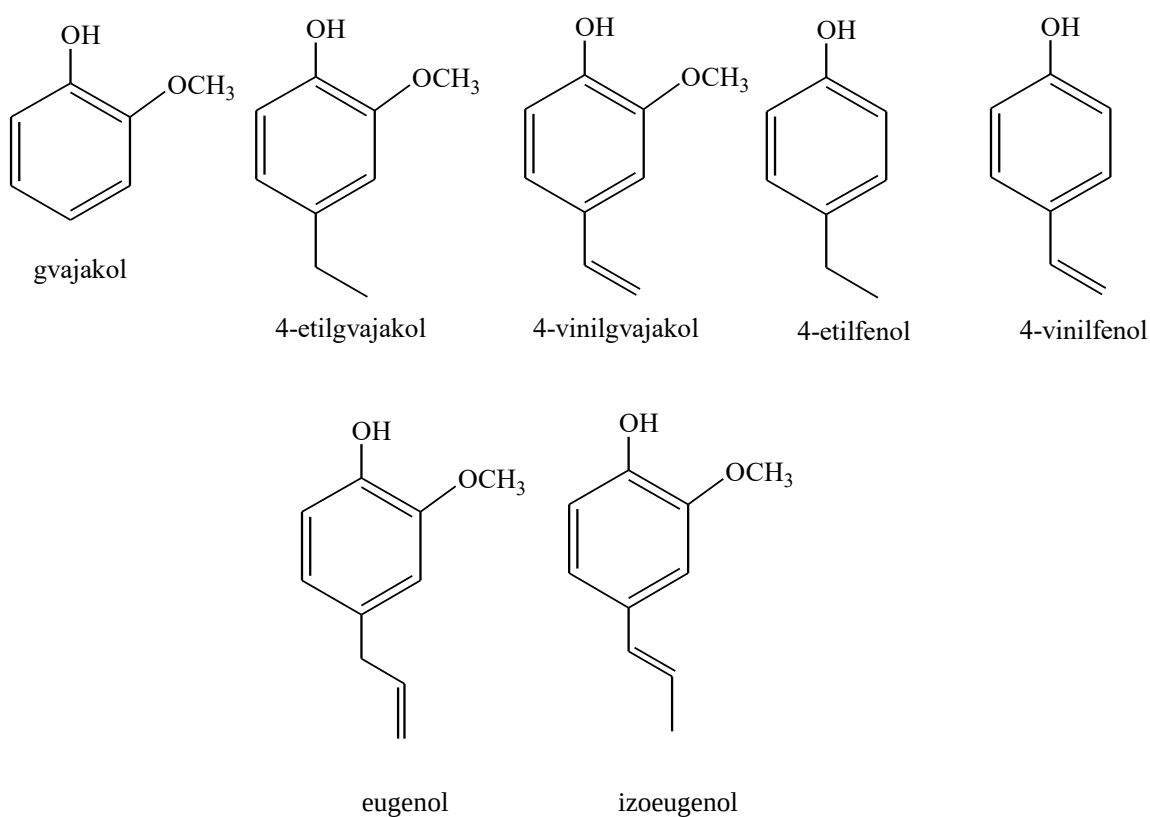
Tijekom alkoholne fermentacije nastaju mnogi karbonilni spojevi, aldehidi i ketoni. Najznačajniji doprinos aromi vina daje keton butan-2,3-dion, trivijalnog imena diacetil. Utjecaj diacetila na aromu vina jako ovisi o tipu vina, a njegova koncentracija (sadržaj) je vremenski ovisna i povezana je sa koncentracijom sumporovog dioksida u vinu. Aroma diacetila je aroma po maslacu i posebno se cijeni u vinima sorte chardonnay. Također, doprinosi slatkim notama nekih tipova vina porto.¹² Acetaldehid je također spoj sekundarne arome, međutim on nastaje i tijekom starenja vina kao posljedica oksidacije etanola. Sastojak je arome vina tipa sherry.

Hlapljivi spojevi koji nastaju tijekom dozrijevanja ili starenja vina su spojevi koji nastaju nakon fermentacije kada vino ide na odležavanje, često i u drvene bačve, te dolazi do dozrijevanja i starenja vina. Najznačajniji spojevi arome dozrijevanja su γ -laktoni, hlapljivi fenoli i derivati furana. Dozrijevanjem u drvenim bačvama zbog ekstrakcije iz drveta raste sadržaj γ -laktona od kojih su najznačajniji *cis*- i *trans*-hrastov lakton (β -metil- γ -oktalakton, slika 7) koji potječe iz hrastovog drva. Oksidacijom alkohola povećava se sadržaj aldehida, posebno acetaldehida (oksidacijom etanola) i fenilacetaldehida (oksidacijom 2-feniletanola). Hlapljivi fenoli značajno utječu na aromu vina. Sastojci

tercijarne arome su gvajakol (2-metoksifenol), 4-vinil- i 4-etilgvajakol, 4-vinil- i 4-etilfenol te eugenol i izoeugenol (slika 8). Prisustvo derivata furana, kao što su furfural, 5-metilfurfural i furfuril-etil-eter, također je karakteristično za vina dozrela u drvenim bačvama.^{12,13}



Slika 7. Hrastov lakton



Slika 8. Hlapljivi fenoli tercijarne arome vina

1.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva vina

Bitan parametar kod određivanja senzorne kvalitete vina je prisutnost hlapljivih spojeva, odnosno spojeva arome u vinu. Više od 800 hlapljivih spojeva identificirano je

u vinu, a potječu iz grožđa ili se formiraju tijekom procesa fermentacije i dozrijevanja vina.

Analiza spojeva arome hrane i pića, odnosno njihova izolacija i identifikacija, je često složena i zahtjevana. Kod odabira metode izolacije hlapljivih spojeva potrebno je dobro poznavati uzorak kao i spojeve koji se očekuju u izolatu, posebno one aromatičnog tipa. Metoda izolacije mora se pomno odabrati jer aromatični spojevi uglavnom nisu prisutni u uzorku u velikim koncentracijama, već često čak u tragovima. Metoda mora osiguravati minimalne gubitke aromatičnih spojeva, nastajanje neželjenih artefakata te kontaminaciju izolata hlapljivih spojeva. Prikladna metoda izolacije ne bi smjela uzrokovati oksidaciju, redukciju, gubitak hlapljivih spojeva, promjenu pH, termičku degradaciju aromatičnih spojeva te diskriminirati polarne i nepolarne spojeve. Pošto uzorak za analizu aromatičnih spojeva uglavnom sadrži i nehlapljive spojeve te visoko molekulske tvari treba odabrati metodu koja smanjuje mogućnost pojave tih spojeva u izolatu i tako izbjeći lošu plinsko-kromatografsku analizu. Za dobivanje cjelovitog profila arome hrane ili pića potrebno je provesti više metoda izolacije hlapljivih spojeva arome.

