

Određivanje hlapivih spojeva u vinu primjenom SPME- "Arrow" tehnike

Buljević, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:987434>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA U VINU
PRIMJENOM SPME-„ARROW“ TEHNIKE**

DIPLOMSKI RAD

Nina Buljević

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Hortikultura – vinogradarstvo i vinarstvo

**ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA U VINU
PRIMJENOM SPME-„ARROW“ TEHNIKE**

DIPLOMSKI RAD

Nina Buljević

Mentor:

Prof. dr. sc. Ana Jeromel

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Nina Buljević**, JMBAG 0178112216, rođena 21.7.1997. u Splitu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA U VINU PRIMJENOM SPME-„ARROW“ TEHNIKE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Nine Buljević**, JMBAG 017811221, naslova

ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA U VINU PRIMJENOM SPME-„ARROW“ TEHNIKE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Ana Jeromel, mentor _____
2. Izv. prof. dr. sc. Ana-Marija Jagatić Korenika, član _____
3. Izv. prof. dr. sc. Darko Preiner, član _____

Zahvala

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Ani Jeromel i dr. sc. Ivani Tomaz na uloženom trudu, stručnim savjetima, konstruktivnim kritikama i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Beskrajno zahvaljujem svojim roditeljima na podršci i potpori tijekom cijelog studiranja. Želim zahvaliti i svim svojim prijateljima koji su učinili da ovo studiranje pamtim samo po lijepim trenucima.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Cilj istraživanja..... | 1 |
| 2. Pregled literature | 2 |
| 2.1. Hlapivi spojevi vina | 2 |
| 2.1.1. Terpeni..... | 2 |
| 2.1.2. Metokspirazini | 3 |
| 2.1.3. Norizoprenoidi..... | 4 |
| 2.1.4. Tioli | 5 |
| 2.1.5. Viši alkoholi | 6 |
| 2.1.6. Masne kiseline | 7 |
| 2.1.7. Esteri..... | 8 |
| 2.1.8. Karbonilni spojevi..... | 9 |
| 2.1.9. Hlapivi fenoli..... | 10 |
| 2.1.10. Hlapivi spojevi sumpora..... | 10 |
| 2.1.11. Acetali..... | 11 |
| 2.1.12. Laktoni | 11 |
| 2.2. Metode određivanja hlapivih spojeva u vinu | 12 |
| 2.2.1. Metode ekstrakcije | 12 |
| 2.2.2. Plinska kromatografija..... | 18 |
| 3. Materijali i metode | 20 |
| 3.1. Uzorci vina..... | 20 |
| 3.2. SPME- <i>Arrow</i> i GC-MS analiza..... | 20 |
| 3.3. Optimizacija SPME- <i>Arrow</i> metode za određivanje hlapivih spojeva u vinu . | 21 |
| 3.3.1. Identifikacija spojeva prisutnih u uzorku vina | 21 |
| 3.3.2. Određivanje volumena uzorka | 22 |
| 3.3.3. Određivanje mase soli | 22 |
| 3.3.4. Eksperimentalni dizajn i statistička analiza | 22 |
| 4. Rezultati | 23 |
| 4.1. Odabir uzorka vina i identifikacija pojedinih spojeva u uzorku | 23 |
| 4.2. Odabir volumena uzorka | 26 |
| 4.3. Odabir sorbensa SPME- <i>Arrow</i> | 26 |
| 4.4. Odabir mase dodane soli..... | 27 |
| 4.5. Optimizacija uvjeta SPME- <i>Arrow</i> ekstrakcije primjenom eksperimentalnog dizajna..... | 28 |
| 5. Zaključak | 33 |
| 6. Literatura | 34 |

| | |
|-------------------|----|
| 7. Prilog | 38 |
| 7.1. Slike..... | 38 |
| 7.2. Tablice..... | 38 |
| Životopis | 39 |

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Nine Buljević**, naslova

ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA U VINU PRIMJENOM SPME-„ARROW“ TEHNIKE

Vino sadrži velik broj hlapivih spojeva koji se nalaze u koncentracijama od nekoliko mg/L do nekoliko ng/L. Provedena je optimizacija novije ekstrakcijske tehnike SPME-Arrow sa ciljem njezine primjene u analizi hlapivih spojeva vina. Za potrebe optimiranja metode koristio se homogenizirani uzorak bijelog vina. Određivanje sastava i koncentracije spojeva provedeno je primjenom vezanog sustava GC-MS opremljenog kapilarnom kolonom TR-WAXMS A. Optimizacija metode obuhvatila je ispitivanje temperature ekstrakcije, inkubacijsko vrijeme i vrijeme izlaganja analita. Primjenom Box-Behnkenova eksperimentalnog dizajna optimirani su navedeni parametri. Optimalni uvjeti za ekstrakciju hlapivih spojeva bijelih vina su sljedeći: temperatura ekstrakcije 50 °C, inkubacijsko vrijeme 10 minuta te vrijeme izlaganja 60 minuta. Optimizirana metoda omogućava analizu hlapivih spojeva u vinu te se može primijeniti na velik broj uzoraka.

Ključne riječi: SPME-Arrow, hlapivi spojevi, bijelo vino

Summary

Of the master's thesis – student **Nina Buljević**, entitled

DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN WINE USING SPME-“ARROW” METHOD

Wine contains a large number of volatile compounds found in concentration of several mg/L to a few ng/L. The optimization of new SPME-Arrow extraction technique was carried out in order to be applicable in the analysis of wine volatile compounds. For the optimization of the method, a homogenized sample of white wine was used. The composition and concentration of the compounds were determined using a coupled GC-MS system equipped with TG-WAXMS A capillary column. The optimization method included examination of extraction temperature, incubation time and exposure time of analyte. By applying the Box-Behnken experimental design, the specified parameters were optimized. The optimal conditions for the extraction of volatile compounds of white wine are as followed: extraction temperature 50°C, incubation time 10 minutes, and exposure time 60 minutes. The optimized method enables the analysis of volatile compounds in wine and can be applied to a large number of samples.

Keywords: SPME-Arrow, volatile compounds, white wine

1. Uvod

U vinu se nalazi više od 1000 hlapivih kemijskih spojeva u koncentracijama od nekoliko mg/L do nekoliko ng/L koji sudjeluju u formiranju arome vina. Iako je velika raznolikost aromatskih spojeva u vinu, samo nekoliko njih pridonosi senzornoj percepciji mirisa vina. Percepcija okusa vina i aroma rezultat je različitih interakcija između velikog broja kemijskih spojeva i senzornih receptora (Zhu i sur. 2016.). Svi spojevi imaju aktivnu mirisnu vrijednost (engl. *Odour active value*, OAV) koja se dobiva dijeljenjem koncentracije pojedinog kemijskog spoja s pragom njegove percepcije. Ovaj parametar je prva procjena utjecaja pojedinog spoja na aromu vina pa tako spojevi čiji je $OAV > 1$ pridonose aromi, no u kompleksnim smjesama kao što je vino ta vrijednost nije dovoljna za određivanje njihovog utjecaja na aromu (Ferreira 2010.).

Određivanje sastava i koncentracije hlapivih spojeva u vinima najčešće se provodi primjenom vezanog sustava plinski kromatograf – spektrometar masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS). Prije analize potrebno je izolirati analite primjenom neke od ekstrakcijskih tehnika. Pri analizi hlapivih spojeva vina najčešće korištene tehnike su ekstrakcija tekuće – tekuće, ekstrakcija na čvrstoj fazi, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) i ekstrakcija pomoću sorbensa nanesenog na magnet za miješanje. Svaka od navedenih ekstrakcijskih tehnika ima prednosti i nedostatke uporabe zbog čega se provode istraživanja kako bi se pojedina tehnika optimirala za potrebu specifičnih analiza. Jedna od novijih metoda je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi u izvedbi klina (engl. *SPME-Arrow*). Kako bi se navedena metoda mogla koristiti za analiziranje hlapivih spojeva u vinu, potrebno je optimizirati metodu. Općenito, tijekom optimizacije SPME ekstrakcijske metode, potrebno je uzeti u obzir vrstu sorbensa, način ekstrakcije, razdvajanje i detekcija, metoda miješanja, derivatizacija analita, volumen uzorka, pH, ionska jakost, sadržaj vode, sadržaj organskog otapala, temperatura uzorka, vrijeme ekstrakcije, uvjeti desorpcije i metoda kalibracije (Risticovic i sur. 2010.).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti detaljno optimiranje metode *SPME-Arrow* sa ciljem njezine primjene pri određivanju hlapivih spojeva bijelog vina. Prilikom optimiranja metode u obzir su uzeti volumen uzorka, vrsta sorbensa nanasena na *SPME-Arrow*, potreba dodavanja natrijevog klorida, temperatura ekstrakcije, vrijeme inkubacije i vrijeme izlaganja.

2. Pregled literature

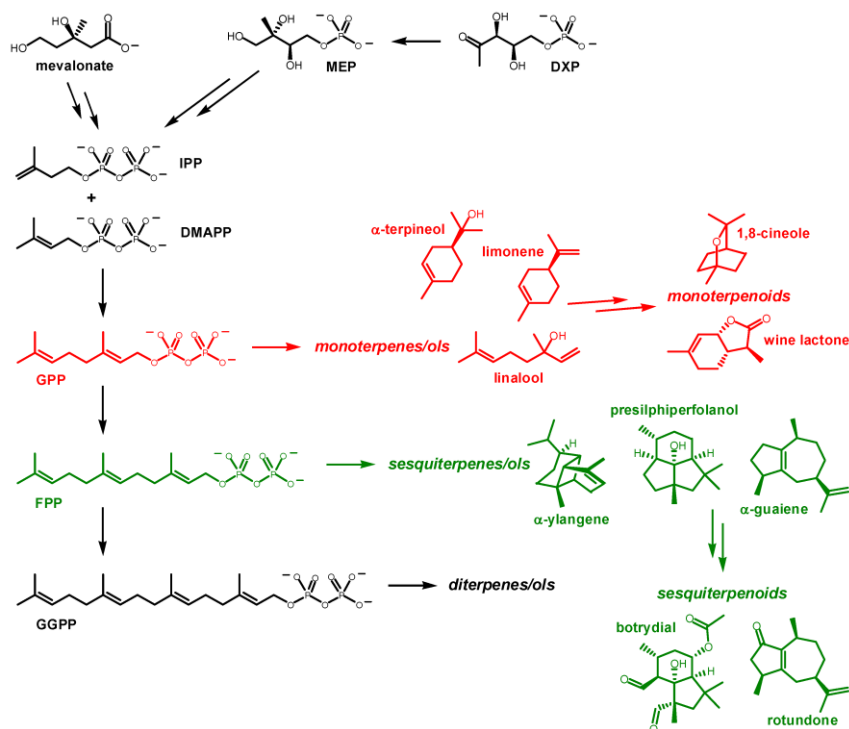
2.1. Hlapivi spojevi vina

Više stotina hlapivih spojeva je detektirano u vinu. Raznolikost ovih spojeva je velika, a u vinu se nalaze u širokom omjeru koncentracija od nekoliko ng/L do više od tisuću mg/L (Zhu i sur. 2016.). Hlapivi spojevi vina se mogu podijeliti u različite skupine s obzirom na kemijsku strukturu. U vinu su zastupljeni terpeni, metokspirazini, C-13 norizoprenoidi, tioli, viši alkoholi, masne kiseline, esteri, karbonilni spojevi, hlapivi fenoli, hlapivi spojevi sumpora, acetali i laktoni.

2.1.1. Terpeni

Terpeni čine veliku skupinuspojeva koji kao osnovnu građevnu jedinicu imaju izopren (C_5H_8). S obzirom na broj C-atoma mogu se podijeliti na hemiterpene (C5), monoterpene (C10), seskviterpene (C15), diterpene (C20), triterpene (C30) i tetraterpene ili karotene (C40) (Li i sur. 2019.). U grožđu i vinu terpeni se nalaze u slobodnom ili češće u vezanom (glikoziliranom) obliku. Monoterpeni su spojevi koji se nalaze u obliku jednostavnih ugljikovodika (limonen, mircen i dr.), aldehida (linal, geranial i dr.), alkohola (linalol, geraniol i dr.), kiselina (linalna i geranska kiselina i dr.), te estera (linalilacetat, itd.). Identificirano je više desetaka različitih monoterpena u grožđu i vinu, a najzastupljeniji su linalol, α -terpineol, nerol, geraniol, citronelol i hotrienol (Ribéreau-Gayoni sur. 2006.). Značajno doprinose aromi bijelih vina proizvedenih od muškatnih sorata i aromatičnih nemuškatnih sorata (Robinson i sur. 2014.a). Seskviterpeni se obično dijele, ovisno o broju ugljikovih prstenova u kemijskoj strukturi, na acikličke, monocikličke, bicikličke, tricikličke i tetracikličke seskviterpene. Osim aromatskog doprinosa, seskviterpeni imaju potencijalno zdravstvenu dobrobit. Najznačajniji predstavnik je rotundon koji je odgovoran za aromu crnog papra u vinima sorte 'Syrah' (Li i sur. 2019.).

Biosinteza terpena započinje iz izopentil pirofosfata (IPP) i dimetilalil pirofosfata (DMAPP). Ove preteče nastaju u citosolu putem mevalonske kiseline (MVA) iz tri molekule acetyl-CoA ili u plastidima putem 2-C-metileritritol-4-fosfat (MEP) iz piruvata i gliceraldehid-3-fosfata. Djelovanjem terpen sintetaza (TPS), monoterpeni nastaju iz 2*E*-geranil difosfata (GPP), seskviterpeni iz 6*E*-farnezil difosfata (FPP), a diterpeni iz geranilgeranil difosfata (GGPP) (Slika 2.1.) (Wedler i sur. 2015.). Biosinteza ovih spojeva je regulirana skupinom gena terpen sintaze (*VvTPS*) (Robinson i sur., 2014.a).

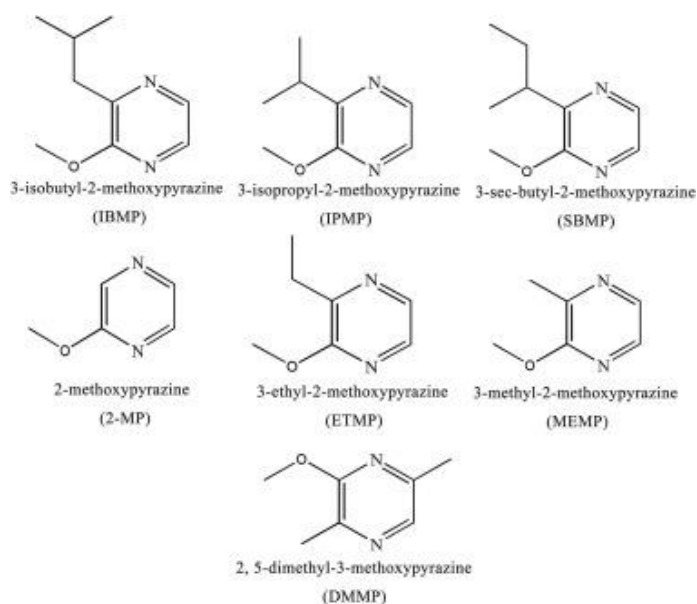


Slika 2.1. Biosinteza terpena

Izvor: Wedler i sur. 2015.

2.1.2. Metokspirazini

Skupina spojeva 3-alkil-2-metokspirazini su hlapivi heterociklički spojevi koji sadrže dušik, a nastaju metabolizmom aminokiselina (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.). Prisutni su u vrlo niskim koncentracijama u grožđu i vinu (obično 2 do 30 ng/L), dok prag senzorne detekcije iznosi 1 do 2 ng/L u vodi i 2 do 16 ng/L u vinu, što objašnjava zašto metokspirazini imaju snažan učinak na aromu i okus vina. Sedam metokspirazina identificirano je u grožđu i vinu 2-metokspirazin (2-MP), 3-metil-2-metokspirazin (MEMP), 3-etil-2-metoksi-pirazin (ETMP), 3-izobutil 2-metokspirazin (IBMP), 3-izopropil-2-metokspirazin (IPMP), sek-butil-2-metokspirazin (SBMP) i 2,5-dimetil-3-metokspirazin (DMMP) (Slika 2.2.) (Lei i sur. 2017.). Među njima, IBMP, IPMP i SBMP su najzastupljeniji u grožđu i vinu, dok su drugi identificirani u vinima u vrlo niskim koncentracijama koje ne utječu na aromu ili okus vina. Imaju važnu ulogu u aromi grožđa i vina 'Sauvignon bijeli', 'Cabernet Sauvignon', 'Cabernet franc', 'Merlot' i 'Carmenerea'. Niske razine metokspirazina doprinose sortnom karakteru ovih vina te daju senzorne karakteristike paprike, šparoge ili grašak. Međutim, visoke se razine smatraju nepoželjnima jer mogu rezultirati neprihvatljivim zelenim i nezrelim aromama (Robinson i sur. 2014.a). Različiti čimbenici utječu na koncentraciju metokspirazina u grožđu od kojih je potrebno navesti sortu, klimu i tlo, vlažnost, temperaturu, izloženost svjetlu, te različite ampelotehničke mjere. Sadržaj metokspirazina u vinima uglavnom ovisi o njihovoj koncentraciji u grožđu od kojeg su proizvedena, dok je utjecaj tehnike proizvodnje vina vrlo malen (Lei i sur.2017.).



Slika 2.2. Kemijska struktura metoksipirazina identificiranih u grožđu i vinu
Izvor: Lei i sur. 2017.