Metode za izolaciju hlapljivih spojeva općenito se dijele na destilacijske metode, ekstrakcijske metode, sorpcijske tehnike i tehnike vršnih para. Pogodne metode za izolaciju spojeva arome hrane i pića su tehnike uzorkovanja (sakupljanja) vršnih para (engl. *headspace techniques*) koje mogu biti statičke ili dinamičke, zatim sorpcijske tehnike te ekstrakcija na krutoj fazi (engl. *solid phase extraction*). Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (sorpcijska tehnika) i ekstrakcija tekuće-tekuće najčešće su korištene metode za izolaciju hlapljivih spojeva u vinu.¹¹

1.5.1. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike omogućavaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na particiji organskih spojeva između parne ili vodene faze i tankog polimernog filma. Najčešće korištene sorpcijske tehnike su sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću (engl. *stir bar sorptive extraction*, SBSE) i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME).¹¹

1.5.1.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Za izolaciju aromatičnih spojeva često se upotrebljava mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Tehnika koristi silikonsko vlakno, 1 ili 2 cm dugo, prekriveno polimernim filmom za sakupljanje (adsorpciju) hlapljivih spojeva iz uzorka. Vlakno se nalazi u sustavu igle koja je postavljena na SPME držač za uzorkovanje i desorpciju.

Aromatični spojevi ekstrahiraju se iz uzorka tako da se uzorak stavi u posudu koja se hermetički zatvori sa tzv. septom i zagrijava. Potom se u prazni prostor iznad uzorka uvodi vlakno na koje se adsorbiraju hlapljivi spojevi koji su isparili iz uzorka tijekom zagrijavanja, tzv. vršne pare. Nakon određenog vremena adsorpcije vlakno se uvlači i stavlja u injektor plinskog kromatografa gdje se vršne pare desorbiraju. Zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa SPME vlakno se rekondicira.

Prednosti tehnike:

- dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih mirisa
- ne koristi se otapalo
- brza i laka upotreba.

Nedostaci tehnike:

- neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve
- najbolji rezultati za usporedbu se dobivaju upotrebom istog vlakna na svim uzorcima
- aromatični profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisan je o vrsti, debljini i dužini vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja.¹¹

1.5.2. Ekstrakcija otapalom

Ekstrakcija je metoda za izolaciju i za pročišćavanje neke tvari iz otopine, suspenzije ili krute smjese pomoću otapala. Kod izolacije aromatičnih spojeva ekstrakcijom izbor otapala je veoma važan. Otapalo mora zadovoljiti sljedeće uvjete:

- tvar koju ekstrahiramo mora imati veliku topljivost u otapalu
- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima

- otapalo i otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar moraju se što više razlikovati u gustoći
- otapalo mora biti niske temperature vrenja kako bi se lako uklonilo nakon ekstrakcije
- otapalo mora biti što manje otrovno, zapaljivo i jeftino.

Najčešće upotrebljavana otapala su diklormetan, smjese pentana i dietil-etera, heksan, freoni, aceton i etanol.

Prednosti metode:

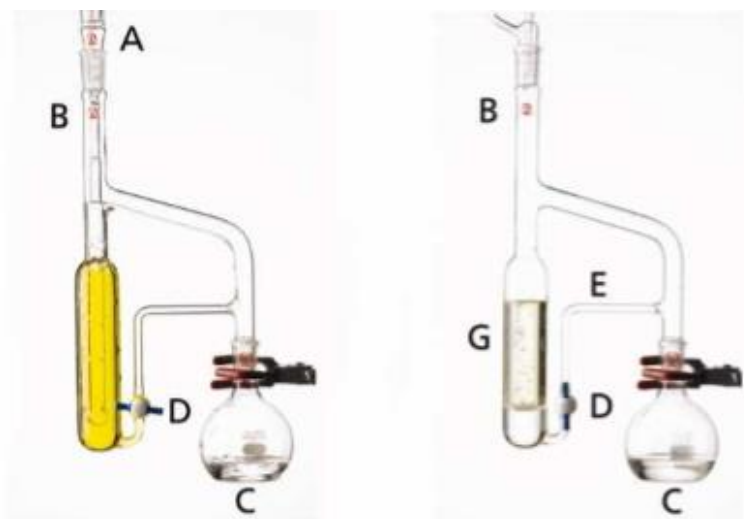
- jednostavnost izvedbe
- dobra ekstrakcija aromatičnih spojeva.

Nedostaci metode:

- otapala mogu biti toksična i/ili zapaljiva te mogu unijeti onečišćenja u ekstrakt
- obično je potrebna velika količina uzorka za dobivanje koncentriranog ekstrakta
- uklanjanje otapala može izazvati gubitak najisparljivijih spojeva
- za vrijeme ekstrakcije mogu se pojaviti emulzije
- dobiveni ekstrakt može sadržavati visokovrijuće i neisparljive tvari, obojene tvari koje mogu uzrokovati probleme kod daljnje analize
- pik otapala može prekriti rano izlazeće isparljive tvari u kromaogramu.^{11,14}

1.5.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Kada je uzorak otopina ekstrakcija se provodi s organskim otapalom u lijevku za odjeljivanje (diskontinuirano) ili u komercijalno dostupnim ekstraktorima (kontinuirano). Ekstraktori se razlikuju po izvedbi, ovisno o tome da li su namijenjeni za ekstrakciju otapalom težim ili lakšim od vode (slika 9).



Slika 9 . Kontinuirani ekstraktor za ekstrakciju tekuće-tekuće za otapala lakša i teža od vode

Za otapala lakša od vode potrebno je u ekstraktor (B) umetnuti adapter. Adapter omogućava da otapalo, koje se zagrijava u tikvici (C), isparava pa potom kondenzira u hladilu (A), dođe do dna ekstraktora odakle difundira kroz vodeni sloj. Zbog manje gustoće otapala od vode, ono se uzdiže kroz vodeni sloj i pritom ekstrahira željene tvari. Otapalo, u kojem se nalaze spojevi ekstrahirani iz uzorka, reciklira se preko bočne cijevi natrag u tikvicu (C). Za vrijeme ekstrakcije pipac (D) mora biti zatvoren.

Za otapala teža od vode kontinuirana ekstrakcija se ostvaruje kondenzacijom svježeg otapala iz hladila (B) i prolaskom kroz uzorak (gornji sloj u ekstraktoru G). Na dnu ekstraktora sakuplja se otapalo s ekstrahiranim spojevima i kad dosegne nivo postrane cijevi (E) automatski se prelijeva preko otvorenog teflonskog pipca (D) u zagrijavanu tikvicu (C).¹¹

1.6. Analiza hlapljivih spojeva

Plinska kromatografija s masenim spektrometrom kao detektorom najčešća je metoda za analizu hlapljivih spojeva. Kombinacijom plinske kromatografije i masene spektrometrije postiže se osjetljivost tehnike u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari.¹⁵

1.6.1. Kromatografija

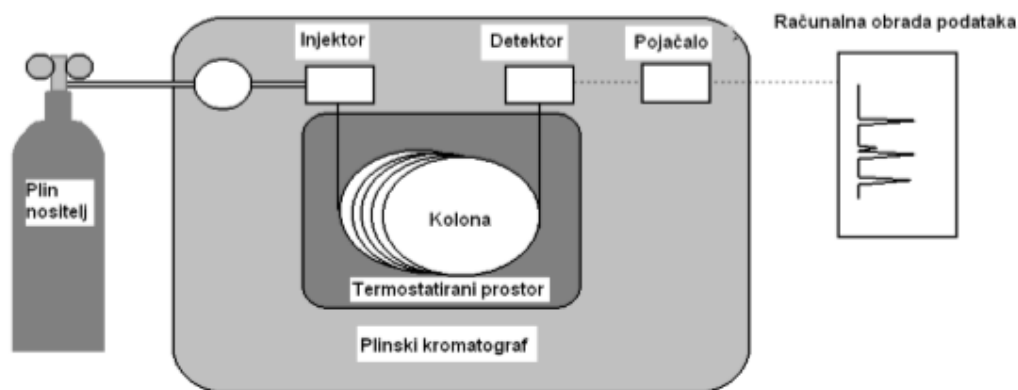
Kromatografija je zbirni naziv laboratorijskih tehnika čija svrha je razdvajanje komponenata smjese. To je fizikalna metoda odjeljivanja tvari u smjesi na temelju njihove razdiobe između nepokretne (stacionarne) faze i pokretne (mobilne) faze. Različiti afinitet komponenata smjese prema stacionarnoj fazi temelj je svake kromatografije. Komponente koje imaju veći afinitet duže se zadržavaju na stacioniranoj fazi, tj. sporije putuju mobilnom fazom i kasnije se pojavljuju na detektoru.

Kromatografija može biti analitička i preparativna. Analitička kromatografija bavi se analizom relativnih omjera komponenata smjese, a preparativna se bavi razdvajanjem komponenata radi daljnje obrade. Prema agregatnom stanju mobilne faze kromatografija se dijeli na tekućinsku (engl. *liquid chromatography*, LC) i plinsku (engl. *gas chromatography*, GC) kromatografiju. Kod tekućinske kromatografije mobilna faza je tekućina male viskoznosti, a kod plinske inertni plin. Tekućinska i plinska kromatografija dalje se dijele prema agregatnom stanju stacionarne faze na kromatografiju plin-tekuće (engl. *gas-liquid chromatography*, GLC) i plin-kruto (engl. *gas-solid chromatography*, GSC). Tekućinska kromatografija dijeli se na kromatografiju na stupcu (kolonska kromatografija) i plošnu (tankoslojna). Ta podjela temelji se na ostvarivanju kontakta između pokretne i nepokretne faze. Dvije osnovne vrste plinske kromatografije su razdjelna i adsorpcijska. Razdjelna kromatografija se mnogo više koristi, pokretna faza je plin, a nepokretna je nehlapljiva tekućina. Kod adsorpcijske kromatografije nepokretna faza je čvrsta, a pokretna faza je plin.¹⁵

1.6.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija koristi se za odjeljivanje hlapljivih komponenata u smjesama te je jedna od najčešće korištenih kromatografskih tehnika. Razlog široke uporabe je brzina analize te služi za kvalitativno i kvantitativno analiziranje spojeva u smjesi. Uzorak kod plinske kromatografije mora biti u plinovitom stanju i stabilan na temperaturi grijanja kromatografske kolone. Stacionarna faza je tekućina nanosena na unutrašnju stijenku kapilare (kapilarne kolone) ili na kruti nosač (punjene kolone). Mobilna faza je kemijski inertan plin, najčešće helij, dušik ili argon.

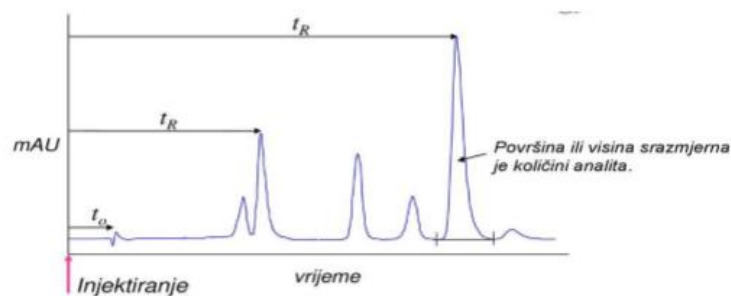
Osnovni dijelovi plinskog kromatografa, uređaja za plinsku kromatografiju, su injekcijski blok (injektor), kromatografska kolona smještena u termostatiranom prostoru, tzv. peći, detektora i računala. Na slici 10 prikazan je shematski prikaz plinskog kromatografa.



Slika 10. Shematski prikaz plinskog kromatografa

Uzorak se unosi u injektor i trenutno ispari te ulazi u plinski tok do kolone za odvajanje nošen plinom nositeljem tj. mobilnom fazom. U koloni dolazi do odvajanja sastojaka uzorka na temelju njihovih kemijskih i fizikalnih osobina te ih mobilna faza prenosi dalje do detektora. Proces se programira tako da temperatura linearno raste zbog različitih temperatura vrenja sastojaka u koloni. Sastojci se odjeljuju primjenom postupka eluiranja ili ispiranja. Na takav način sastojci smjese mogu se potpuno odvojiti, a na izlasku kolone pomiješani su samo s plinom nositeljem.

Plinska kromatografija je slijepa tehnika te se odijeljeni sastojci smjese moraju identificirati pomoću detektora. Detektor na kraju registrira prisutnost odijeljene komponente te se podaci ispisuju kao kromatogram (slika 11). Vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme, t_R , je vrijeme između injektiranja uzorka i pojave signala na detektoru. To vrijeme se mjeri od injektiranja uzorka do pojave maksimuma pika određenog sastojka. Taj podatak ovisi o prirodi eluiranog sastojka i stacionarne faze te o protoku i vrsti plina nositelja, temperaturi i dr.