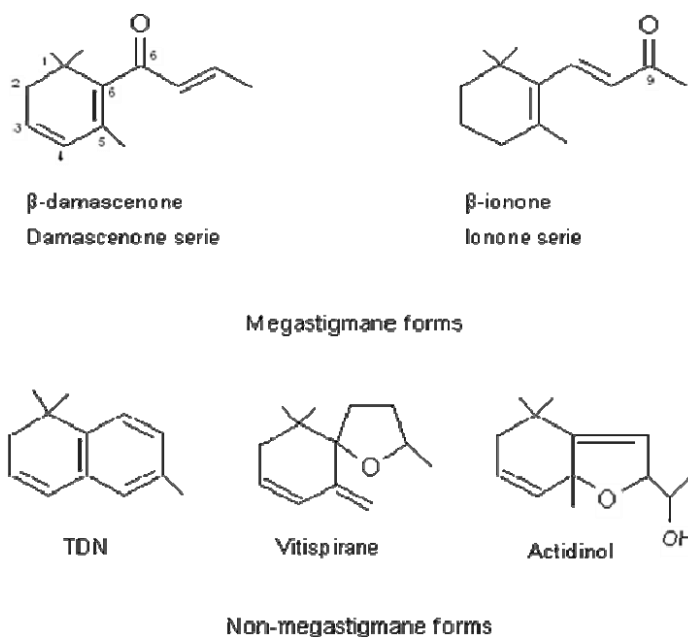
Biosintetski put metoksipirazina nije u potpunosti razjašnjen, no pretpostavljeni put biosinteze počinje razgranatom aminokiselinom. Posljednji korak sastoji se od metilacije alkil-2-hidroksipirazina (HP), te djelovanjem specifičnih metiltransferaza nastaju alkil-2-metoksipirazini (MP). Međutim, početni korak ciklizacije nije potvrđen u biljkama, a metabolički međuprodukti između početne razgranate aminokiseline i prevođenjau HP još su nepoznati, kao i ključni enzimi koji kataliziraju svaki korak (Lei i sur. 2017.).

2.1.3. Norizoprenoidi

Oksidacijskom razgradnjom karotenoida (C40) nastaju derivati s 9, 10, 11 ili 13 ugljikovih atoma, odnosno nastaju spojevi koji se nazivaju norisoprenoidi (apokarotenoidi) (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.). Specifični enzimatski sustavi uključeni u početnu biorazgradnju i oksidacijsko cijepanje karotenoida u grožđu su dioksidaze za cijepanje karotenoida (CCD). Identificirane su četiri podporodice CCD1, CCD4, CCD7 i CCD8, a cijepanje može biti simetrično ili asimetrično ovisno o enzimu i karotenoidnom supstratu (Robinson i sur. 2014.a).

U grožđu i vinu, najzastupljeniji su norisoprenoidi s 13 atoma ugljika (C13-norisoprenoidi). Mogu se podijeliti na megastigmane i ne-megastigmane, ovisno o njihovoj strukturi (Slika 2.3.). Megastigmanski kostur karakterizira benzenski prsten supstituiran na položajima C1, C5 i C6, te nezasićeni alifatski lanac s četiri ugljikova atoma vezana na C6 položaju benzenskog prstena. Megastigmani su oksigenirani C13-norisoprenoidi, sa skeletima oksigeniranim na ugljiku 7 (damaskenoni) ili ugljiku 9 (iononi) (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.). Spoj β -damaskenon koji mirisom podsjeća na cvijeće, kuhane jabuke i dunje ima nizak prag olfaktorne percepcije u vodi (2 ng/L), a koncentracije u vinima su vrlo različite te imaju velik učinak na određena vina. Deskriptori β -ionona su ljubičica i malina, a prag percepcije u vodi iznosi 7 ng/L (Mendes-Pinto 2009.). Osim β -damaskenona i β -ionona, u vinu su identificirani i 3-okso- α -ionol (duhan), 3-hidroksi- β -damaskon (čaj, duhan) i β -damaskon (duhan i voće), no mirisni učinak navedenih spojeva je zanemariv zbog visokog praga percepcije. Ne-megastigmani C13-norisoprenoidi derivati nastaju iz megastigmana kemijskim modifikacijama u kiselom mediju. Najzastupljeniji su 1,1,6-trimetil-1,2-

dihidronaftalen (TDN) koji ima karakterističan miris kerozina te aktinidoli i vitispirani koji imaju miris na kamfor (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.).



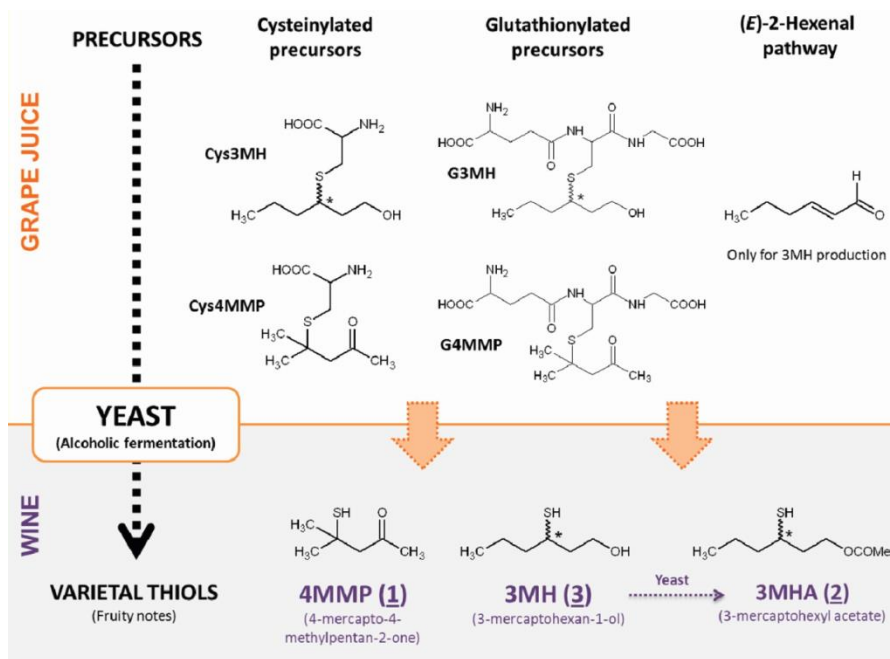
Slika 2.3. Podjela norisoprenoida na megastigmane i ne-megastigmanete kemijske strukture spojeva predstavnika

Izvor: Botelho 2008.

2.1.4. Tioli

Hlapivi tioli, povijesno poznati i pod nazivom merkaptani, organski su spojevi opće formule R-SH (R = alkilna skupina) te mogu sadržavati karboksilnu (-COOH), alkoholnu (-OH), aldehidnu (-CHO), estersku (-OC(O)-), etersku (-O-) i/ili funkcionalnu skupinu aromatskog prstena. Sulfhidrilna (-SH) skupina u tiolima jedna je od najreaktivnijih pronađenih funkcionalnih skupina u prirodi, zbog čega su tioli skloni oksidaciji, izomerizaciji i preustroju (Chen i sur. 2019.). Najzastupljeniji identificirani hlapivi tioli u grožđu i vinu su 4-merkpto-4-metilpentan-2-on (4MMP), 3-merkptoheksan-1-ol (3MH) i 3-merkptoheksil-acetat (3MHA). Iako se javljaju u vrlo niskim koncentracijama, nižim od 1 ng/L, njihove koncentracije su uvijek iznad praga percepcije te pozitivno doprinose voćnim notama mladih vina. Spoj 4MMP podsjeća na miris šimšira, pupoljka crnog ribiza i guave, 3MH marakuje i crnog ribiza, dok 3MHA daje miris marakuje i grejpa. Spojevi 4MMP, 3MH i 3MHA oslobađaju se tijekom alkoholne fermentacije iz nehlapivih preteča koji se nalaze u grožđu i moštu (Roland i sur. 2011.).

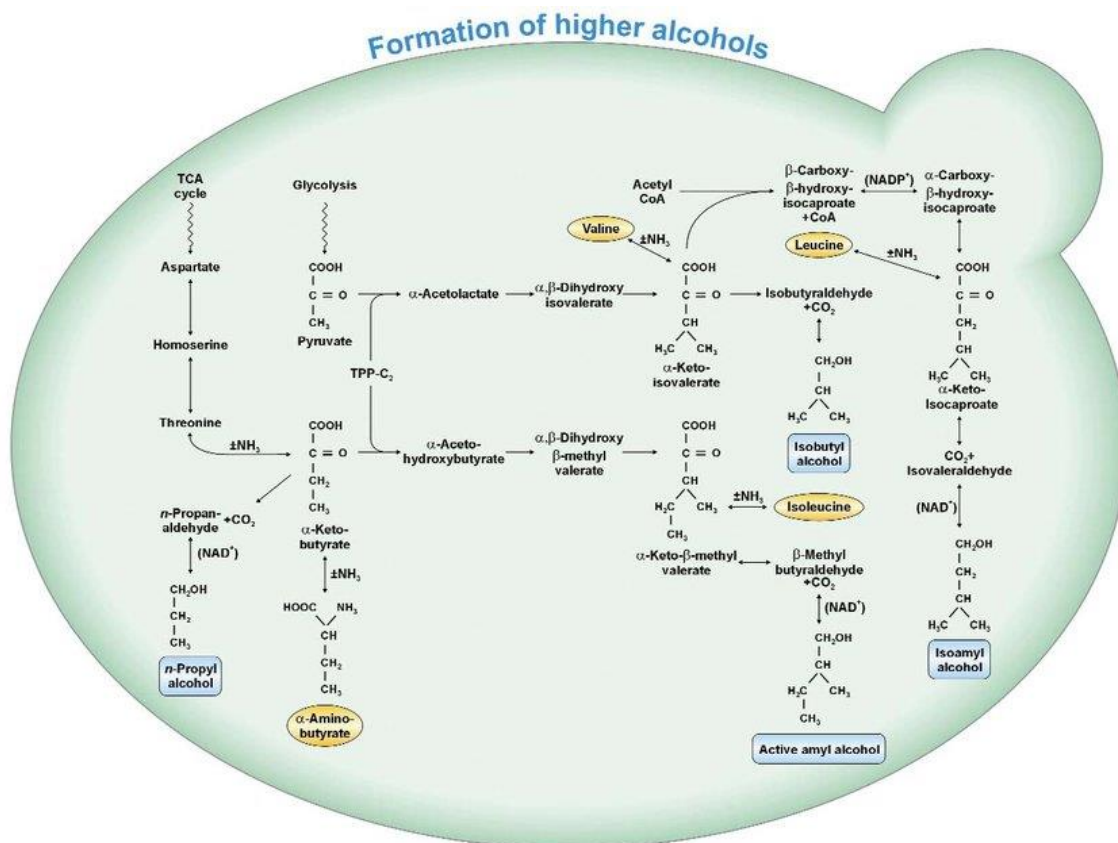
Prihvaćena su tri puta biosinteze oslobađanja 4MMP i 3MH u vinu (Slika 2.4.). Prvi put uključuje cisteinilirane preteče, S-3-(heksan-1-ol)-cistein (Cys3MH) i S-3-(4-merkpto 4-metilpentan-2-on)-cistein (Cys4MMP), a drugi put se odnosi na glutacionilirane preteče, S-3-(heksan-1-ol)-glutacion (G3MH) i S-3-(4-merkpto 4-metilpentan-2-on)-glutacion (G4MMP). Navedene preteče kvasci cijepaju djelovanjem enzima β -liaza tijekom alkoholne fermentacije. Treći put biosinteze uključuje C₆ nezasićene spojeve, kao što je (*E*)-2-heksenal, na koje se dodaje sumpor tijekom alkoholne fermentacije. Spoj 3MHA nastaje iz 3MH tijekom fermentacije, djelovanjem enzima alkohol acetiltransferaze kojeg stvara kvasac (Roland i sur. 2011.).



Slika 2.4. Tri puta biosinteze oslobađanja 4MMP i 3MH u vinu
Izvor: Roland i sur. 2011.

2.1.5. Viši alkoholi

Tijekom alkoholne fermentacije kvasci proizvode većinu viših alkohola metabolizmom šećera, sintetizirajući preteče α -keto kiseline iz piruvata i acetil-CoA putem Krebsovog ciklusa. Viši alkoholi mogu nastati i Erlichovim putem katabolizmom aminokiselina. Kvasci tijekom lag faze upotrebljavaju aminokiseline za rast, što rezultira nastankom odgovarajućih viših alkohola tijekom stacionarne faze (Robinson i sur. 2014.a). Tako su specifične aminokiseline, kao što su valin, leucin, izoleucin ili treonin, preteče za nastanak odgovarajućih viših alkohola 3-metilbutanola, 2-metilbutanola, izobutanola odnosno propanola (Slika 2.5.) (Ruiz i sur. 2019.). Među najvažnijim predstavnicima viših alkohola su izoamilni alkohol (3-metil-1-butanol), amilni alkohol (2-metil-1-butanol), izobutanol (2-metil-1-propanol), 1-propanol, heksanol, 2-fenil etanol (Robinson i sur. 2014.a). Mogu imati i pozitivan i negativan utjecaj na aromu i okus vina. Prekomjerne koncentracije viših alkohola, koje prelaze 400 mg/L, mogu rezultirati jakim, oštrim mirisom i okusom, dok koncentracije ispod 300 mg/L daju vinu voćne osobine (Swiegers 2005.). Upotreba različitih sojeva kvasca tijekom fermentacije pridonosi razlikama u profilima viših alkohola i njihovim koncentracijama u vinu. Upotreba ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao što su *Pichia kluyveri* i *Metschnikowia pulcherrima*, u vinima povećava ukupnu koncentraciju viših alkohola u usporedbi sa *S. cerevisiae*, dok upotreba *Torulaspora delbrueckii* i *Lachancea thermotolerans* pokazuje smanjenje ukupne koncentracije viših alkohola (Ruiz i sur. 2019.). Na proizvodnju viših alkohola također utječu koncentracija aminokiselina u moštu, volumni udio etanola, temperatura fermentacije, pH i sastav mošta, razina oksidacije, sorta grožđa, zrelost i vrijeme kontakta s kožicom (Swiegers 2005.).

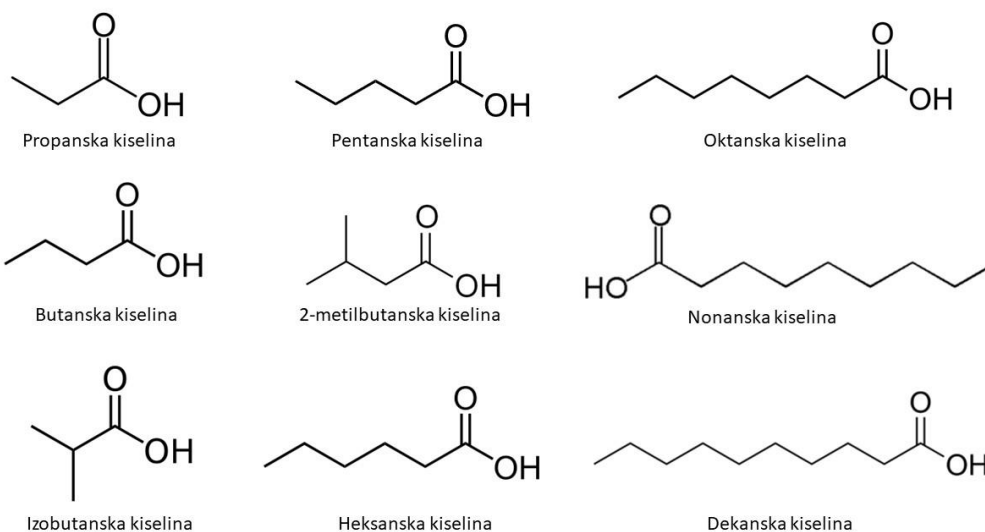


Slika 2.5. Biosinteza viših alkohola

Izvor: Swiegers i sur. 2005.

2.1.6. Masne kiseline

Većina hlapivih masnih kiselina prisutnih u vinu su zasićene ravnolančane masne kiseline čija duljina lanca može biti u rasponu od 2 do 18 ugljikovih atoma. Ostale masne kiseline razgranatog lanca uključuju 3-metil butansku, 2-metil butansku i 2-metil propansku kiselinu (Ruiz i sur. 2019.). Na nastanak masnih kiselina utječu sorta, soj kvasaca, razina šećera u moštu, bistroća mošta, te pH i temperatura tijekom fermentacije (Shinohara 1986.). U koncentracijama od nekoliko mg/L mogu djelovati kao inhibitori fermentacije ili mogu usporiti fermentaciju (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.). Neke masne kiseline, kao što su propanska ili propionska, butanska ili maslačna, izobutanska ili izomaslačna, pentanska ili valerijska, 2-metilbutanska ili 2-metilmaslačna, heksanska, oktanska, nonanska i dekanska kiselina, imaju neugodne arome koje su opisane kao užegle i oštre (Slika 2.6.). No, u koncentracijama nižim od 50 do 100 mg/L daju vinu voćni karakter (Ruiz i sur. 2019.).