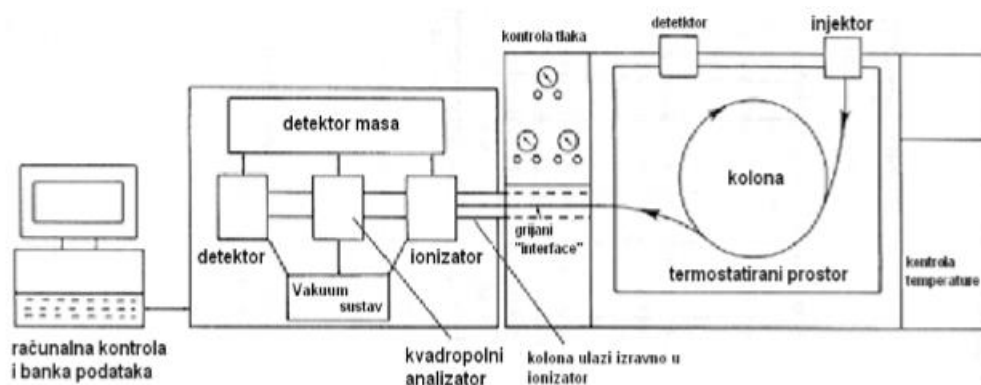


Slika 11. Kromatogram s prikazom mrtvog vremena t_0 i retencijskog vremena t_R

Najčešće korišteni detektori u plinskoj kromatografiji su: detektor toplinske vodljivosti, plameno ionizacijski detektor i detektor apsorpcije elektrona. Upotrebom selektivnih detektora, poput različitih spektroskopskih uređaja, postiže se puno bolja analiza. Plinska kromatografija često se povezuje sa spektroskopskim metodama kao što su infracrvena spektroskopija (IR), masena spektroskopija (MS) i nuklearna magnetska rezonanca (NMR). Tako nastaju kombinirane tehnike koje udružuju sposobnost odjeljivanja kromatografije s mogućnošću kvantitativne i kvalitativne analize koje posjeduju spektroskopske metode. Maseni spektrometar jedan je od najboljih detektora za identifikaciju i strukturnu analizu sastojaka u plinskoj kromatografiji. Spektrometrija masa analitička je metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a ioni se razdvajaju prema njihovoj masi tj. prema omjeru mase i naboja. To je metoda strukturne analize, odnosno identifikacije pojedine tvari, jer je spektar masa karakterističan za svaku tvar. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se usporedbom tog spoja s masenim spektrom iz datoteke spektara poznatih tvari. Spektrometrija masa je najučinkovitija s čistim tvarima. Kada se radi o smjesi spojeva, određivanje strukture i identifikacija pojedinih sastojaka u smjesi nije moguća bez prethodnog odjeljivanja svakog sastojka smjese. Stoga je kombinacija plinske kromatografije i spektrometrija masa veoma učinkovita te omogućuje odjeljivanje i identifikaciju pojedinih sastojaka složenih smjesa hlapljivih spojeva.¹⁵

1.6.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS, slika 12) važna je analitička tehnika koja se koristi u analizi hlapljivih spojeva.



Slika 12. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS

Ova tehnika omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala. Ove dvije metode rade s uzorkom u plinovitoj fazi pa ono što je odvojeno u plinskom kromatografu može jednostavno biti analizirano u masenom spektrometru. Plinska kromatografija uspješna je metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali nije pouzdana za kvalitativnu analizu. Zbog toga se na plinski kromatograf vezuje maseni spektrometar koji je pogodan upravo za kvalitativnu analizu. Ovom kombinacijom tehnika može se postići osjetljivost u redu pikogramskih (10^{-12} g), pa čak i femtogramskih (10^{-15} g) količina tvari. Bitan čimbenik u radu vezanog sustava GC-MS je brzina snimanja spektara masa jer odijeljene komponente ulaze u detektor masa jedna za drugom.¹⁵

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Uzorak vina

Uzorci vina, bijelog i žutog muškata, korišteni u ovom završnom radu berba su 2019. godine. Vino je proizvedeno u Vinskoj kući Kirić u Ludbreškim Vinogradima.

2.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura:

- aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće, Deotto lab d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- magnetska miješalica, model RCT basic, IKA, Njemačka
- magnetska miješalica, MR Hei-Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Njemačka
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), sa SPME vlaknom PDMS/DVB (polidimetilsiloksan/ divinilbenzen), Supelco, SAD
- vezani sustav plinska kromatografija-spekrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies, Santa Clara, SAD: plinski kromatograf model 8890 i spektrometar masa model 5977E

Kemikalije:

- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev klorid, p.a., Fluka Chemie, Švicarska

2.3. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Uzorak za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (5 mL vina) stavljen je u staklenu bočicu volumena 20 mL te su dodane dvije žličice NaCl i magnetič. Bočica je hermetički zatvorena teflonskom septom i stavljena u vodenu kupelj zagrijanu na 40 °C koja je pripremljena na magnetskoj miješalici. Tijekom 15 minutnog termostatiranja hlapljivi spojevi iz uzorka isparili su u prazan prostor iznad uzorka.

U skladu s uputama, ružičasto vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 minuta na 250 °C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzorka.

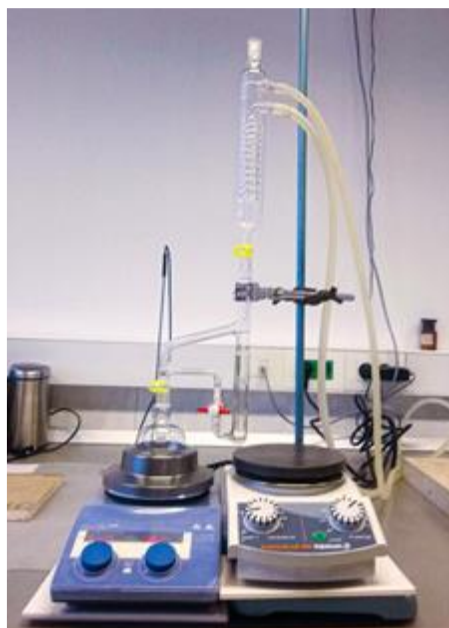
Nakon kondicioniranja vlakna, u prazan prostor iznad uzorka uvedena je SPME igla s vlaknom radi adsorpcije hlapljivih spojeva (slika 13). Adsorpcija vršnih para vršena je 60 minuta. Nakon adsorpcije SPME vlakno je uvučeno u SPME držač, izvučeno iz bočice s uzorkom i odmah umetnuto u injektor GC-MS-a gdje je provedena toplinska desorpcija (pri 250 °C) ekstrahiranih spojeva izravno u kromatografsku kolonu u trajanju od 7 minuta.



Slika 13. SPME igla

2.4. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće provedena je u komercijalnom ekstraktoru, a kao otapalo korištena je smjesa otapala pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće sastojala se od ekstraktora s hladilom po Allihnu i tikvice s okruglim dnom od 100 mL te dviju magnetskih miješalica (slika 14).



Slika 14. Aparatura za ekstrakciju tekuće-tekuće

Nakon sastavljanja aparature, u ekstraktor je uliven pripremljeni uzorak i umetnut je adapter (uska cjevčicu sa malim otvorom na dnu). Potom je dodano otapalo za ekstrakciju, smjesa pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Ekstrakcija se kontinuirano odvijala 3 sata.

Nakon završetka ekstrakcije, dobiveni ekstrakt je koncentriran, odnosno uklonjeno je organsko otapalo frakcijskom destilacijom uz zagrijavanje tikvice s ekstraktom preko vodene kupelji. Tako je dobiven uzorak aromatičnih spojeva za GC-MS analizu koji je čuvan u zatvorenim staklenim bočicama u hladnjaku do GC-MS analize.

2.5. GC - MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih aromatičnih spojeva provedena je plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa (GC - MS). Pri tome je korišten vezani sustav GC - MS proizvođača Agilent Technologies. Uređaj se sastoji od plinskog kromatografa 8890 i spektrometra masa 5977E (slika 15).



Slika 15. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS, 5% difenil-95% dimetilpolisiloksan), proizvođača Agilent Technologies dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljine stacionarne faze 0,20 μm . Plin nositelj je helij protoka 1 mL/min, omjer cijepanja 1:50, temperatura injektora iznosila je 250 °C, temperatura detektora 280 °C, a energija ionizacije 70 eV.

Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3 min pri 70 °C, zatim zagrijavanje od 70 °C do 200 °C brzinom od 3 °C/min i zadržavanje od 2 min pri 200 °C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara (Wiley9 i NIST17) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za svaki uzorak analiziran GC-MS sustavom dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja svakog sastojka (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- relativni udio pojedinog sastojka izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini) i
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbližiji spektru nepoznate komponente (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postotcima).

3. REZULTATI

3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Spojevi arome izolirani su iz vina sorte Muškat (dva uzorka, bijeli i žuti muškat) dvjema metodama, mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i ekstrakcijom tekuće-tekuće (poglavlje 2.3. i 2.4.). Dobivena su četiri uzorka, dva uzorka vršnih para i dva ekstrakta. Svi uzorci su analizirani vezanim sustavom GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 1 i 2. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

/ - spoj nije identificiran u uzorku

* - točan izomer nije određen

^a – spoj identificiran samo na temelju masenog spektra, odnosno usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i NIST17 biblioteka masenih spektara.

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama bijelog i žutog Muškata

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			bijeli	žuti
1.	etil-acetat	1,70	3,5	2,2
2.	3-metilbutan-1-ol	2,21	12,7	6,4
3.	etil-butanoat	2,80	/	0,2
4.	heksan-1-ol	3,68	0,6	0,6
5.	izoamil-acetat	3,83	7,8	7,4
6.	heksanska kiselina	6,02	0,8	0,4
7.	etil-heksanoat	6,66	4,7	2,8

8.	heksil-acetat	7,07	1,5	1,3
9.	heksa-2,4-dienska kiselina ^{a,*}	8,99	/	3,4
10.	etil-heksa-2,4-dienoat ^{a,*}	9,99	/	1,1
11.	linalol	10,05	1,0	0,7
12.	2-feniletanol	10,55	2,1	0,7
13.	oktanska kiselina	13,20	12,3	5,1
14.	α -terpineol	13,64	0,4	/
15.	etil-oktanoat	13,91	24,0	18,4
16.	2-feniletil-acetat	16,36	2,2	1,1
17.	dekanska kiselina	21,08	6,9	1,6
18.	etil-dekanoat	22,18	19,0	7,1
19.	etil-dodekanoat	30,02	0,5	/
20.	oktadec-9-enska kiselina	48,50	/	37,2
Ukupno identificirano (%)			100	97,7

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim ekstrakcijom tekuće-tekuće

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			bijeli	žuti
1.	furfural	3,23	/	5,0
2.	propan-2-ol	3,65	6,7	/
3.	izoamil-acetat	3,83	1,9	/
4.	heksan-2-ol ^a	3,84	/	3,9
5.	ksilen*	4,22	1,2	/
6.	5-metilfurfural ^a	5,74	/	1,5
7.	heksanska kiselina	6,02	3,5	/

8.	etil-heksanoat	6,66	0,7	/
9.	etil-4-hidroksibutanoat ^a	8,37	0,8	/
10.	4,5-dimetilfurfural ^a	9,23	/	0,8
11.	metil-2-furoat ^a	9,45	/	5,8
12.	heksa-2,4-dienska kiselina ^{a,*}	10,19	/	10,2
13.	2,4-dimetil-5,6-dihidro-2H-piran ^a	10,50	/	4,8
14.	2-feniletanol	10, 55	17,7	1,1
15.	<i>N</i> -izoamilacetamid ^a	11,39	1,4	/
16.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil- -4H-piran-4-on ^a	11,89	/	6,5
17.	dietil-sukcinat ^a	13,13	19,5	2,4
18.	oktanska kiselina	13,20	3,2	/
19.	3,5-dihidroksi-2-metil- -4H-piran-4-on ^a	13,51	/	0,4
20.	etil-oktanoat	13,91	1,6	/
21.	<i>p</i> -vinilfenol	14,76	/	1,1
22.	5-(hidroksimetil)furfural	15,50	/	22,7
23.	dietil-malat ^{a,*}	16,81	0,9	/
24.	α -hidroksibutanska dikiselina ^a	18,80	16,6	11,4
25.	dietil-malat ^{a,*}	19,05	5,4	/
25.	etil-3-hidroksiheksanoat ^a	19,14	/	6,1
26.	dekanska kiselina	21,81	2,7	0,2
27.	2-(<i>p</i> -hidroksifenil)etanol	23,27	2,9	1,7
28.	oktadec-9-enska kiselina	48,50	2,1	0,7

Ukupno identificirano (%)