2.6. Više masne kiseline

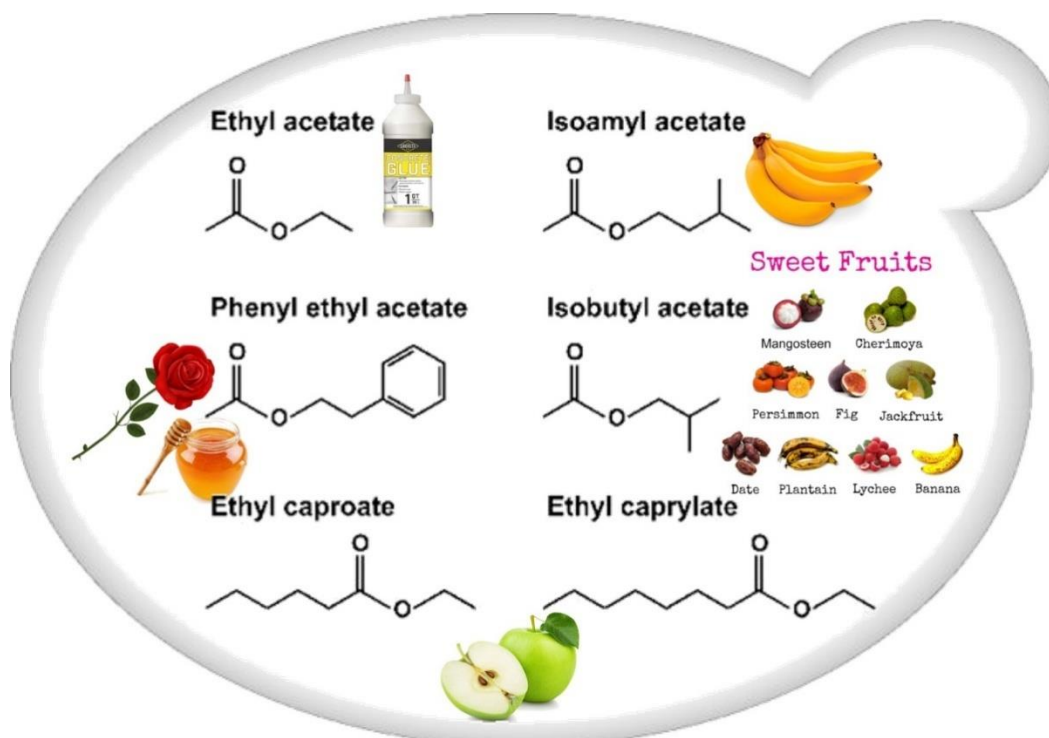
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Propionic_acid, https://en.wikipedia.org/wiki/Butyric_acid, <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/ca/Isoutyric-acid.svg/500px-Isoutyric-acid.svg.png>, https://en.wikipedia.org/wiki/Valeric_acid, https://www.wikiwand.com/sr/3-Metilbutanska_kiselina, https://www.wikiwand.com/sh/Heksanska_kiselina, https://en.wikipedia.org/wiki/Caprylic_acid, [wikiwandhttps://www.wikiwand.com/sr/Nonanska_kiselina](https://www.wikiwand.com/sr/Nonanska_kiselina), https://www.wikiwand.com/sh/Dekanska_kiselina

2.1.7. Esteri

Esteri su spojevi koji nastaju kondenzacijom hidroksilne skupine alkohola i karboksilne skupine organske kiseline. Ukupna koncentracija estera u vinu prilično je značajna i obično je viša od praga percepcije, što značajno utječe na konačnu aromu vina (Slika 2.7.). Detektirano je više od 150 različitih estera u vinu. Ipak, većina ovih estera prisutna je u tragovima i ne utječe značajno na cjelokupnu aromu vina (Ruiz i sur. 2019.). Većina etil estera i acetata prisutna je u sličnim ili višim koncentracijama u bijelim vinima u usporedbi s crnim vinima (Robinson i sur., 2014.a). Esteri u vinu nastaju metabolizmom kvasaca putem metabolizma lipida i acetil-CoA, iz preteča grožđa koje sintetiziraju kvasci (Swiegers i sur.2005.), te kemijskim modifikacijama tijekom starenja vina (Robinson i sur. 2014.a)

Acetatni ester i nastaju reakcijom alkoholne skupine etanola ili višeg alkohola i kiselinske skupine (acetata) (Ruiz i sur. 2019.). Nastanak acetatnog estera aktivnošću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kataliziraju alkohol aciltransferaze I i II (AATaza I i II) iz dva supstrata, alkohola i acetil-CoA (Robinson i sur. 2014.a). Najznačajniji predstavnici su etil acetat, izoamil acetat, izobutil acetat i 2-feniletal acetat (Swiegers i sur. 2005.).

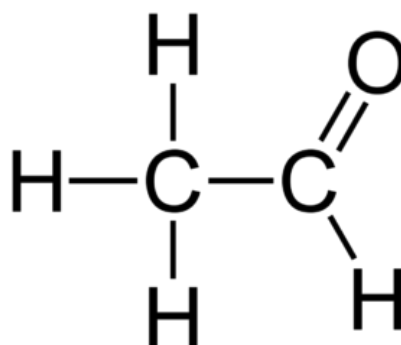
Reakcijom etanola i masnih kiselina nastaju etil ester i, a njihovo nastajanje djelovanjem *S.cerevisiae* kataliziraju najmanje dvije acil-CoA, etanol *O*-aciltransferaze (AEATaze), EEB1 i EHT1. Najznačajniji etil ester i su etil butirat, etil oktanoat, etil dekanat i etil heksanoat (Robinson i sur. 2014.a).



Slika 2.7. Predstavnicu estera u vinu
Izvor: <https://encyclopedia.pub/entry/286>

2.1.8. Karbonilni spojevi

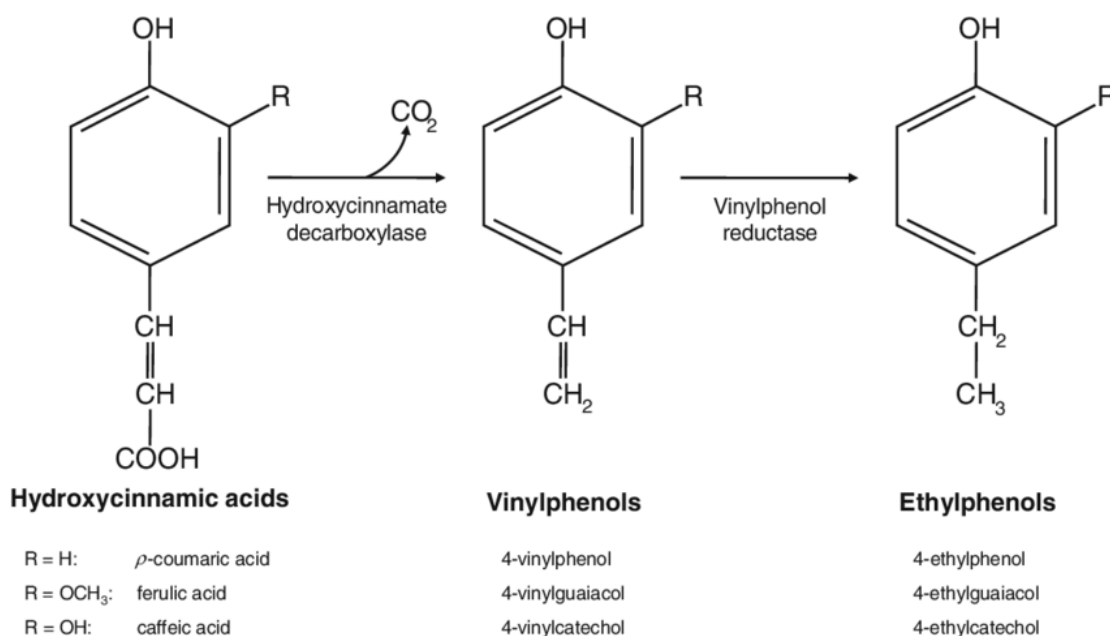
Karbonilni spojevi u vinu dijele se na aldehide i ketone. Acetaldehid (Slika 2.8.) je najvažniji karbonilni spoj koji se nalazi u vinu s koncentracijama u rasponu od 10 do 75 mg/L i osjetilnom pragom od 100 mg/L. Tijekom fermentacije, najbrže nakupljanje acetaldehida događa se kada je oslobađanje ugljika najveće, nakon čega se smanjuje do kraja fermentacije. Koncentracija acetaldehida može se povećati tijekom vremena uslijed oksidacije etanola, prozračivanjem i uporabom visokih koncentracija sumpornog dioksida. Acetaldehid u crnim vinima može pridonijeti kompleksnosti arome sve dok koncentracija ne prelazi 100 mg/L. Prisutnost acetaldehida u bijelim vinima pokazatelj je oksidacije vina (Swiegers i sur. 2005.). Uz acetaldehid, u vinu je prisutno nekoliko aldehida (etanal, propanal, oktanal i drugi) te nekoliko ketona (propanon, butanon, pentanon i drugi) (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.).



Slika 2.8. Kemijska struktura acetaldehida
Izvor: <https://www.toppr.com/guides/chemistry-formulas/acetaldehyde-formula/>

2.1.9. Hlapivi fenoli

Hlapivi fenoli nastaju iz preteča hidroksicimetne kiseline u moštu, kao što su *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, koje dekarboksiliraju u neoksidacijskom procesu djelovanjem kvasaca *S. Cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije (Slika 2.9.). Imaju relativno nizak prag detekcije zbog čega se lako otkrivaju. Mogu pozitivno pridonijeti aromi vina, no češće doprinose neugodnim mirisima kao što su farmaceutski, na štalu i drugi, što je rezultat visokih koncentracija etil fenola i vinil fenola (Swiegers i sur. 2005.). Istaknuti spojevi su 4-etilfenol i 4-etilgvajakol, te 4-vinilfenol i 4-vinilgvajakol. Bijela vina sadrže različite koncentracije vinil fenola, ali ne i etil fenola, dok crna vina sadrže niske koncentracije vinil fenola, a imaju različite koncentracije etil fenola (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.). Također, kvasci *Brettanomyces/Dekkera* spp. poznati su po svojoj sposobnosti tvorbe hlapivih fenola u vinu. Ovi kvasci povezani su s etil fenolima neugodnijeg mirisa i stoga se smatraju organizmima kvarenja (Swiegers i sur. 2005.).



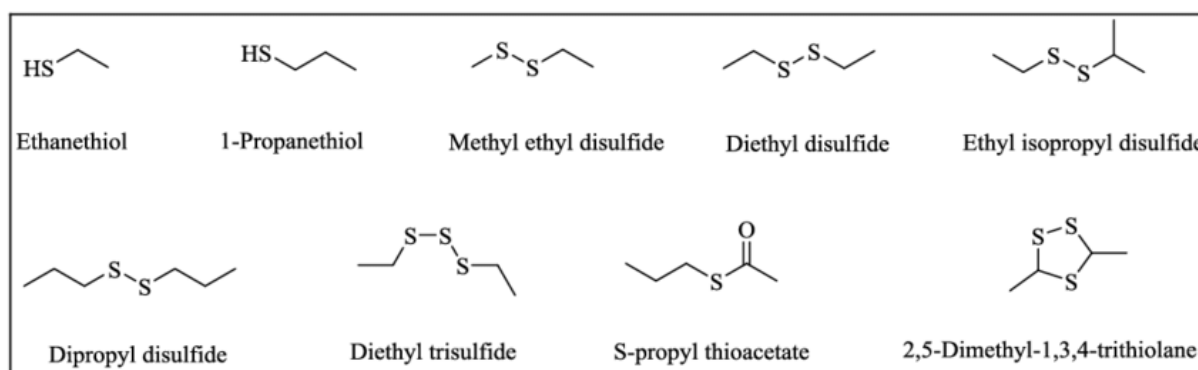
Slika 2.9. Nastajanje hlapivih fenola iz odgovarajućih preteča hidroksicimetne kiseline

Izvor: DuToit i sur. 2010.

2.1.10. Hlapivi spojevi sumpora

Hlapivi spojevi sumpora imaju snažan utjecaj na aromu vina zbog velikog broja različitih spojeva i njihovog niskog praga percepcije. Ovisno o hlapivosti, dijele se na lako hlapive sumporne spojeve čije je vrelište ispod 90°C i na teško hlapive sumporne spojeve kojima je vrelište iznad 90 °C. Lako hlapivi spojevi aeracijom se mogu ukloniti iz vina, a neki od njih su etantioi (EtSH), dimetil sulfid (DMS), dietil sulfid (DES), S-metil tioacetat (SMTA), dimetildisulfid (DMDS), etil tioacetat (ETA) i dietildisulfid (DEDS). Teško hlapivi spojevi teže se uklanjaju i uzrokuju veće probleme, zbog čega je potrebno prevenirati njihovo nastajanje u vinu. Primjeri teško hlapivih spojeva su 2-merkptoetanol (2ME), dihidro-2-metil(2H) tiofen-3-on (MTHTP), 2-(metiltio)etanol (2MTE), etil 3-(metiltio)propionat (E3MTP), 3-(metiltio)propil acetat (3MTPAc), 3-merkpto-1-propanol (3MP), 3-(metiltio)-1-propanol (ME), 3-(etiltio)propanol (ETP), 4-(metiltio) butanol (4MTB) i 3-(metiltio) propionska kiselina

(3MTPA) (Slika 2.10.) (Jimenez-Lorenzo i sur. 2021.). Većina spojeva ima negativan učinak na aromu vina, dajući miris na pokvarena jaja, kuhano zelje, češnjak, luk, spaljenu gumu i slično. Međutim, određeni spojevi, npr. DMS, daju vinu voćne mirise čime pozitivno utječu na aromu vina (Kinzurik i sur. 2015.). Različiti čimbenici, kao što su koncentracija dostupnog oblika dušika tijekom fermentacije, posebno koncentracija aminokiselina koje sadrže sumpor kao što su metionin i cistein, koncentracija pantotenske kiseline, soj kvasaca koji se koristi u fermentaciji, načini čuvanja vina tijekom dozrijevanja i mnogi drugi utječu na nastanak sumpornih spojeva (Jimenez-Lorenzo i sur. 2021.). Kvasci mogu metabolizirati sumporne spojeve na dva načina. U redukcijском putu asimilacije sulfata, kada se sulfat koristi za biosintezu organskih spojeva kao što su cistein i metionin. U redukcijском putu disimilacije sulfata, tijekom kojeg se molekula sulfata reducira kao dio respiratornog puta do sulfita ili sulfida koji se izlučuju (Swiegers i Pretorius 2007.).

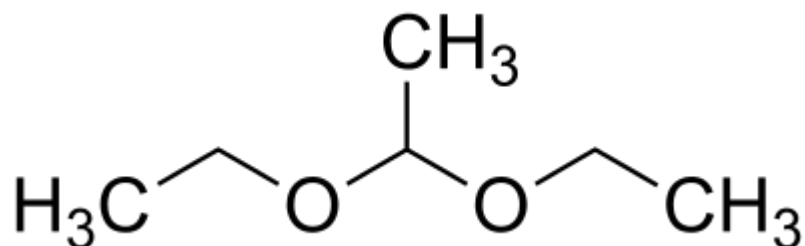


Slika 2.10. Kemijske strukture dijela sumpornih spojeva koji se nalaze u vinu

Izvor: Lu i sur. 2018.

2.1.11. Acetali

Acetali nastaju reakcijom molekule aldehida i dvije molekule alkohola uz oslobađanje vode, a proces se naziva acetalizacija. Oko dvadeset različitih acetala je nađeno u vinu te uglavnom daju vegetalne note vinu. Najznačajniji je dietoksietan (Slika 2.11.) koji nastaje reakcijom etanala i etanola te ima ugodan, voćni miris (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.).



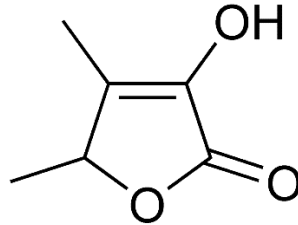
Slika 2.11. Kemijska struktura dietoksietana

Izvor: <https://www.wikiwand.com/sr/1,1-Dietoksietan>

2.1.12. Laktoni

Laktoni nastaju intramolekulskom esterifikacijom između kiselinske i alkoholne skupine iste molekule. Hlapivi laktoni koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije mogu doprinijeti aromi vina. Najzastupljeniji je γ -butirolakton koji nastaje laktonizacijom γ -hidroksimaslačne kiseline (nestabilna molekula nastala deaminacijom i dekarboksilacijom

glutaminske kiseline Ehrlichovim putem). Također, sotolon (2.12.) nastaje kondenzacijom α -keto maslačne kiseline i etanala te vinu daje aromu oraha. Osim toga, drvene bačve tijekom dozrijevanja vina otpuštaju laktone, kao što su *cis* i *trans*izomeri 3-metil- γ -oktalaktona (Ribéreau-Gayon i sur. 2006.).



Slika 2.12. Kemijska struktura sotolona
Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sotolon>

2.2. Metode određivanja hlapivih spojeva u vinu

Analitičke metode za određivanje hlapivih spojeva u vinu sastoje se od nekoliko faza: uzorkovanje, priprema uzorka, separacija, detekcija i analiza podataka. Uzorkovanje i priprema uzorka (ekstrakcija, predkoncentracija, frakcioniranje i izolacija) koraci su koji obično zahtijevaju najviše vremena tijekom analitičkog postupka. Odabir postupka pripreme uzorka utječe na pouzdanost i preciznost analize. Priprema uzorka prije detekcije je neophodna jer se analiti nalaze u složenim matricama koje kompliciraju njihovu detekciju, obično se nalaze u vrlo niskim koncentracija te je stabilnost spojeva niska (Marín-San Roman i sur. 2020.).

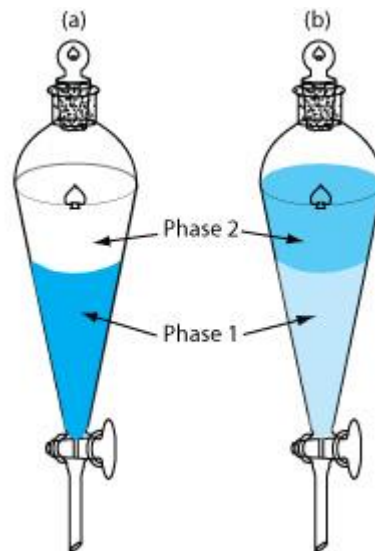
2.2.1. Metode ekstrakcije

Kako bi se analizirali hlapivi spojevi u vinu, moguće je izravno ubrizgati uzorak vina te pomoću odgovarajućih instrumenta izvršiti analizu. No, za identifikaciju hlapivih spojeva koji su prisutni u tragovima to nije moguće, već je potrebno prvo pripremiti uzorke. Priprema hlapivog ekstrakta vina analitički je postupak kojim se izoliraju hlapivi analiti iz uzoraka vina u prikladnom obliku za naknadnu analizu. Samo hlapivi ekstrakti koji predstavljaju profil mirisa izvornog vina mogu pružiti informacije za identifikaciju (Chen i Darriet 2021.). Metode ekstrakcije temelje se na različitim fizikalno-kemijskim svojstvima analita, kao što su njihova hlapivost, topljivost u različitim organskim fazama i njihova sposobnost apsorpiranja na određenom materijalu (Marín-San Roman i sur. 2020.). U nastavku su opisane najviše korištene metode pri analizi hlapivih spojeva u vinu.

Ekstrakcija tekuće – tekuće

Ekstrakcija tekuće – tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction*, LLE) jedna je od najstarijih i najkorištenijih metoda pripreme uzoraka za kvalitativnu i kvantitativnu analizu te je klasična metoda pri ekstrakciji hlapivih spojeva vina i alkoholnih pića (Slika 2.13.). Ova se tehnika temelji na razlici u topljivosti analita između vodenog uzorka i organskog otapala koje se ne miješa s vodom. Otapala s najvećim kapacitetom ekstrakcije koja se koriste su diklorometan, dietil eter, n-pentan, n-heksan ili mješavine bilo kojih od navedenih. Izbor otapala ovisi o spojevima koji se ekstrahiraju te o njihovoj ekološkoj prihvatljivosti (Marín-San Roman i sur. 2020.). Hlapivi spojevi imaju velik koeficijent raspodjele u organskoj fazi što zahtijeva

isparavanje otapala, u nekim slučajevima to dovodi do gubitka ili razgradnje nekih spojeva i nastanka drugih koji nisu bili izvorno sadržani u vinu (Ortega-Heras i sur. 2002.). Prednosti LLE metode su mogućnost ekstrakcije spojeva različite hlapivosti i polariteta te mali volumen korištenog uzorka. Nedostatci se velika količina upotrijebljenog otapala koja može uzrokovati gubitak analita i smetnje u kromatografskoj analizi, teška automatizacija, te dugo vrijeme pripreme (Marín-San Roman i sur. 2020.).



Slika 2.13. Princip ekstrakcije tekuće – tekuće

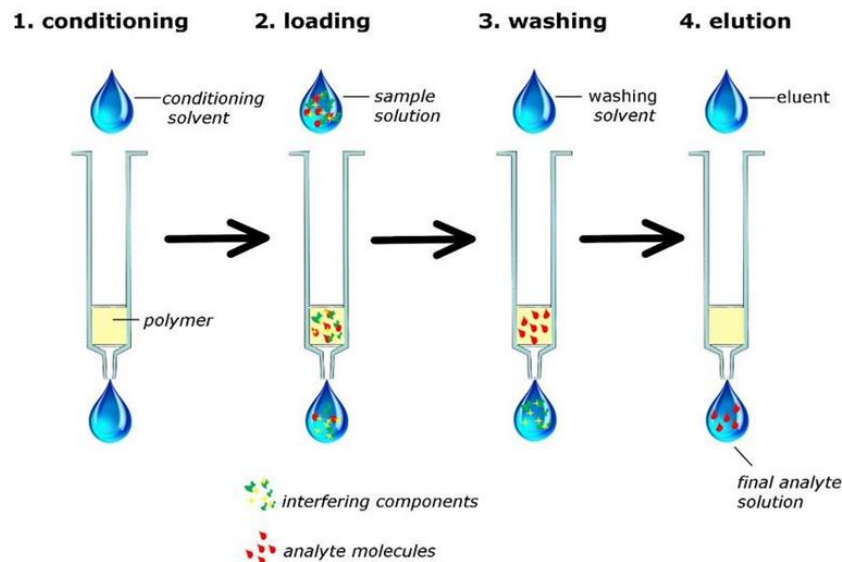
Izvor: Biotage <https://sampleprep.biotage.com/expandyourhorizon/sle-spe-and-lle-how-are-those-different>

Kako bi se smanjio volumen korištenog otapala tijekom LLE, razvijene su metode mikroekstrakcije tekuće – tekuće (engl. *Liquid – Liquid Microextraction*, LLME) kao što sumikroekstrakcija jednom kapi, ekstrakcija pomoću porozne membrane, te disperzivna mikroekstrakcija tekuće – tekuće. Metode su brze i osjetljive, ali može doći do interferencije tijekom analize, posebno u uzorcima crnog vina (Robinson i sur. 2014.b).

Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction*, SPE) metoda je koja se temelji na selektivnom zadržavanju analita u adsorbensu (nepokretna faza) i njegovom naknadnom eluiranju otapalom koje pokazuje veći afinitet za analite nego za sorbens. Selektivnost ekstrakcije i odvajanje analita od ostalih sastavnica uzorka ovisi o prirodi uzorka, otapalu i vrsti korištenog sorbensa. Uobičajeno korišteni SPE postupak sastoji se od nekoliko koraka (Slika 2.14.). Prije propuštanja uzorka, potrebno je kondicioniranje i uravnotežavanje kolonice. Kroz kolonicu se propusti otapalo (metanol, acetonitril, diklormetan), a nakon toga voda ili vodena otopina s niskim volumnim udjelom etanola (do 15 %) čime se povećava učinkovita površina kolonice. Zatim se propušta uzorak s ciljem da se analiti zadrže na nepokretnoj fazi. Kako bi se izbjegle interferencije, kolonica se ispiri vodom, nakon čega se analiti eluiraju pomoću otapala kao što je pentan, diklorometan, etil acetat ili drugi, koji imaju veći afinitet za analite od nepokretne faze. Kako bi se ekstrakcija optimizirala, potrebno je kontrolirati polaritet otapala, pH vodene faze, količinu interferirajućih iona, volumen otopina, protok i brzina eluiranja. Osim toga, vrlo je važan izbor sorbensa jer odgovarajući sorbens smanjuje vrijeme ekstrakcije, štedi korišteno otapalo i poboljšava učinkovitost adsorpcije, čime se dobivaju pouzdaniji rezultati. Materijal čvrste faze dijeli se

na anorganske (silicijev dioksid, aktivni ugljen, titanijev dioksid i druge) i organske materijale (polimeri). Prednosti SPE u odnosu na LLE su sljedeći: SPE smanjuje volumen organskih otapala, brža je, ima veću ponovljivost, ne proizvodi emulziju, te izbjegava probleme nepotpunog odvajanja faza. Neki od nedostataka SPE su dugotrajan proces ekstrakcije, nastavak korištenja organskih otapala i niska selektivnost (Marín-San Roman i sur. 2020.).



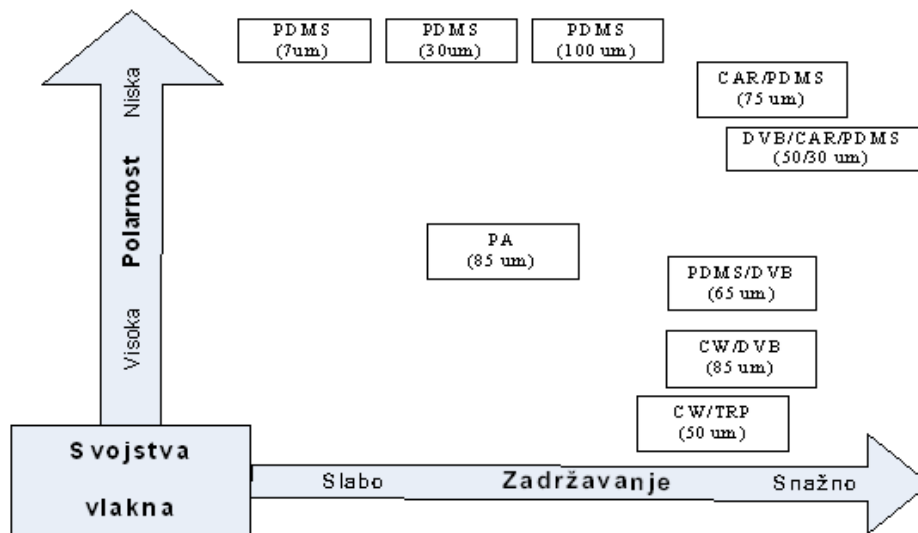
Slika 2.14. Koraci tijekom SPE metode

Izvor: Mavumengwana-Khanyile i sur. 2019.

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

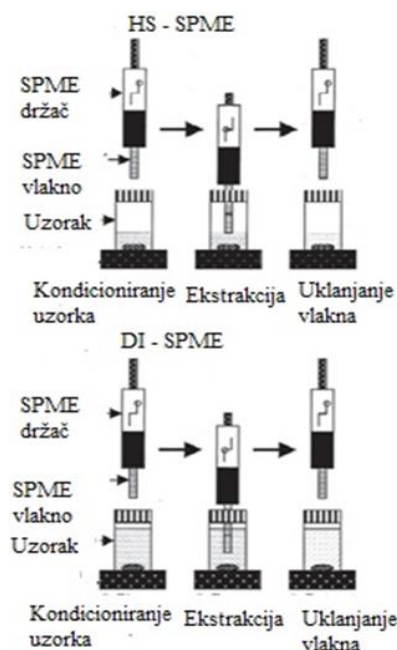
Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) je tehnika ekstrakcije kojom se na vlakna od taljenog silicijevog dioksida obloženog tankim filmom sorbensa (nepokretna faza) analit ekstrahira iz uzorka (Marín-San Roman i sur. 2020.). Vlakna SPME presvučena su raznim pojedinačnim ili miješanim polimerima koji se razlikuju s obzirom na polarnost, debljinu i dužinu. Također, sorbensi se razlikuju is obzirom na mehanizam ekstrakcije; vlakna načinjena od pojedinačnih sorbensa apsorbiraju analite (polidimetilsiloksan, PDMS; poliakrilat, PA; divinilbenzen, DVB; karboksen, CAR), dok vlakna načinjena iz smjesa različitih sorbensa adsorbiraju analite (polidimetilsiloksan/polidivinilbenzen, PDMS/DVB; polietilen glikol/polidivinilbenzen, CW/DVB; karboksen/polidivinilbenzen, CAR/DVB; karboksen/polidimetilsiloksan, CAR/PDMS; polidivinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan, DVB/CAR/PDMS) (Slika 2.15.) (Robinson i sur. 2014b).

U radu Tat i sur. (2005.) analizirana je osjetljivost i ponovljivost različitih vlakana. Dobiveni rezultati pokazali su kako je DVB/CAR/PDMS vlakno najprikladnije za potrebe određivanja hlapivih spojeva vina.



Slika 2.15. Svojstva komercijalno dostupnih SPME-vlakana

Postupak SPME odvija se u dva koraka: ekstrakciju analita i njihovu kasniju desorpciju. Uzorak se stavlja u bočicu zatvorenom čepom koji sadrži septu, kroz koji se igla s vlaknom uranja te vlakno apsorbira analite. Vlakno se može izložiti uzorku na dva različita načina: izravnim uranjanjem u tekući uzorak (engl. *Direct Immersion SPME*, DI-SPME) ili može biti izloženo parama iznad tekućeg ili krutog uzorka (engl. *Headspace SPME*, HS-SPME) (Slika 2.16.). Nakon nekog vremena, vlakno se uklanja iz bočice i uvodi u injektor kromatografskog sustava. Kako se spojevi desorbiraju, ulaze u kromatografsku kolonu za njihovo odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju. Uvjeti ekstrakcije koji se moraju optimizirati su nepokretna faza vlakana, temperatura i vrijeme ekstrakcije, dodavanje soli, pH, volumen i miješanje uzorka, prostorni volumen, veličina bočice i koncentracija analita u uzorku. Desorpcija također ima neke varijable koje se moraju optimizirati kao što su vrijeme i temperatura desorpcije, a koje ovise o hlapivosti i vrelištu analita te debljini pokretne faze (Marín-San Roman i sur. 2020.).

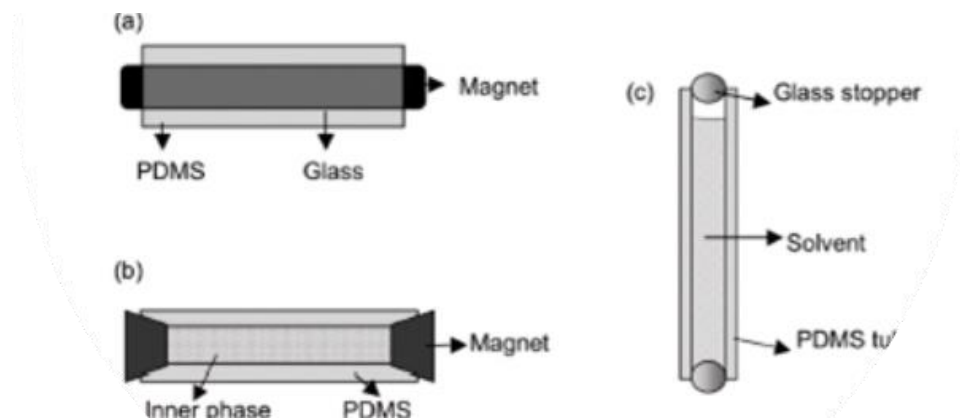


Slika 2.16. Ekstrakcijski procesi pomoću HS-SPME i DI-SPME tehnika
Izvor: Singh i sur. 2005.

Glavne prednosti SPME u odnosu na druge ekstrakcijske tehnike su jednostavnost i brzina, lako rukovanje i mala količina upotrijebljenog uzorka, ne zahtijevaju organska otapala ili visoke temperature ekstrakcije, jeftinija je, može poboljšati granice detekcije, kombinira ekstrakciju i koncentraciju i može se koristiti s krutim, tekućim i plinovitim uzorcima. Nedostatci su radna temperatura, lomljenje vlakana, skidanje filma sorbensa, trošak vlakana i mogućnost spojeva velike molekulske mase da se nepovratno vežu za sorbens nanosen na vlakno (Marín-San Roman i sur. 2020.).

Ekstrakcija pomoću sorbensa nanosenog na magnet za miješanje

Ekstrakcija pomoću sorbensa nanosenog na magnet za miješanje (engl. *Stir bar sorptive extraction*, SBSE) temelji se na uporabi magnetnog štapića koji je zatvoren u stakleni plašt obložen apsorbirajućim materijalom (komercijalni naziv magnetnog štapića je *Twister*) (Slika 2.17.). Analiti se ekstrahiraju uvođenjem *Twistera* u bočicu na određeno vrijeme te se termički desorbiraju. Ova tehnika se temelji na istom principu kao i SPME, ali je u ovom slučaju vlakno zamijenjeno magnetičem na koji je nanosen film sorbensa. Polimerni materijal koji se najviše koristi za ovu tehniku je polidimetilsiloksan (PDMS) koji je zbog svojih karakteristika najprikladniji. Sorbens PDMS ima inertan karakter, lako ga je sintetizirati, ima veliku učinkovitost ekstrakcije, a produkti njegove razgradnje lako se identificiraju spektrometrijom masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) (Marín-San Roman i sur. 2020.). Količina nanosenog sorbensa PDMS-a ovisi o dužini magnetića te može biti u rasponu od 10 mm (50 μ L PDMS-a) pa do 40 mm (219 μ L PDMS-a) (Castro i sur. 2008.). Osim PDMS-a, koristi se i etilen glikol (EG), ali nije stabilan kao PDMS zbog čega mu je smanjen rok trajanja te se ne može koristiti pri ekstrakciji izravnim uranjanjem (Marín-San Roman i sur. 2020.).



Slika 2.17. Izgled magnetnog štapića

Postupak ekstrakcije započinje ili izravnim uranjanjem *Twistera* u uzorak (u tom se slučaju *Twister* koristi i za miješanje uzorka) ili postavljanjem *Twistera* u plinovitu fazu uzorka (za miješanje se koristi običan magnetić za miješanje). Nakon što su analiti ekstrahirani, *Twister* se uklanja iz uzorka i ispiru destiliranom vodom. Zatim slijedi desorpcija, tijekom koje se apsorbirani analiti termički desorbiraju i podvrgavaju procesu kriokoncentracije kako bi se spojevi zadržali i ukoncentrirali (Marín-San Roman i sur. 2020.). Prilikom kriokoncentracije, uobičajeno se koristi tekući dušik (Castro i sur. 2008.).

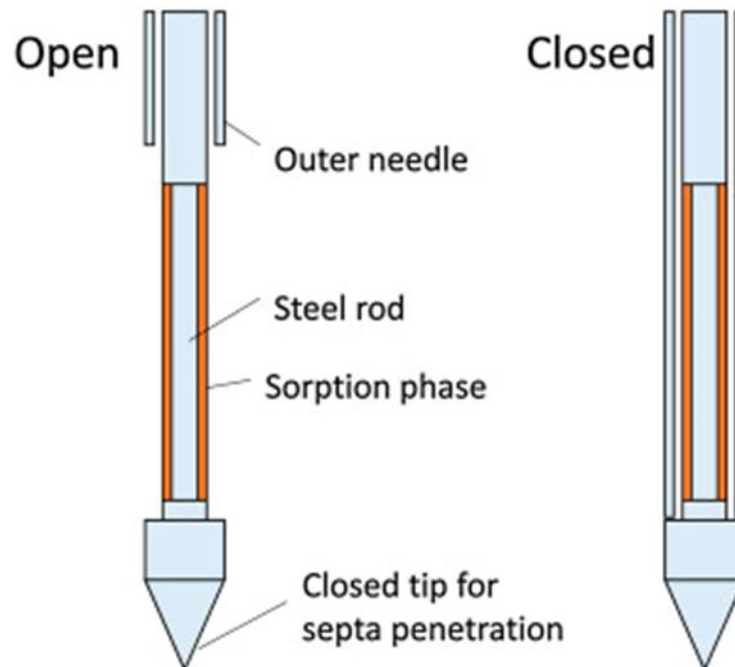
Za ekstrakciju je potrebno optimizirati kinetičke parametre (vrijeme ekstrakcije, brzinu miješanja, razrjeđivanje uzorka i volumen uzorka) i termodinamičke parametre (temperaturu, pH, dodatak inertnih soli i dodatak organskih modifikatora). Korak desorpcije

zahtijeva optimizaciju temperature kriokoncentracije, ventilacijski tlak i temperaturu, vrijeme i protok desorpcije (Marín-San Roman i sur. 2020.).