88,8

96,2

4. RASPRAVA

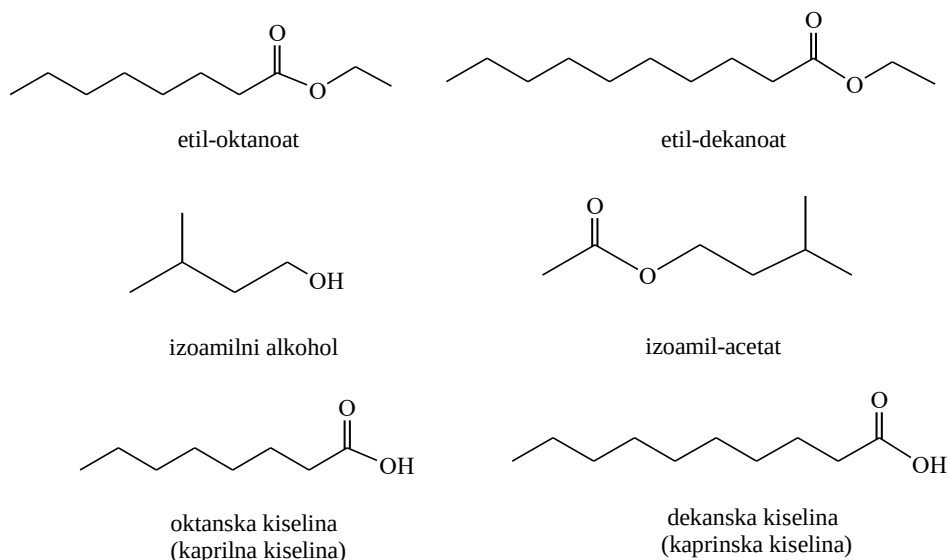
Cilj ovog rada bio je istražiti spojeve arome vina proizvedenog od grožđa sorte muškat i to muškat bijeli i muškat žuti. Muškatne sorte imaju specifičnu aromatičnost, to jest miris na muškatno grožđe. Muškatna vina su jedina vina koja mirišu na grožđe i kad postanu vina. U nas je najpopularniji muškat bijeli, a drugi po popularnosti je muškat žuti. Spojevi arome je uobičajeni naziv za hlapljive spojeve koji su odgovorni za miris hrane i pića, i zajedno sa nehlapljivim spojevima koji su odgovorni za okus, čine aromu neke hrane ili pića.

Istraživanje spojeva arome sastojalo se od izolacije hlapljivih spojeva iz muškata bijelog i muškata žutog te određivanja sastava i sadržaja tih spojeva u odabranim uzorcima vina. U radu su korištene dvije metode izolacije, mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i ekstrakcija tekuće-tekuće sa smjesom otapala pentan:dietil-eter, 1:2 v/v. Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva, odnosno vršne pare i ekstrakt, analizirani su spregnutim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 1 i 2.

4.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

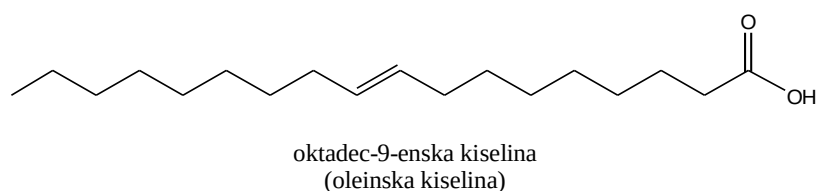
Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) prikazan je u tablici 1. U vršnim parama muškata bijelog identificirano je 16 spojeva, a vršnim parama muškata žutog 18 spojeva, što predstavlja 100 %, odnosno 97,7 % uzorka.

Glavni spojevi u vršnim parama muškata bijelog su etilni esteri masnih kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca, kaprilne (C₈) i kaprinske (C₁₀) kiseline: etil-oktanoat (24,0 %) i etil-dekanoat (19,0 %). Kvantitativno značajni sastojci vršnih para su viši alkohol 3-metilbutan-1-ol (izoamilni alkohol; 12,7 %) i oktanska kiselina (kaprilna; 12,3 %), a slijede ester izoamil-acetat (7,8 %) i dekanska ili kaprinska kiselina (6,9 %) (slika 16). U vršnim parama muškata bijelog identificirana su samo dva terpena, monoterpenski alkoholi linalol (1,0 %) i α -terpineol (0,4 %).



Slika 16. Glavni sastojci vršnih para muškata bijelog

Glavni sastojak vršnih para muškata žutog je nezasićena masna kiselina oktaдец-9-enska kiselina (slika 17), koja se uobičajeno naziva svojim trivijalnim imenom oleinska kiselina (37,2 %). Maseni udio etilnog estera kaprilne kiseline, etil-oktanoata, je također vrlo visok (18,4 %), a slijede etilni ester kaprinske kiseline, etil-dekanoat (7,1 %), i ester izoamil-acetat (7,4 %). Kvantitativno značajni sastojci vršnih para muškata žutog su još i izoamilni alkohol (6,4 %) i oktanska kiselina (kaprilna; 5,1 %). U vršnim parama muškata žutog identificiran je samo jedan terpen i to monoterpenski alkohol linalol (0,7 %).



Slika 17. Oleinska kiselina

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) je prikladna metoda za izolaciju hlapljivih spojeva primarne arome vina, među kojima su najvažniji monoterpeni i C₁₃-norizoprenoidi.¹² Međutim, u ovom radu identificirana su samo dva spoja primarne arome, i to monoterpenski alkoholi linalol i α-terpineol. Pritom je linalol identificiran u oba uzorka muškata, dok je α-terpineol identificiran samo u muškatu bijelom.

S obzirom na navedeno može se slobodno reći da su svi spojevi izolirani HS-SPME metodom iz oba uzorka muškata, spojevi arome fermentacije vina. U oba uzorka prevladavaju hlapljivi esteri, prvenstveno esteri masnih kiselina srednje dugog

ugljikovodičnog lanca, odgovarajuće masne kiseline i viši alkoholi. Općenito, dvije glavne skupine estera koje se nalaze u vinima su acetati i etilni esteri masnih kiselina. U muškatu bijelom i žutom identificirani su etil-butanoat, etil-heksanoat, etil-oktanoat, etil-dekanoat i etil-dodekanoat. Od acetata najzastupljeniji je izoamil-acetat, a slijede etil-acetat, heksil-acetat i 2-feniletal-acetat. Esteri su odgovorni za voćne arome vina, kao što su aroma ananasa i kruške (aroma etil-oktanoata) te aroma banane (izoamil-acetat).¹⁶ Masne kiseline identificirane u vršnim parama oba istraživana muškata su heksanska (kapronska), oktanska (kaprilna) i dekanska (kaprinska) kiselina, a u muškatu žutom i oktadec-9-enska kiselina (oleinska). U oba uzorka muškata identificirana su tri viša alkohola, izoamilni alkohol, koji je i najzastupljeniji, te 2-feniletanol i heksan-1-ol. Izoamilni alkohol je glavni viši alkohol i u muškatu bijelom iz Portugala, a on daje vinima aromu viskija, slada i arome paljevine.¹⁶