Tehnika SBSE ima iste prednosti kao i SPME u smislu upotrebe otapala, brzine, lakoće, lakog rukovanja i drugog te je osjetljivost SBSE u odnosu na SPME veća 50 do 250 puta. Nedostatak ove tehnike je mali broj dostupnih sorbensa čime je kapacitet ekstrakcije ograničen, s obzirom na to da PDMS učinkovito apsorbira samo apolarne tvari (Marín-San Roman i sur. 2020.).

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi u izvedbi klina

Nedavno je razvijena nova tehnika ekstrakcije mikroekstrakcija na čvrstoj fazi u izvedbi klina (SPME-Arrow). Navedena tehnika kombinira prednosti tehnika SPME i SBSE (Song i sur. 2019.). Kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije, odnosno identifikacija i kvantifikacija hlapivih spojeva, SPME-Arrow ima do 24 puta deblju ekstrakcijsku fazu od SPME vlakna (Zhang 2019.). Osim toga, vrh je u obliku klina (Slika 2.18.) koji povećava mehaničku robusnost i smanjuje njegovu lomljivost jer je potrebna smanjena sila za prodiranje u bočicu kroz septu čepa (Herrington i sur. 2020.). Ova ekstrakcijska tehnika primijenjena je na uzorcima otpadnih voda i atmosferilija (Helin i sur. 2015.), lososu i gljivama (Lan i sur. 2017.), uzorcima ribe (Castro i sur. 2019., Song i sur. 2019., Xu i sur. 2021.), soja umaku (Lee i sur. 2019.), octu (Nam i sur. 2019.), mlijeku (Manousi i sur.2020.), destilatima (Cha i sur. 2020., Zhang i sur. 2020.), uljima (Xu i sur. 2021.), te kožici grožđa (Šikuten i sur. 2021.). Također, u radu Lisanti i sur. (2021.) optimizirana je metoda određivanja terpenoida u vinu, spojeva koji pridonose aromi mente crnog vina. Osim optimizacije, prvi put su kvantificirani mentil-acetat i neomentil-acetat u vinu.

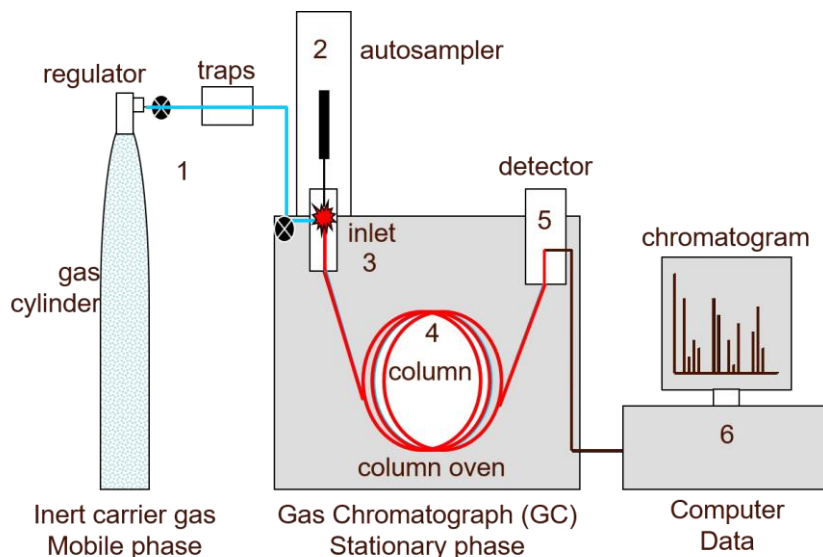


Slika 2.18. Izgled SPME-Arrow

Izvor: Helin i sur. 2015.

2.2.2. Plinska kromatografija

Plinsku kromatografiju (Slika 2.19.) (engl. *Gas chromatography*, GC) izumili su A. T. James i A. J. P. Martin 1952. godine te je postala jedna od najvažnijih i najprimjenjivijih analitičkih tehnika za određivanje hlapivih spojeva (Bartle i Myers 2002.). Osnovno načelo plinske kromatografije je da što je veći afinitet određenog spoja prema nepokretnoj fazi, veća je koncentracija tog spoja i na dulje vrijeme će biti zadržan u koloni prije nego što spoj bude eluiran i detektiran (Al-Bukhaiti i sur 2017.). Stoga je osnovni dio plinskog kromatografa kolona u kojoj se odvija odvajanje sastavnica, odnosno učinkovitost odvajanja koju postiže cijeli sustav ovisi o koloni. Kolona ranijih GC sustava bila je dužine 1 do 5 m i 1 do 5 mm unutarnjeg promjera, ispunjenim česticama koje su bile obložene tekućom ili elastomernom nepokretnom fazom. Razlučivost takvih kolona bila je ograničena. Danas se koriste kapilarne kolone kojima je na unutarnjoj stijenci nanesen tanki film selektivne tekućine te je time učinkovitost odvajanja povećana. Različiti materijali korišteni su za izradu kolona, na primjer bakar, nikal, nehrđajući čelik i staklo, no od 1979. godine koristi se taljeni silicijev dioksid ili izvučeni kvarc (engl. *Fused silica*) koji je fleksibilan, izdrživ i kemijski inertan (Bartle i Myers 2002.). Osnova odvajanja je usporavanje pojedinačnih sastavnica dok se pomiču kroz kolonu pomoću plina nosioca (pokretna faza), obično helija, dušika ili vodika. Dok se kreće kroz kolonu s plinom nosiocem, molekule svake tvari prisutne u uzorku razdijelit će se između plina i tekućine. Što je tvar hlapivija, to će se veći dio vremena njezine molekule kretati u plinu nosiocu i prije izaći iz kolone. Na taj će se način svaka tvar odvojiti unutar kolone i na kraju izlazi odvojena u određenom vremenu (Al-Bukhaiti i sur 2017.). Vrijeme zadržavanja (Rt) je vrijeme koje je potrebno da određeni spoj nakon injektiranja u kolonu dođe do detektora te je karakteristično za svaku tvar. Ovisi o hlapivosti tvari, temperaturi kolone, njegovoj duljini i promjeru, ali i o vrsti nepokretne faze.



Slika 2.19. Pojednostavljeni dijagram plinskog kromatografa

Izvor: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxc-335168>

Nakon odvajanja sastavnica u koloni, potreban je detektor za njihovo detektiranje i mjerenje. Dostupni su brojni detektori kao što su plameno ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID) koji detektira molekule koje sadrže ugljik (tj., -CH-), detektor selektivan za dušikove i fosforne spojeve (engl. *Nitrogen Phosphorous Detector*, NPD),

kemiluminiscencijski detektor (engl. *Sulfur Chemiluminescence Detector*, SCD) i plamenofotometrijski detektor (engl. *Flame Photometric Detector*, FPD) koji specifično detektiraju spojeve koji sadrže sumpor te spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS) koji detektira ionizirane molekule na temelju omjera njihove mase i naboja (Robinson i sur. 2014.b). Spektrometar masa ima značajne prednosti za identifikaciju spojeva u odnosu na druge detektore zbog dostupnosti opsežnih baza podataka, zbog čega se najčešće koristi pri analizi spojeva vina. Također, ovaj je detektor univerzalan te je vrlo osjetljiv, pa je moguće provesti identifikaciju i detekciju spojeva sadržanih u vrlo niskim koncentracijama.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci vina

U svrhu istraživanja korišteno je 29 bijelih vina različitih sorata: Chardonnay (3), Graševina (5), Kraljevina (2), Malvazija istarska (2), Muškat bijeli (2), Muškat Momjanski (2), Rajnski Rizling (2), Sauvignon bijeli (6) i Traminac (5). Tablica 3.1. osim sorte prikazuje i godinu proizvodnje vina te vinogradarsku podregiju. Za potrebe istraživanja, uzet je jednak volumen svakog uzorka vina, pomiješani su te je za optimizaciju korištena smjesa navedenih vina.

Tablica 3.1. Korišteni uzorci vina

| Sorta | Godina proizvodnje | Podregija |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| Chardonnay | 2020 | Prigorje - Bilogora |
| Chardonnay | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Chardonnay (Sur lie) | 2020 | Prigorje - Bilogora |
| Graševina | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Graševina | 2020 | Slavonija |
| Graševina | 2020 | Podunavlje |
| Graševina | 2019 | Podunavlje |
| Graševina | 2018 | Podunavlje |
| Kraljevina | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Kraljevina | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Malvazija (drvo) | 2019 | Hrvatska Istra |
| Malvazija | 2020 | Hrvatska Istra |
| Muškat bijeli | 2020 | Hrvatska Istra |
| Muškat bijeli | 2019 | Hrvatska Istra |
| Muškat Momjanski | 2020 | Hrvatska Istra |
| Muškat Momjanski | 2019 | Hrvatska Istra |
| Rajnski Rizling | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Rajnski Rizling | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Sauvignon bijeli | 2020 | Slavonija |
| Sauvignon bijeli | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Sauvignon bijeli | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Sauvignon bijeli | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Sauvignon bijeli | 2019 | Prigorje – Bilogora |
| Sauvignon bijeli | 2019 | Slavonija |
| Traminac | 2020 | Prigorje – Bilogora |
| Traminac | 2020 | Slavonija |
| Traminac | 2020 | Podunavlje |
| Traminac | 2019 | Podunavlje |
| Traminac | 2018 | Podunavlje |

3.2. SPME-Arrow i GC-MS analiza

Pomoću RSH TriPlus autosamplera (Thermo Fisher Scientific Inc., Brookfield, SAD) (Slika 3.1.) provedena je SPME-Arrow ekstrakcija. Odgovarajući volumen uzorka stavljen je u

bočice od 20 mL, zatvorene su poklopcima koji sadrže PTFE/silikonski septum. Analiza uzorka provedena je na plinskom kromatografu TRACE™ 1300 spojenom na ISQ 7000 TriPlus kvadrupolni spektrometar masa (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) koji je opremljen kapilarnom kolonom TG-WAXMS A (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm debljine filma, Thermo Fisher Scientific, USA). Hlapivi spojevi koji su injektirani isporučeni su u kolonu u načinu rada bez razdvajanja uzoraka (engl. *Splitless mode*), a helij je korišten kao plin nosilac pri konstantnoj brzini protoka od 1 mL/min. Program temperature bio je sljedeći: početna temperatura od 40 °C održavana je 5 minuta te se povećavala za 2 °C/min dok nije dostignuto 210 °C u trajanju od 10 minuta. Spektrometri masa snimljeni su primjenom ionizacije brzim elektronima (engl. *Electron Impact*, EI) pri energiji ionizacije od 70 eV. Spektrometar masa izveden je u načinu punog skeniranja u rasponu od 30 do 300 m/z (engl. *Mass number/charge number*). Dobiveni podatci obrađeni su pomoću računalnog programa Chromeleon™ Data System (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Identifikacija hlapivih spojeva izvršena je usporedbom snimljenog spektra masa s podacima dostupnim u Wiley Registry 12th Edition/NIST SpectralLibrary. Retencijski indeksi (engl. *Retention indeks*, RI) za svaki detektirani spoj izračunati su upotrebom alkanskih standarda C8-C20 (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) prema jednadžbi opisanoj u radu Song i sur. (2019.) te su uspoređeni s indeksima ranije objavljenim u radovima Babushok i Zenkevich (2009.) te Babushok i sur. (2011.).



Slika 3.1. RSH TriPlus autosampler

3.3. Optimizacija SPME-Arrow metode za određivanje hlapivih spojeva u vinu

3.3.1. Identifikacija spojeva prisutnih u uzorku vina

Kako bi se identificirali hlapivi spojevi prisutni u uzorcima vina, u 5 mL vina dodano je 1,5 g NaCl. Uvjeti sorpcije bili su sljedeći: odgovarajući volumen uzorka inkubiran je na 60 °C tijekom 20 min, nakon čega je DVB/CWR/PDMS (120 µm x 20 mm) SPME-Arrow izložen 60 min. Desorpcija je provedena pri 250 °C tijekom 7 minuta. Nakon desorpcije SPME-Arrow je

kondicioniran 10 min pri 250 °C. Uvjeti sorpcije SPME-*Arrow* odabrani su na temelju istraživanja Kim i sur. (2020.). Svi pokusi provedeni su u tri ponavljanja.

3.3.2. Određivanje volumena uzorka

Za određivanje prikladnog volumena uzorka korišteni su volumeni od 3, 4 i 5 mL. Uvjeti sorpcije bili su isti kao što je prethodno opisano. Svi pokusi provedeni su u tri ponavljanja.

3.3.3. Određivanje mase soli

Za određivanje mase soli u 5 mL uzorka vina dodano je 0, 1 i 2 g NaCl. Uvjeti sorpcije bili su isti kao što je prethodno opisano. Svi pokusi provedeni su u tri ponavljanja.

3.3.4. Eksperimentalni dizajn i statistička analiza

Za optimizaciju uvjeta ekstrakcije SPME-*Arrow* primijenjen je Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn (BBD) (Tablica 3.2.) i metodologija površina odziva. Volumen uzorka, masa NaCl i SPME-*Arrow* sorbens bili su konstantni: 5 mL uzorka vina, 2 g NaCl odnosno DVB/CAR/PDMS. Desorpcija je provedena pri 250 °C u trajanju od 7 min, dok je kondicioniranje provedeno pri 250 °C tijekom 10 min. Odabrane varijable za SPME-*Arrow* optimizaciju bile su temperatura ekstrakcije, vrijeme inkubacije i vrijeme izlaganja. Primjenom BBD generirano je ukupno 15 pokusa koji su izvedeni slučajnim redoslijedom. Za utvrđivanje optimalnih uvjeta pojedinih skupina hlapivih spojeva provedena je analiza varijance (engl. *Analysis of variance*, ANOVA), regresije i crtanje grafa površina odziva. Za optimizaciju je korištena višekriterijska metodologija (Derringerova funkcija ili funkcija poželjnosti). Analiza eksperimentalnog dizajna i izračun predviđenih podataka provedena je pomoću Design Expert softwera (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD).

Tablica 3.2. Nezavisne varijable i njihove razine korištene za BDD za optimizaciju ekstrakcije SPME-*Arrow* pri određivanju hlapivih spojeva u vinu

| Varijable | Razina varijabli | | |
|---------------------------------|-------------------------|----|----|
| Kodirane razine | -1 | 0 | 1 |
| A: Temperatura ekstrakcije (°C) | 40 | 50 | 60 |
| B: Vrijeme inkubacije (min) | 10 | 20 | 30 |
| C: Vrijeme izlaganja (min) | 30 | 45 | 60 |

4. Rezultati

4.1. Odabir uzorka vina i identifikacija pojedinih spojeva u uzorku

Na sastav i sadržaj različitih sastavnica u vinu utječu brojni čimbenici kao što su sorta, okolišni i meteorološki uvjeti, način vinifikacije i drugi. S obzirom na to da je SPME-Arrow ravnotežna tehnika koja se temelji na adsorpciji spojeva prisutnih u pari iznad tekućine, potrebno je prevesti analite iz uzorka u paru. Hlapivost pojedinih spojeva ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su tlak pare i vrelište, ali i o prisutnosti drugih spojeva u uzorku kao što su etanol, polisaharidi, proteini, polifenoli, glukoza, glicerol i drugi (Pozo-Bayon i Reineccius 2009., Robinson i sur. 2009., Rodriguez-Bencamo i sur. 2011., Bortnowska 2010.). Temeljem navedenog u ovom istraživanju, uzorak vina koji je korišten za potrebe optimizacije bio je smjesa različitih vina koja su karakteristična za pojedine podregije Republike Hrvatske (Tablica 3.1.). Ukupno su identificirana 103 hlapiva spoja, a pripadaju sljedećim skupinama: alkoholi (23 spoja), C13 norisoprenoidi (9 spojeva), esteri (28 spojeva), kiseline (12 spojeva), terpeni (29 spojeva) i ostali spojevi (2 spoja) (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Spojevi identificirani u uzorku vina

| Skupina spojeva | Spoj | RI (literatura) | RI (određeno) | Log Kow | Topljivost u vodi pri 25 °C (mg/L) | Tlak pare pri 25 °C (Pa) | Vrelište (°C) |
|-----------------|-------------------------------------|-----------------|---------------|---------|------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Kiselina | 2-etilheksanska kiselina | 1950 | 1946 | 4,65 | 4,7 | 12,9 | 226 |
| Kiselina | Izomaslačna kiselina | 1549 | 1541 | 1 | 49180 | 436 | 154 |
| Kiselina | Izovalerijanska kiselina | 1667 | 1672 | 1,49 | 29240 | 152 | 175 |
| Kiselina | Benzojeva kiselina | 2380 | 2383 | 1,87 | 2493 | 0,397 | 250 |
| Kiselina | Butanska kiselina | 1624 | 1632 | 0,79 | 66060 | 281 | 167 |
| Kiselina | Dekanska kiselina | 2274 | 2286 | 4,09 | 47,89 | 1,17 | 279 |
| Kiselina | Dodekanska kiselina | 2487 | 2493 | 5 | 12,76 | 0,188 | 309 |
| Kiselina | Heksanska kiselina | 1843 | 1849 | 1,92 | 5898 | 37,1 | 208 |
| Kiselina | Nonanska kiselina | 2159 | 2169 | 3,42 | 207,8 | 2,85 | 262 |
| Kiselina | Oktanska kiselina | 2057 | 2050 | 3,03 | 495,9 | 6,51 | 245 |
| Kiselina | <i>trans</i> -2-Undekanska kiselina | 2351 | 2358 | 4,29 | 28,17 | 0,086 | 299 |
| Kiselina | Undekanska kiselina | 2391 | 2388 | 4,51 | 21,39 | 0,694 | 294 |
| Alkohol | 1-Butanol | 1140 | 1135 | 0,88 | 61389 | 1040 | 114 |
| Alkohol | 1-Dekanol | 1575 | 1568 | 4,57 | 28,21 | 1,45 | 293 |
| Alkohol | 2-Heksadekanol | 2312 | 2305 | 6,66 | 0,173 | 0,005 | 319 |
| Alkohol | 1-Heksanol | 1351 | 1359 | 2,03 | 6885 | 117 | 159 |
| Alkohol | 1-Nonanol | 1385 | 1388 | 1,61 | 15840 | 249 | 144 |
| Alkohol | 1-Oktanol | 1392 | 1399 | 2,73 | 1379 | 13,3 | 182 |
| Alkohol | 1-Pentanol | 1410 | 1413 | 1,61 | 16000 | 121 | 166 |
| Alkohol | 1-Propanol | 1020 | 1025 | 0,35 | 3090 | 23,2 | 90 |
| Alkohol | (R,R)2,3-Butandiol | 1550 | 1548 | -0,92 | 759300 | 22,9 | 157 |
| Alkohol | (R,S)2,3-Butandiol | 1585 | 1581 | -0,92 | 759300 | 22,9 | 157 |

Tablica 4.1. Spojevi identificirani u uzorku vina-nastavak

| Skupina spojeva | Spoj | RI (literatura) | RI (određeno) | Log Kow | Topljivost u vodi pri 25 °C (mg/L) | Tlak pare pri 25 °C (Pa) | Vrelište (°C) |
|-------------------|--|-----------------|---------------|---------|------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Alkohol | 2-Etil-1-heksanol | 1990 | 1994 | 3,6 | 188,9 | 8,61 | 193 |
| Alkohol | 4-Etilfenol | 1904 | 1987 | 2,55 | 2912 | 19,7 | 211 |
| Alkohol | 4-Vinil gvajakol | 1725 | 1720 | 2,87 | 964 | 1,4 | 232 |
| Alkohol | 3-Etoksi-1-propanol | 1377 | 1380 | 0,08 | 316900 | 3,74 | 160 |
| Alkohol | <i>E</i> -3-Heksen-1-ol | 1682 | 1690 | 3,08 | 619,3 | 2,01 | 226 |
| Alkohol | <i>Z</i> -3-Heksen-1-ol | 1713 | 1725 | 3,08 | 619,3 | 2,01 | 226 |
| Alkohol | Izoamilni alkohol | 1206 | 1211 | 1,26 | 41580 | 512 | 123 |
| Alkohol | 3-Metil-3-pentanol | 1080 | 1074 | 1,71 | 12860 | 820 | 119 |
| Alkohol | 4-Etil gvajakol | 2030 | 2035 | 2,38 | 694 | 3,31 | 248 |
| Alkohol | Izoheksanol | 1311 | 1316 | 1,75 | 11950 | 162 | 146 |
| Alkohol | Benzil alkohol | 1860 | 1851 | 1,32 | 7226 | 15,1 | 211 |
| Alkohol | Izobutanol | 1093 | 1097 | 0,77 | 97120 | 1780 | 100 |
| Alkohol | Feniletilen alkohol | 2199 | 2203 | 2,24 | 926 | 1,03 | 247 |
| C13 norisoprenoid | 1,2,3,4-Tetrahidro-2,5,8-trimetil-1-naftol | | | | | | |
| C13 norisoprenoid | 1,2-Dihidro-3,5,8-trimetilnaftalen | 1999 | 1208 | | | | |
| C13 norisoprenoid | 2,3-Dehidro-4-okso- β -ionol | 2800 | 1791 | | | | |
| C13 norisoprenoid | 4-Hidroksi- β -ionon | | | 2,89 | 440,8 | 0,01 | 311 |
| C13 norisoprenoid | β -damaskenon | 1821 | 1834 | 4,21 | 12,48 | 1,49 | 265 |
| C13 norisoprenoid | TDN | 1714 | 1719 | 5,16 | 2,35 | 3,19 | 245 |
| C13 norisoprenoid | TPB | 1832 | 1841 | 5,3 | 1,77 | 3,13 | 252 |
| C13 norisoprenoid | Vitispiran A | 1507 | 1505 | 4,65 | 5,08 | 9,25 | 234 |
| C13 norisoprenoid | Vitispiran B | 1510 | 1509 | 4,65 | 5,08 | 9,25 | 234 |
| Ester | 2-Feniletil acetat | 1813 | 1820 | 2,57 | 711 | 9,1 | 234 |
| Ester | <i>E</i> -3-Heksen-1-il-acetat | 1309 | 1300 | 2,61 | 481 | 152 | 177 |
| Ester | <i>Z</i> -3-Heksen-1-il-acetat | 1327 | 1333 | 2,61 | 481 | 152 | 177 |
| Ester | Izoamil-acetat | 1126 | 1136 | 2,26 | 1100 | 756 | 135 |
| Ester | Izoamil-dekanoat | 1851 | 1865 | 6,19 | 0,134 | 0,508 | 287 |
| Ester | Dietil-malat | 1235 | 1240 | -1,13 | 100000 | 7,99 | 203 |
| Ester | Dietil-sukcinat | 1699 | 1709 | 1,39 | 5547 | 19,7 | 187 |
| Ester | Etil-2-hidroksi-4-metilpentanoat | 1515 | 1529 | 1,22 | 20190 | 3,97 | 215 |
| Ester | Etil-laktat | 1347 | 1356 | -0,18 | 472800 | 144 | 166 |
| Ester | Etil-3-hidroksiheksanoat | 1661 | 1656 | 1,29 | 17480 | 196 | 226 |
| Ester | Etil-3-hidroksitridekanoat | 2433 | 2426 | 4,73 | 6,3 | 0,01 | 335 |

Tablica 4.1. Spojevi identificirani u uzorku vina-nastavak

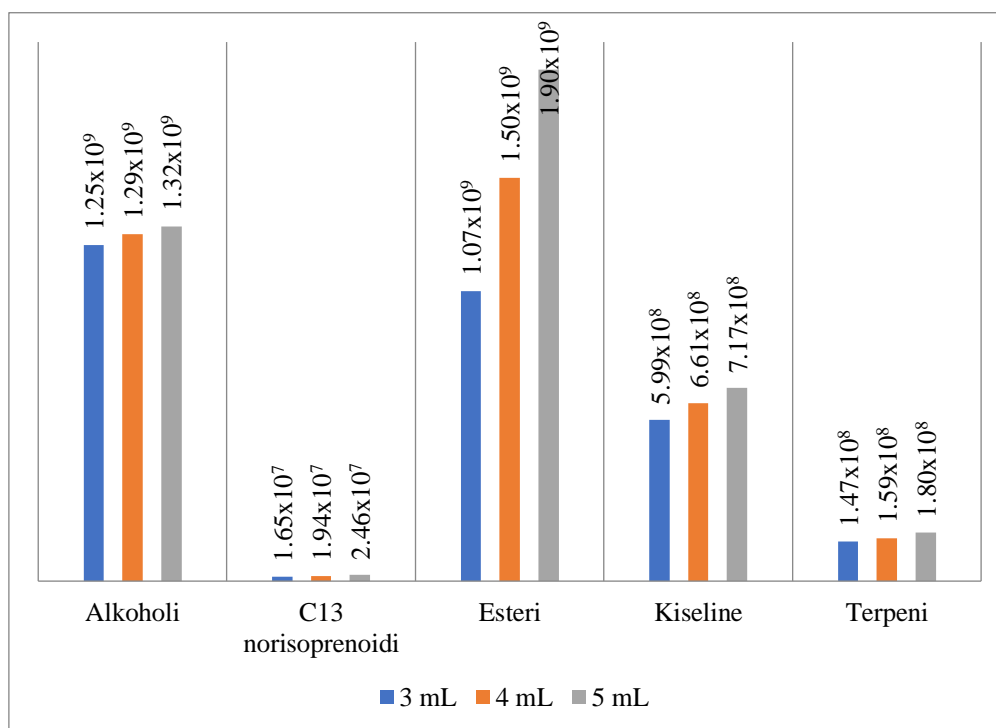
| Skupina spojeva | Spoj | RI (literatura) | RI (određeno) | Log Kow | Topljivost u vodi pri 25 °C (mg/L) | Tlak pare pri 25 °C (Pa) | Vrelište (°C) |
|-----------------|--------------------------------------|-----------------|---------------|---------|------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Ester | Etil-9-dekenoat | 1703 | 1710 | 4,66 | 4,71 | 4,4 | 246 |
| Ester | Etil-9-heksadekenoat | 2269 | 2261 | 7,52 | 0,01 | 0,011 | 341 |
| Ester | Etil-dekanoat | 1606 | 1625 | 4,79 | 3,52 | 5,7 | 248 |
| Ester | Etil-dodekanoat | 1811 | 1824 | 5,78 | 0,41 | 1,17 | 281 |
| Ester | Etil-heptanoat | 1352 | 1341 | 3,32 | 102 | 91,5 | 191 |
| Ester | Etil-heksanoat | 1239 | 1246 | 2,83 | 309 | 240 | 170 |
| Ester | Etil-hidrogensukcinat | 2367 | 2375 | 0,61 | 59050 | 3,72 | 250 |
| Ester | Etil-nonanoat | 1530 | 1555 | 4,3 | 10,87 | 0,09 | 230 |
| Ester | Etil-oktanoat | 1435 | 1430 | 3,81 | 33,39 | 31,4 | 211 |
| Ester | Etil-oleat | 2461 | 2469 | 8,51 | 0,01 | 0,01 | 364 |
| Ester | Etil-palmitat | 2246 | 2240 | 7,74 | 0,01 | 0,04 | 337 |
| Ester | Etil-pentadekanoat | 2179 | 2185 | 7,25 | 0,01 | 0,03 | 324 |
| Ester | Etil-fenilacetat | 1793 | 1799 | 2,57 | 739 | 0,09 | 234 |
| Ester | Etil-cinamat | 2103 | 2123 | 2,85 | 161 | 1,17 | 257 |
| Ester | Heksil-acetat | 1279 | 1291 | 2,83 | 309 | 194 | 170 |
| Ester | Metil-oktanoat | 1399 | 1409 | 3,32 | 102 | 68 | 191 |
| Ester | Metil-salicilat | 1755 | 1746 | 2,6 | 1875 | 7,12 | 252 |
| Ostali | Metionol | 1720 | 1710 | 0,44 | 47450 | 37,3 | 178 |
| Ostali | Acetoin | 1282 | 1274 | -0,36 | 833300 | 266 | 138 |
| Terpen | Citronelil-acetat | 1657 | 1666 | 4,56 | 5,69 | 7,01 | 238 |
| Terpen | 4-Carene | 1134 | 1130 | 4,48 | 3,76 | 292 | 153 |
| Terpen | <i>alo</i> -Ocimen | 1367 | 1370 | 4,72 | 2,35 | 122 | 173 |
| Terpen | α -Ocimen | 1232 | 1235 | 4,88 | 6,92 | 320 | 156 |
| Terpen | α -Pinen | 1110 | 1104 | 4,16 | 7,06 | 334 | 151 |
| Terpen | α -Terpinen | 1179 | 1185 | 4,75 | 5,92 | 222 | 169 |
| Terpen | α -Terpineol | 1694 | 1710 | 3,28 | 372 | 2,62 | 214 |
| Terpen | α -Terpinolen | 1280 | 1568 | 4,88 | 3,84 | 133 | 178 |
| Terpen | β -Mircen | 1161 | 1169 | 4,88 | 6,92 | 320 | 156 |
| Terpen | β -Ocimen | 1235 | 1240 | 4,8 | 2,01 | 358 | 165 |
| Terpen | β -pinen | 1110 | 1104 | 4,35 | 7,06 | 334 | 151 |
| Terpen | <i>E</i> - α -Bisabolen | 1775 | 1783 | 7,05 | 0,01 | 0,02 | 270 |
| Terpen | <i>E</i> - β -Farnesen | 1664 | 1671 | 7,17 | 0,01 | 4,66 | 255 |
| Terpen | <i>E</i> -Linalool okside (furanoid) | 1440 | 1500 | 2,43 | 1669 | 2,49 | 219 |
| Terpen | Citronelol | 1764 | 1771 | 3,91 | 106 | 2,26 | 228 |
| Terpen | 3-Karen | 1147 | 1156 | 4,61 | 4,58 | 279 | 157 |
| Terpen | <i>E</i> -Farnesol-format | | | 6,47 | 0,08 | 0,62 | 295 |
| Terpen | Geranska kiselina | 2347 | 2331 | 3,7 | 108 | 2,06 | 280 |
| Terpen | Geranil-format | 1686 | 1694 | 3,93 | 23,73 | 9,07 | 233 |
| Terpen | Guaiazulen | | | 5,93 | 0,11 | 1,42 | 276 |
| Terpen | Hotrienol | 1603 | 1567 | 3,24 | 407 | 8,42 | 203 |
| Terpen | β -Kariofilen | 1599 | 1609 | 6,3 | 0,05 | 4,16 | 257 |
| Terpen | Izopinokarveol | 1666 | 1658 | 2,81 | 958,1 | 3,05 | 215 |
| Terpen | Limonen | 1198 | 1209 | 4,57 | 4,58 | 193 | 168 |
| Terpen | Linalool | 1543 | 1557 | 2,97 | 684 | 11,1 | 205 |
| Terpen | Linalil-izobutirat | 1622 | 1602 | 5,3 | 5,3 | 11 | 254 |
| Terpen | Mentol | 1630 | 1624 | 3,4 | 435 | 1,02 | 219 |

Tablica 4.1. Spojevi identificirani u uzorku vina-nastavak

| Skupina spojeva | Spoj | RI (literatura) | RI (određeno) | Log Kow | Topljivost u vodi pri 25 °C (mg/L) | Tlak pare pri 25 °C (Pa) | Vrelište (°C) |
|-----------------|----------------------------|-----------------|---------------|---------|------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Terpen | <i>p</i> -Cimen | 1270 | 1265 | 4 | 27,88 | 152 | 179 |
| Terpen | Z-Linalol oksid (furanoid) | 1446 | 1510 | 2,43 | 1669 | 2,49 | 219 |

4.2. Odabir volumena uzorka

Volumen uzorka jedan je od najvažnijih parametara koji uvelike utječu na učinkovitost ekstrakcije te se količina analita ekstrahiranih iz uzorka povećava s povećanjem volumena uzorka do određene vrijednosti volumena pri kojoj dolazi do zasićenja sorbensa (Šikuten i sur. 2021.). Prije optimizacije primjenom BBD potrebno je odrediti odgovarajući volumen uzorka te su odabrani volumeni od 3 , 4 i 5 mL za testiranje. Veći volumen uzorka rezultirao je većom apsolutnom površinom pikova (APP) za sve skupine spojeva, što je vidljivo na Slici 4.1. S obzirom na dobivene rezultate, prilikom daljnjeg postupka optimizacije korišteno je 5 mL uzorka.



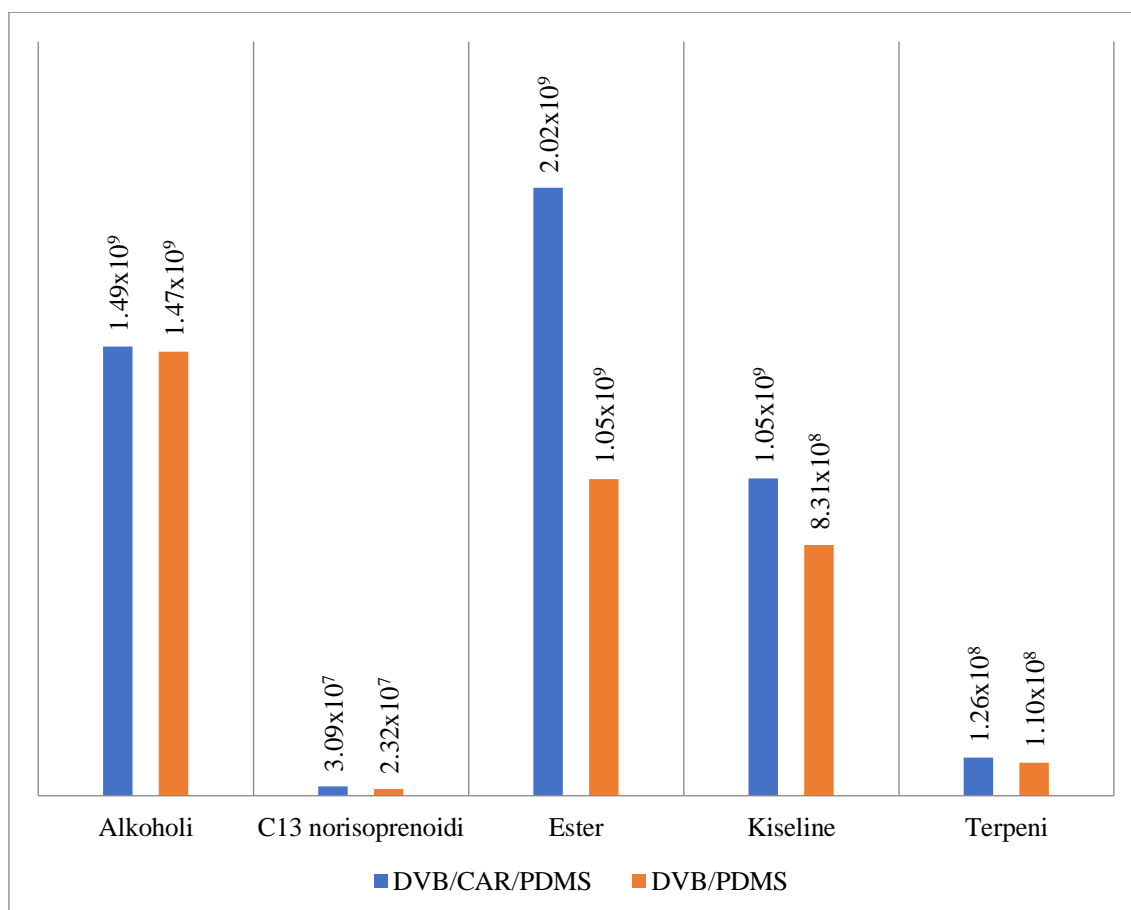
Slika 4.1. Ovisnost apsolutnih površina pikova o volumenu uzorka vina

4.3. Odabir sorbensa SPME-Arrow

Korišteni sorbens primarno je odgovoran za ekstrakciju analita, odnosno selektivnost i osjetljivost ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima korištenog sorbensa. Općenito, sposobnost ekstrakcije je određena koeficijentom razdiobe ciljanog analita između sorbensa i uzorka koji se analizira (Zheng i sur. 2018.). Učinkovitost ekstrakcije hlapivih spojeva vina

ispitana je primjenom dvaju komercijalno dostupnih sorbensa: DVB/PDMS i DVB/CAR/PDMS. Sorbens DVB/PDMS je bipolarna nepokretna faza koja se primjenjuje za ekstrakciju poluhlapivih analita, dok DVB/CAR/PDMS ima polarne i nepolarne sastavnice, zbog čega se primjenjuje pri analizi hlapivih i polu-hlapivih analita (Torrens i sur. 2004.; Herrington i sur. 2020.).