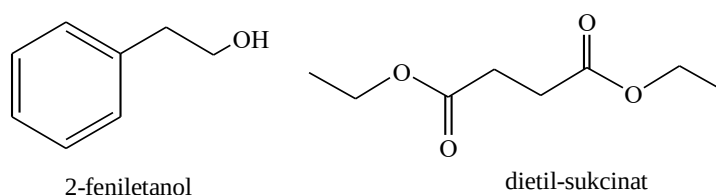
4.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće sa smjesom otapala pentan:dietil-eter (1:2 v/v) dan je u tablici 2. U muškatu bijelom identificirano je 17 hlapljivih spojeva što predstavlja 88,8 % od ukupnog uzorka. Glavni sastojci u uzorku su dietil-sukcinat (19,5 %), 2-feniletanol (17,7 %) i jabučna kiselina (α -hidroksibutanska dikiselina; 16,6 %) te propan-2-ol (6,7 %) i dietil-malat (5,4 %). U ekstraktu muškata žutog identificirano je 18 hlapljivih spojeva što čini 96,2 % od ukupnog uzorka. Glavni sastojak u ovom uzorku je 5-(hidroksimetil)furfural (22,7 %). Kvantitativno značajni sastojci su i jabučna kiselina (11,4 %) te hekso-2,4-dienska kiselina (sorbinska kiselina; 10,2 %). Zanimljivo je da je u ekstraktu muškata žutog, za razliku od muškata bijelog, identificirano nekoliko derivata furana. Pored 5-(hidroksimetil)furfurala, koji je i glavni sastojak ekstrakta, identificirani su metil-2-furoat (5,8 %), furfural (5,0 %), 5-metilfurfural (1,5 %) i 4,5-dimetilfurfural (0,8 %).

U oba ekstrakta muškata prevladavaju spojevi arome fermentacije vina, a u ekstraktu muškata žutog identificirani su i spojevi arome dozrijevanja. Niti jedan od spojeva primarne arome nije identificiran u ekstraktima muškata bijelog i žutog.

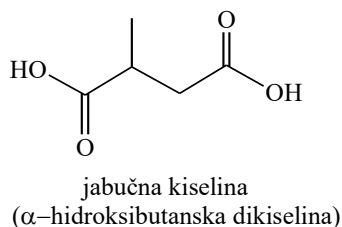
Glavni hlapljivi spojevi u ekstraktu muškata bijelog, 2-feniletanol i dietil-sukcinat (slika 18) spadaju u hlapljive spojeve arome fermentacije vina.¹² 2-Feniletanol spada u

skupinu viših alkohola i važan je za senzorsku aromu vina. Ovaj alkohol nastaje iz aminokiseline fenilalanina tijekom alkoholne fermentacije. Međutim 2-feniletanol je u glikozidno vezanom obliku prisutan i u grožđu te vjerojatno jedan dio ovog alkohola potječe i iz grožđa. Visok sadržaj 2-feniletanola karakterističan je za slatka vina (npr. prošek). Sadržaj ovog alkohola je znatno viši u muškatu bijelom nego u muškatu žutom (17,7 % prema 1,1 %) što je dokazano i u portugalskim muškaticima.¹⁶ 2-Feniletanol daje vinima aromu ruže i meda.¹⁷ Općenito, porast sadržaja viših alkohola rezultat je dulje maceracije uz doticaj s kisikom i više temperature fermentacije.¹²



Slika 18. Glavni sastojci ekstrakta muškata bijelog

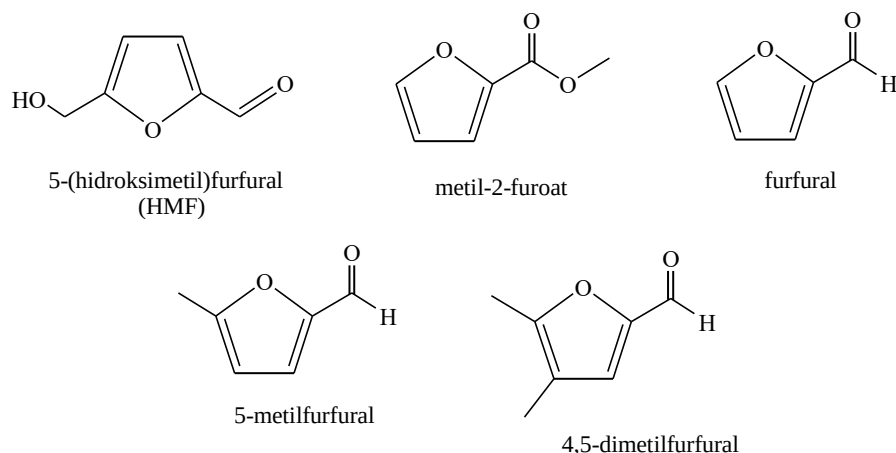
Hlapljivi esteri, kao što je dietil-sukcinat (etilni esteri jantarne kiseline), nastaju jabučno-mliječnom fermentacijom, ali i esterifikacijom tijekom dozrijevanja vina. Sukcinati vinima daju laganu voćnu aromu. Visoki sadržaj jabučne kiseline (slika 19; α -hidroksibutanska dikiselina) u oba uzorka muškata ukazuje da nije došlo do jabučno-mliječne fermentacije ili da je ona bila nepotpuna (fenomen odgođene ili trome malolaktične fermentacije). Jabučna kiselina u vinima potječe iz grožđa. S obzirom na navedeno, dietil-sukcinat, koji je identificiran u ekstraktu muškata bijelog u znatno većoj količini nego u muškatu žutom (19,5 % prema 2,4 %), je vjerojatno nastao tijekom dozrijevanja i starenja vina, odnosno spoj je tercijarne arome vina (arome dozrijevanja ili starenja).