Slika 4.2. prikazuje ovisnost vrijednosti APP za pojedine skupine spojeva u ovisnosti o korištenom sorbensu. Najveće razlike očituju se u slučaju estera i kiselina. Rezultati pokazuju da je DVB/CAR/PDMS vlakno učinkovitije od DVB/PDMS vlakna, zbog čega je to vlakno odabrano za daljnju SPME-Arrow optimizaciju. Navedeno opažanje je u skladu s različitim rasponom hlapivosti analita u uzorku vina korištenom za optimiranje. Vrijednost tlaka para je fizikalna veličina koja uvelike određuje hlapljivost pojedinog spoja. Viša vrijednost ove veličine ukazuje na veću hlapivost. U tablici 4.1. navedene su vrijednosti tlaka pare detektiranih analita te su one u rasponu od 0,01 do 1780 Pa, što ukazuje na prisutnost analita vrlo različite hlapivosti.

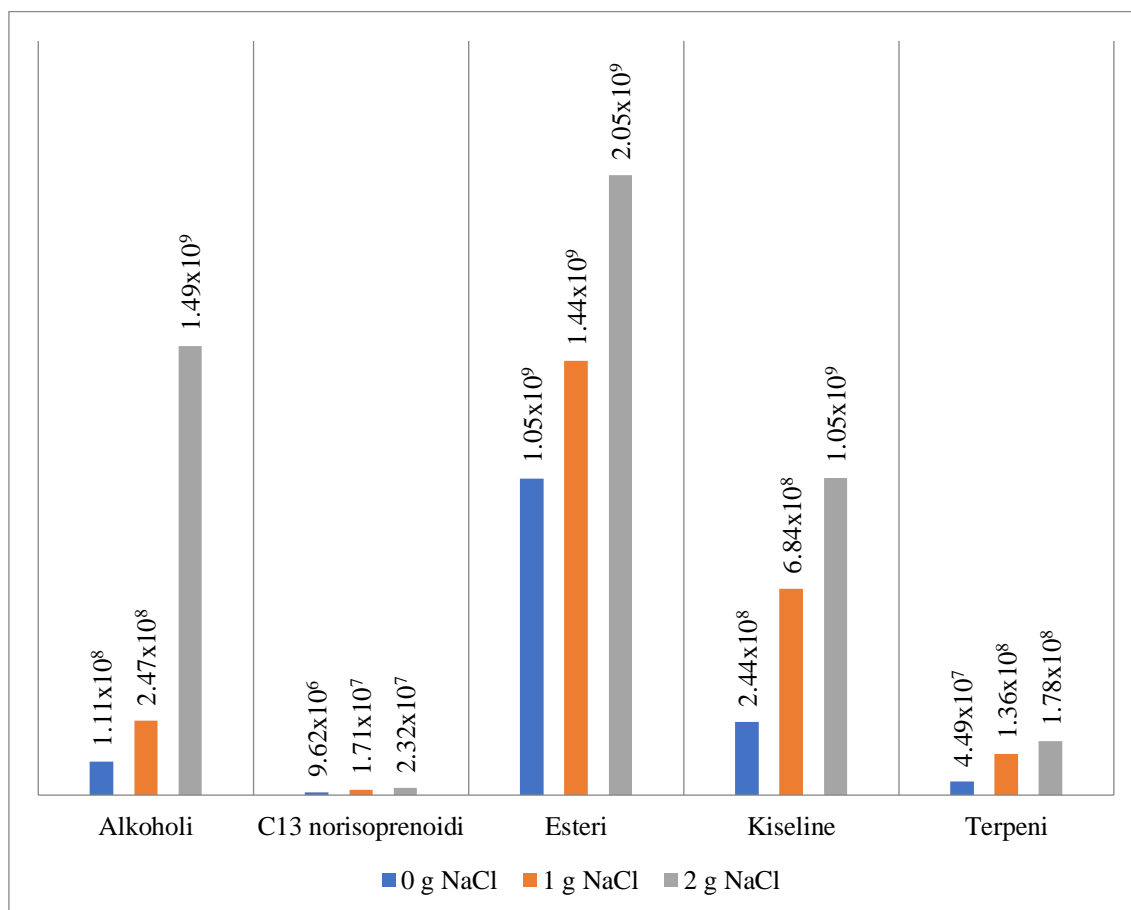


Slika 4.2. Hlapivi spojevi pomoću DVB/CAR/PDMS i DVB/PDMS vlakana

4.4. Odabir mase dodane soli

Kako bi se poboljšao učinak ekstrakcije hlapivih spojeva, odnosno kako bi se povećala ionska snaga, pri pripremi uzorka za analizu dodaje se određena količina NaCl. Navedeno uvelike pospješuje hlapivost analita koji su dobro topljivi u vodi. Uočeno je kako se kromatografski signal povećava kako se povećava količina NaCl-a, dosežući maksimalnu vrijednost. No, daljnjim povećanjem koncentracije soli, efikasnost opada zbog učinka

isoljenja (Câmara i sur. 2006.). Vrijednosti topljivosti pojedinih spojeva detektiranih u uzorku vina prikazane su u tablici 4.1. Viša vrijednost ukazuje na veću topljivost u vodu. Kako bi se odredila optimalna količina soli za optimizaciju, dodano je 0, 1 i 2 g NaCl. Slika 4.3. prikazuje kako je pri dodavanju 2 g NaCl-a učinak ekstrakcije najveći, zbog čega je pri optimizaciji metode dodano 2 g NaCl. Dodatak veće mase NaCl neće imati utjecaja na hlapivost pojedinih spojeva, pa time i na učinkovitost ekstrakcije jer je nastupilo prezasićenje uzorka ovom solju.



Slika 4.3. Hlapivi spojevi ovisno o količini dodanog natrijevog klorida

4.5. Optimizacija uvjeta SPME-Arrow ekstrakcije primjenom eksperimentalnog dizajna

Za optimizaciju uvjeta SPME-Arrow ekstrakcije odabran je Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn. Primjenom BBD dobivaju se točke eksperimenta kojima se ispituje utjecaj više čimbenika na tri razine, čime se omogućuje učinkovita procjena koeficijenta matematičkih modela prvog i drugog reda. Time se izbjegava ispitivanje ekstremnih vrijednosti, zbog čega je BBD učinkovitiji i ekonomičniji od naprimjer 3^k dizajna (Bezerra i sur. 2008.). Nezavisne varijable uključene u BBD odabrane su uzimajući u obzir njihov utjecaj na ravnotežu hlapivih spojeva iznad uzorka (Risticovic i sur. 2010.). Nezavisne varijable, čiji se utjecaj ispitivao, bile su temperatura ekstrakcije (40, 50, 60 °C), vrijeme inkubacije (10, 20, 30 minuta) i vrijeme izlaganja (30, 45, 60 minuta). Ukupno je generirano 15 eksperimenata uključujući i tri središnje točke te su eksperimenti provedeni nasumično.

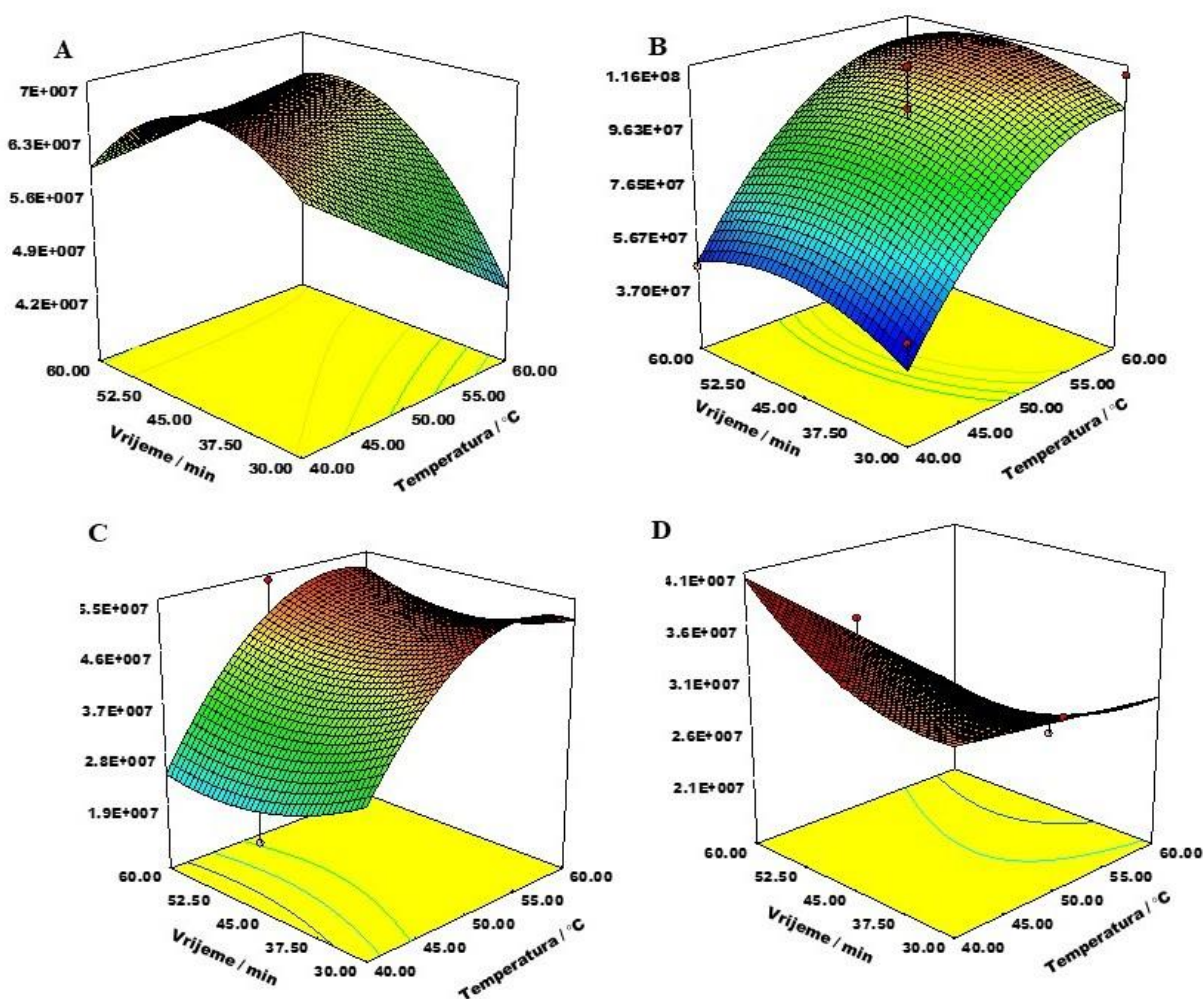
Kako bi se procijenila signifikantnost svih proučavanih varijabli, primijenjena je metoda površina odziva. U Tablici 4.2. prikazani su parametri analize varijance (ANOVA) za

sve proučavane modele. Koeficijent determinacije (R^2), p -vrijednosti za model, nedostatak pristajanja, prilagođeni R^2 i preciznost parametri su koji prikazuju prikladnost modela. Kako bi model bio prikladan, p -vrijednost mora biti manja od 0,05 odnosno p -vrijednost nedostatka pristajanja mora biti veća od 0,05. Razlika između vrijednosti prilagođenog R^2 i predviđenog R^2 treba biti manja od 0,2, a ako su vrijednosti veće, to upućuje na problem s podacima i/ili modelom. Koeficijenti determinacije (R^2) bili su u rasponu od 0,9012 do 0,9797, dok su p -vrijednosti modela bile u rasponu od $<0,0001$ do 0,0135, što ukazuje na visoku signifikantnost modela. S obzirom na to da su određene p -vrijednosti nedostatka pristajanja za sve modele bile veće od 0,2080, modeli imaju statistički značajan nedostatak pristajanja te su prikladni za određivanje optimalnih vrijednosti pojedinih parametara ekstrakcije.

Dobiveni rezultati prikazuju da su najznačajniji čimbenici koji utječu na učinkovitost ekstrakcije temperatura ekstrakcije i vrijeme izlaganja. Za temperaturu ekstrakcije p -vrijednosti iznose manje od 0,0001 pa do 0,0322, dok su p -vrijednosti za vrijeme izlaganja bile u rasponu od 0,0059 do 0,0456. Povećanje vremena izlaganja analita pozitivno je utjecalo na učinkovitosti ekstrakcije posebno estera, terpena i C13 norisoprenoide. Temperatura inkubacije nije značajno utjecala na učinkovitost ekstrakcije, osim u slučaju na kiseline za koje je određena p -vrijednost bila 0,0072. Za alkohole, C13 norisoprenoide, estere i terpene p -vrijednosti bile su u rasponu od 0,0230 do 0,5621. Kako bi se vizualizirao učinak interakcije temperature ekstrakcije i vremena izlaganja, korištene su površine odziva za kiseline, alkohole, estere i terpene (Slika 4.4.). U slučaju kiselina povišenje temperature do 50 °C i vremena izlaganja do 50 min ima pozitivan učinak na ekstrakciju, dok se u slučaju alkohola maksimalne vrijednosti APP postižu pri istom vremenu izlaganja, ali pri temperaturi od 60 °C. Povišenje temperature na 60 °C uz vrijeme izlaganja od 30 min ima pozitivan učinak na učinkovitost ekstrakcije estera, dok je u slučaju terpena situacija obrnuta. Niža temperatura (40 °C) i duže vrijeme izlaganja (60 min) dovode do postizanja maksimalnih vrijednosti APP.

Tablica 4.2. Koeficijenti kvadratne polinomne jednadžbe i regresijski koeficijent odziva i ANOVA parametri za dobivene modele za hlapive spojeve u vinu

| Odzivi | Kiseline | | Alkoholi | | C13 norisoprenoidi | | Esteri | | Terpeni | |
|----------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | Koeficijent | <i>p</i> -vrijednost | Koeficijent | <i>p</i> -vrijednost | Koeficijent | <i>p</i> -vrijednost | Koeficijent | <i>p</i> -vrijednost | Koeficijent | <i>p</i> -vrijednost |
| Model | | 0,0011 | | < 0,0001 | | < 0,0001 | | 0,0026 | | 0,0135 |
| Nedostatak pristajanja | | 0,2080 | | 0,5420 | | 0,5984 | | 0,9861 | | 0,8326 |
| Odsječak | 2,568x10 ⁷ | | 6,484x10 ⁷ | | 9,874x10 ⁵ | | 1,002x10 ⁸ | | 1,960x10 ⁷ | |
| A- Temperatura | 6,211x10 ⁶ | 0,0322 | -3,943x10 ⁶ | < 0,0001 | 2,519x10 ⁵ | < 0,0001 | 3,159x10 ⁷ | 0,0001 | -4,705x10 ⁶ | 0,0080 |
| B-Vrijeme inkubacije | -9,246x10 ⁶ | 0,0072 | -5,540x10 ⁶ | 0,0230 | 58125,00 | 0,3046 | -2,822x10 ⁶ | 0,5621 | 2,132x10 ⁶ | 0,1506 |
| C-Vrijeme izlaganja | 2,776x10 ⁶ | 0,0059 | 4,688x10 ⁶ | 0,0440 | 1,906x10 ⁵ | 0,0071 | 3,412x10 ⁶ | 0,0456 | 9,490x10 ⁵ | 0,0093 |
| AB | -5,383x10 ⁶ | 0,1314 | | | | | | | | |
| AC | 2,142x10 ⁶ | 0,0054 | 6,482x10 ⁶ | 0,0300 | 2,494x10 ⁵ | 0,0070 | | | -3,469x10 ⁶ | 0,0048 |
| BC | 4,666x10 ⁶ | 0,1790 | 5,232x10 ⁶ | 0,0542 | | | -1,270x10 ⁷ | 0,0405 | | |
| A ² | -1,000x10 ⁷ | 0,0235 | | | | | -1,696x10 ⁷ | 0,0383 | | |
| B ² | 1,130x10 ⁷ | 0,0150 | -8,240x10 ⁶ | 0,0218 | | | | | 6,910x10 ⁶ | 0,0080 |
| C ² | 3,891x10 ⁶ | 0,2662 | -7,981x10 ⁶ | 0,0249 | | | -1,066x10 ⁷ | 0,0581 | 2,686x10 ⁶ | 0,2096 |
| R ² | 0,9262 | | 0,9621 | | 0,9079 | | 0,9797 | | 0,9012 | |
| Prilagođeni R ² | 0,8934 | | 0,9243 | | 0,9311 | | 0,9894 | | 0,8521 | |
| Preciznost | 14,405 | | 18,339 | | 12,867 | | 18,881 | | 17,056 | |



Slika 4.4. Površine odziva interakcije između temperature ekstrakcije i vremena izlaganja za A) kiseline, B) alkohole, C) estere i D) terpene

Optimizacija SPME-Arrow ekstrakcijskih uvjeta provedena je pojedinačno za kiseline, alkohole, estere, terpene i C13 norisoprenoide (Tablica 4.3.). U tablici su i navedene prosječne vrijednosti pojedinih fizikalnih veličina kao što su vrelište, koeficijent razdiobe između oktanola i vode (K_{ow}) koji ukazuje na polarnost, tlak para te topljivost u vodi. Prosječne vrijednosti vrelišta za pojedine skupine su u rasponu od 184 (alkoholi) do 256 °C (C13-norizoprenoidi). Najviša potrebna temperatura za postizanje najučinkovitije ekstrakcije određena je u slučaju C13-norizoprenoida (60 °C), a najniža u slučaju alkohola (40 °C), što je u skladu s prosječnim vrijednostima vrelišta.