Slika 19. Jabučna kiselina

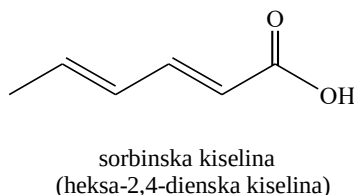
Za razliku od muškata bijelog, u ekstraktu muškata žutog identificirano je pet derivata furana, od kojih je 5-(hidroksimetil)furfural i glavni sastojak ekstrakta (slika 20). Prisustvo derivata furana karakteristično je za vina dozrela u drvenim bačvama. Derivati

furana su spojevi tercijarne arome vina koji nastaju nakon fermentacije kada vino ide na odležavanje, često i u drvene bačve, te dolazi do dozrijevanja i starenja vina.^{12, 13}



Slika 20. Derivati furana u ekstraktu muškata žutog

Sorbinska kiselina (heksa-2,4-dienska kiselina) spada među kvantitativno glavne hlapljive spojeve ekstrakta muškata žutog, a u ekstraktu muškata bijelog nije identificirana (slika 21). Sorbinska kiselina je prirodni spoj koji se koristi kao konzervans u prehrambenoj industriji u svrhu sprječavanja rasta gljivica, plijesni i kvasaca. Glavna funkcija sorbinske kiseline je spriječiti neželjeni rast kvasaca u vinu, a da pri tom ne ometa aktivnost bakterija. Najviše se koristi kod bijelih slatkih vina, kao što su muškati, koja su sklona kvarenju kako bi se spriječilo sekundarno vrenje.



Slika 21. Sorbinska kiselina

5. ZAKLJUČAK

- Cilj ovog istraživanja, istraživanje spojeva arome dvaju uzoraka muškatinih vina, je ostvaren. Spojevi arome su izolirani dvjema metodama izolacije, ekstrakcijom tekuće-tekuće i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, te analizirani spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija.
- Profil hlapljivih spojeva izoliranih HS-SPME metodom iz oba uzorka muškata je kvalitativno i kvantitativno sličan. U oba uzorka muškata prevladavaju spojevi arome fermentacije vina, kao što su hlapljivi esteri, prvenstveno esteri masnih kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca, odgovarajuće masne kiseline i viši alkoholi. Najzastupljeniji esteri su etil-oktanoat, etil-dekanoat i izoamil-acetat, od masnih kiselina oktanska i dekanska kiselina te oktadec-9-enska kiselina (u vršnim parama muškata žutog), a najzastupljeniji viši alkohol u oba uzorka je izoamilni alkohol. Identificirana su samo dva spoja primarne arome, i to monoterpenski alkoholi linalol i α -terpineol u muškatu bijelom, a u muškatu žutom samo linalol.
- U oba ekstrakta muškata, dobivena kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće, prevladavaju spojevi arome fermentacije vina, a u ekstraktu muškata žutog identificirani su i spojevi arome dozrijevanja. Niti jedan od karakterističnih spojeva primarne arome (terpena, C₁₃-norizoprenoida) nije identificiran u ekstraktima muškata bijelog i žutog.
- Glavni hlapljivi spojevi u ekstraktu muškata bijelog su 2-feniletanol i dietil-sukcinat koji su spojevi arome fermentacije, a vinima daju cvjetnu i laganu voćnu aromu.
- U ekstraktu muškata žutog, za razliku od muškata bijelog, dominiraju derivati furana, sa 5-(hidroksimetil)furfuralom kao glavnim sastojkom ekstrakta. Derivati furana su spojevi tercijarne arome vina koji nastaju nakon fermentacije kada vino ide na odležavanje te dolazi do dozrijevanja i starenja vina.
- Visoki sadržaj jabučne kiseline u oba uzorka muškata ukazuje da nije došlo do jabučno-mliječne fermentacije ili da je ona bila nepotpuna. S obzirom da jabučna kiselina u vinima potječe iz grožđa, može se smatrati spojem primarne arome vina.

- Sorbinska kiselina identificirana je samo u vršnim parama i ekstraktu muškata žutog. Pretpostavka je da je sorbinska kiselina dodana u vino od strane vinara kako bi se spriječilo sekundarno vrenje i kvarenje slatkog muškata.
- Muškatna vina imaju specifičnu aromatičnost i jedina su vina koja mirišu na grožđe. Kako spojevi primarne arome potječu iz grožđa, istraživanja HS-SPME metodom, koja je prikladna za istraživanje spojeva primarne arome, treba nastaviti korištenjem različitih vlakana kao i mijenjanjem temperature i vremena uzorkovanja vršnih para.
- Za detaljno istraživanje spojeva arome vina, koje uključuje spojeve primarne, sekundarne, tercijarne i arome dozrijevanja, potrebno je nastaviti istraživanja koristeći različite metode izolacije hlapljivih spojeva.

6. LITERATURA

1. S. Herjavec, *Vinarstvo*, Nakladni Zavod Globus, Zagreb, **2019**, str. 145-189.
2. M. Zoričić, *Podrumarstvo*, Nakladni Zavod Globus, Zagreb, **1996**, str. 15-26, 119-132
3. <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=aroma> (26. kolovoza 2020.).
4. <https://www.plantea.com.hr/vinova-loza/> (24. kolovoza 2020.).
5. <http://www.vinarija-safran.hr/index.php/hr/vinarija-safran/muskat-zuti> (11. rujna 2020.)
6. <https://bs.wikipedia.org/wiki/Gro%C5%BE%C4%91e> (24. kolovoza 2020.).
7. <http://www.vinoputi.hr/hr/8502/zakon-o-vinu-nn-9603/> (24. kolovoz 2020.)
8. I. Alpeza, Glasnik zaštite bilja **6** (2008) 143-150.
9. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Food Chemistry, Springer, New York, 2009, p. 340.
10. E. Lengyel, *Primary aromatic character of wines*, Faculty of Agricultural Sciences, Food Industry and Environmental Protection "Lucian Blaga" University of Sibiu, Romania, 2012, pp. 3-18.
11. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, **2011**.
12. V. Ferreira, F. San Juan, *Flavor of Wine* in: H. Jeleń (Ed.), *Food Flavors*, Chemical, Sensory and Technological Properties, CRC Press, Boca Raton, 2012, pp. 269-299.
13. I. Lukić, S. Radeka, A. Vanzo, K. Lisjak, D. Bavčar, *Proceedings, 50th and 10th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 2015, 515-520.
14. I. Jerković; A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, **2009**.

15. A. Radonić, *Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (Juniperus oxycedrus L.)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2000**.
16. D. Jesus, F. M. Campos, M. Ferreira, J. A. Couto, *Eur. Food Res. Technol.*, **243** (2017) 1277-1285.
17. I. Budić-Leto, G. Zdunić, M. Banović, K. Kovačević Ganić, I. Tomić-Potrebuješ, T. Lovrić, *Food Technol. Biotechnol.*, **48** (2010) 530-537.