Tablica 4.3. Optimalni uvjeti za pojedine grupe spojeva za SPME-Arrow ekstrakciju

| Grupe spojeva | Temperatura (°C) | Vrijeme inkubacije (min) | Vrijeme izlaganja (min) | Točka vrelišta (°C) | Tlak pare (Pa) | Log K_{ow} | Topljivost u vodi pri 25 °C (mg/L) |
|--------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|----------------|--------------|------------------------------------|
| Kiseline | 54 | 10 | 30 | 239 | 78 | 3,01 | 12807 |
| Alkoholi | 40 | 16 | 41 | 184 | 215 | 1,97 | 92077 |
| Esteri | 60 | 10 | 56 | 237 | 74 | 3,53 | 24339 |
| Terpeni | 44 | 30 | 59 | 208 | 108 | 4,48 | 225 |
| C13 norisoprenoidi | 60 | 30 | 60 | 256 | 4,39 | 4,47 | 78 |

Različita fizikalno-kemijska svojstva među skupinama rezultiraju razlikama dobivenih uvjeta između navedenih skupina spojeva. Korištenjem višekriterijske metodologije istovremeno se razmatraju različiti odzivi i pronalazi optimalni kompromis između svih odziva (Bezerra i sur. 2008.). Najkorištenija višekriterijska metodologija u optimizaciji analitičkih postupaka je Derringova funkcija ili funkcija poželjnosti, kojom su dobiveni optimalni uvjeti, uzimajući u obzir sve navedene skupine kemijskih spojeva (Tablica 4.4.). Predviđene i dobivene vrijednosti su slične, što upućuje na dobru izvedbu razvijene ekstrakcijske metode.

Tablica 4.4. Optimalni uvjeti za SPME-Arrow ekstrakciju, predviđene i eksperimentalno dobijene vrijednosti za pojedine skupine hlapivih spojeva

| Grupe spojeva | Temperatura (°C) | Vrijeme inkubacije (min) | Vrijeme izlaganja (min) | Predviđeno vrijeme (Površina vrhax 10 ⁶) | Dobivena vrijednost (Površina vrhax 10 ⁶ , srednja vrijednost ± SD) |
|---------------|------------------|--------------------------|-------------------------|--|--|
| Kiseline | 50 | 10 | 60 | 52,88 | 54,06 ± 1,30 |
| Alkoholi | | | | 55,22 | 57,16 ± 0,81 |
| Esteri | | | | 121,51 | 119,21 ± 4,19 |
| Terpeni | | | | 22,94 | 21,74 ± 1,02 |

5. Zaključak

Ekstrakcijska tehnika SPME često je korištena za analizu hlapivih spojeva različitih prehrambenih proizvoda. Nedavno je razvijena SPME-*Arrow* ekstrakcijska tehnika koja je poboljšala tradicionalnu SPME: klin koji se koristi za SPME-*Arrow* ekstrakciju robusniji je i osjetljiviji u odnosu na vlakno. U ovom radu optimirana je metoda određivanja hlapivih spojeva u bijelom vinu pomoću SPME-*Arrow* tehnike. Tijekom analize korišten je volumen od 5 mL uzorka vina, DVB/CAR/PDMS sorbens te su dodana 2 g NaCl u analizirane uzorke. Ovom metodom identificirana su ukupno 103 hlapiva spoja. S obzirom na to da je SPME-*Arrow* osjetljiv na eksperimentalne uvjete, proces je optimiziran primjenom Box-Behnkenova eksperimentalnog dizajna kojim je generirano 15 različitih eksperimenata. Utvrđeno je da su optimalni uvjeti za ekstrakciju hlapivih spojeva bijelih vina sljedeći: temperatura ekstrakcije 50 °C, vrijeme inkubacije 10 min, te vrijeme izlaganja 60 min. Razlike između predviđenih i eksperimentalno određenih vrijednosti su vrlo male, što ukazuje na dobru prikladnost odabranog modela. Primjena optimizirane metode omogućuje točnije i preciznije rezultate za analiziranje hlapivih spojeva u budućnosti. Inovacije u vinogradarstvu i vinarstvu, klimatske i druge promjene utječu na promjenu aromatskog profila vina. Analitičke metode, među kojima je i SPME-*Arrow* tehnika, zasigurno će pridonijeti identifikaciji i napretku istraživanja hlapivih spojeva kako vina, tako i drugih prehrambenih proizvoda.

6. Literatura

1. Al-Bukhaiti W. Q., Norman A., Qasim A. S., Al-Farga A. (2017.). Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 6(1): 2319-1473
2. Babushok V. I., Zenkevich I. G. (2008). Retention Indices for Most Frequently Reported Essential Oil Compounds in GC. *Chromatographia*. 69(3-4), 257–269
3. Babushok V. I., Linstrom P. J., Zenkevich I. G. (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 40(4): 043101 1-47
4. Bartle K., Myers P. (2002.). History of gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 21(9-10): 547-557
5. Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., Escaleira L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76(5): 965–977
6. Bortnowska G. (2010.). Influence of thermodynamic and kinetic factors on the retention and release of aroma compounds in liquid food systems-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. 60(4): 301-307
7. Câmara J. S., Alves M. A., Marques J. C. (2006). Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*. 555(2): 191–200
8. Castro R., Natera R., Duran E., Garcia-Barroso C. (2008.). Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *European Food Research and Technology*. 228:1-18
9. Castro Ó., Trabalón L., Schilling B., Borrull F., Pocurull E. (2019). Solid phase microextraction Arrow for the determination of synthetic musk fragrances in fish samples. *Journal of Chromatography A*. 1591: 55-61
10. Cha J., Chin Y.-W., Lee J.-Y., Kim T.-W., Jang H. W. (2020). Analysis of Volatile Compounds in Soju, a Korean Distilled Spirit, by SPME-Arrow-GC/MS. *Foods*. 9(10): 1422 1-10
11. Chen L., Capone D. L., Jeffery D. W. (2019.). Analysis of Potent Odour-Active Volatile Thiols in Foods and Beverages with a Focus on Wine. *Molecules*. 24(13): 2473 1-24
12. Chen L., Darriet P. (2021.). Strategies for the identification and sensory evaluation of volatile constituents in wine. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. 20(5): 4549-4583
13. Ferreira V. (2010.). Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. U: *Managing Wine Quality: Viticulture and Wine Quality*. Elsevier Ltd., Oxford, United Kingdom, str. 3-28
14. Helin A., Rönkkö T., Parshintsev J., Hartonen K., Schilling B., Läubli T., Riekkola M.-L. (2015). Solid phase microextraction Arrow for the sampling of volatile amines in waste water and atmosphere. *Journal of Chromatography A*. 1426: 56–63

15. Herrington J. S., Gómez-Ríos G. A., Myers C., Stidsen G., Bell D. S. (2020). Hunting Molecules in Complex Matrices with SPME Arrows: A Review. *Separations*. 7(1): 12-20
16. Jimenez-Lorenzo R., Bloem A., Farines V., Sablayrolles J. M., Camarasa C. (2021.). How to modulate the formation of negative volatile sulfur compounds during wine fermentation?. *FEMS Yeast Research*. 21(5): 1-15
17. Kinzurik M. I., Herbst-Johnstone M., Gardner R. C., Fedrizzi B. (2015.). Evolution of Volatile Sulfur Compounds during Wine Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(36): 8017-8024
18. Lan H.Z., Ronkko T., Parshintsev J., Hartonen K., Gan N., Sakeye M., Sarfraz J., Riekkola M.L. (2017.). Modified zeolitic imidazolate framework-8 as solid-phase microextraction Arrow coating for sampling of amines in waste water and food samples followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1486: 76–85
19. Lee J. Y., Kim W. S., Lee Y. Y., Choi Y. S., Choi H., Jang H. W. (2019.). Solid-phase microextraction Arrow for the volatile organic compounds in soy sauce. *Journal of Separation Science*. 42: 2942–2948
20. Lei Y., Xie S., Guan X., Song C., Zhang Z., Meng J. (2017.). Methoxypyrazines biosynthesis and metabolism in grape: a review. *Food Chemistry*. 15(245): 1141-1147
21. Li Z., Howell K., Fang Z., Zhang P. (2019.). Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of wine making processes. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. 19(1): 247-281
22. Lisanti M. T., Laboyrie J., Marchand-Marion S., de Revel G., Moio L., Riquier L., Franc C. (2021). Minty aroma compounds in red wine: Development of a novel automated HS-SPME-arrow and gas chromatography-tandem mass spectrometry quantification method. *Food Chemistry*. 361: 130029 1-10
23. Manousi N., Rosenberg E., Zachariadis G. A. (2020). Solid-Phase Microextraction Arrow for the Sampling of Volatile Organic Compounds in Milk Samples. *Separations*. 7(4): 75 1-12
24. Marín-San Roman S., Rubio-Breton P., Perez-Alvarez E. P., Garde-Cerdan T. (2020.). Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International*. 137(3): 109712 1-13
25. Mendes-Pinto M. M. (2009.). Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 483: 236–245
26. Nam T. G., Lee J.-Y., Kim B.-K., Song N.-E., Jang H. W. (2019). Analyzing volatiles in brown rice vinegar by headspace solid-phase microextraction (SPME)—Arrow: Optimizing the extraction conditions and comparisons with conventional SPME. *International Journal of Food Properties*. 22(1): 1195–1204
27. Ortega-Heras M., González-San José M., Beltrán S. (2002). Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Analytica Chimica Acta*. 458(1): 85–93

28. Pozo-Bayón M. A., Reineccius G. (2009.). Interactions Between Wine Matrix Macro-Components and Aroma Compounds. U: Wine Chemistry and Biochemistry. Springer, New York, NY, str. 417-435
29. Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006.). Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, Volume 2. John Wiley & Sons, Ltd. Bordeaux, France.
30. Risticvic S., Lord H., Górecki T., Arthur C. L., Pawliszyn, J. (2010). Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nature Protocols*. 5(1): 122–139
31. Robinson A. L., Ebeler S. E., Heymann H., Boss P. K., Solomon P. S., Trengove R. D. (2009.). Interactions between Wine Volatile Compounds and Grape and Wine Matrix Components Influence Aroma Compound Headspace Partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 10313-10322
32. Robinson A. L., Boss P. K., Solomon P. S., Trengove R. D., Heymann H., Ebeler S.E. (2014.a). Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impact. *American Journal of Enology and Viticulture*. 65(1): 1-24
33. Robinson A.L., Boss P.K., Solomon P.S., Trengove R.D., Heymann H., Ebeler S.E. (2014.b). Origins of Grape and Wine Aroma. Part 2. Chemical and Sensory Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*. 65(1): 25-42
34. Rodríguez-Bencomo J. J., Muñoz-González C., Andújar-Ortiz I., Martín-Álvarez P. J., Moreno-Arribas M. V., Pozo-Bayón M. A. (2011.). Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(13): 2484-2494
35. Roland A., Schneider R., Razungles A., Cavalier F. (2011.) Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Application. American Chemical Society. *Chemical Reviews* 111: 7355-7376
36. Ruiz J., Kiene F., Belda I., Fracassetti D., Marquina D., Navasculas E., Calderon F., Benito A., Rauhut D., Santos A., Benito S. (2019.). Effects on varietal aromas during winemaking: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(18): 7425-7450
37. Shinohara T. (1986.). Factors Affecting the Formation of Volatile Fatty Acids during Grape Must Fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50 (12): 3197-3199
38. Song N.-E., Lee J.-Y., Lee Y.-Y., Park J.-D., Jang H. W. (2019). Comparison of headspace–SPME and SPME-Arrow–GC–MS methods for the determination of volatile compounds in Korean salt–fermented fish sauce. *Applied Biological Chemistry*. 62(1): 1-8
39. Swiegers J. H., Bartowsky E. J., Henschke P. A., Pretorius I. S. (2005.). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11: 139–173
40. Swiegers J. H., Pretorius I. S. (2007.). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:954-960

41. Šikuten I., Štambuk P., Karoglan Kontić J., Maletić E., Tomaz I., Preiner D. (2021.). Optimization of SPME-Arrow-GC/MS Method for Determination of Free and Bound Volatile Organic Compounds from Grape Skins. *Molecules*. 26: 7409 1-18
42. Tat L., Comuzzo P., Stolfo I., Battistutta F. (2005). Optimization of wine headspace analysis by solid-phase microextraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Food Chemistry*. 93(2): 361–369
43. Torrens J., Riu-Aumatell M., Lopez-Tamames E., Buxaderas S. (2004.). Volatile Compounds of Red and White Wines by Headspace-Solid-Phase Microextraction Using Different Fibers. *Journal of Chromatographic Science*. 42(6): 310-316
44. Wedler H. B., Pemberton R., Tantillo D. J. (2015.). Carbocations and the Complex Flavor and Bouquet of Wine: Mechanistic Aspects of Terpene Biosynthesis in Wine Grape. *Molecules*. 20(6): 10781-10792
45. Xu X.B., Murtada K., Pawliszyn J. (2021.). Determination of selected volatile terpenes in fish samples via solid phase microextraction arrow coupled with GC-MS. *Talanta*. 221: 121446 1-7
46. Xu Z., Zhou C., Shi H., Zhang H., Bi Y., Xu X. (2021.). Processing of Flavor-Enhanced Oils: Optimization and Validation of Multiple Headspace Solid-Phase Microextraction-Arrow to Quantify Pyrazines in the Oils. *Life*. 11(5): 390 1-12
47. Zhang X., Wang C., Wang L., Chen S., Xu Y. (2019). Optimization and validation of a headspace solid-phase microextraction-arrow gas chromatography-mass spectrometry method using central composite design for determination of aroma compounds in Chinese liquor (Baijiu). *Journal of Chromatography A*. 460584: 17-24
48. Zheng J., Huang J., Yang Q., Ni C., Xie X., Shi Y., Sun J., Zhu F., Ouyang G. (2018). Fabrications of novel solid phase microextraction fiber coatings based on new materials for high enrichment capability. *Trends in Analytical Chemistry*. 108: 135-153
49. Zhu F., Du B., Li J. (2016.). Aroma Compounds in Wine. U: Grape and Wine Biotechnology. InTech Open, London, United Kingdom, str. 273-283

7. Prilog

7.1. Slike:

- Slika 2.1. Biosinteza terpena
- Slika 2.2. Kemijska struktura metokspirazina identificiranih u grožđu i vinu
- Slika 2.3. Podjela norisoprenoida na megastimane i ne-megastigmane te kemijske strukture spojeva predstavnika
- Slika 2.4. Tri puta biosinteze oslobađanja 4MMP i 3MH u vinu
- Slika 2.5. Biosinteza viših alkohola
- Slika 2.6. Više masne kiseline
- Slika 2.7. Predstavnici estera u vinu
- Slika 2.8. Kemijska struktura acetaldehida
- Slika 2.9. Nastajanje hlapivih fenola iz odgovarajućih preteča hidroksicimetne kiseline
- Slika 2.10. Kemijske strukture dijela sumpornih spojeva koji se nalaze u vinu
- Slika 2.11. Kemijska struktura dietoksietana
- Slika 2.12. Kemijska struktura sotolona
- Slika 2.13. Princip ekstrakcije tekuće – tekuće
- Slika 2.14. Koraci tijekom SPE metode
- Slika 2.15. Svojstva komercijalno dostupnih SPME-vlakana
- Slika 2.16. Ekstrakcijski procesi pomoću HS-SPME i DI-SPME tehnika
- Slika 2.17. Izgled magnetnog štapića
- Slika 2.18. Izgled SPME-*Arrow*
- Slika 2.19. Pojednostavljeni dijagram plinskog kromatografa
- Slika 3.1. RSH TriPlus autosampler
- Slika 4.1. Ovisnost apsolutnih površina pikova o volumenu uzorka vina
- Slika 4.2. Hlapivi spojevi pomoću DVB/CAR/PDMS i DVB/PDMS vlakana
- Slika 4.3. Hlapivi spojevi ovisno o količini dodanog natrijevog klorida
- Slika 4.4. Površine odziva interakcije između temperature ekstrakcije i vremena izlaganja za A) kiseline, B) alkohole, C) estere i D) terpene

7.2. Tablice:

- Tablica 3.1. Korišteni uzorci vina
- Tablica 3.2. Nezavisne varijable i njihove razine korištene za BDD za optimizaciju ekstrakcije SPME-*Arrow* pri određivanju hlapivih spojeva u vinu
- Tablica 4.1. Spojevi identificirani u uzorku vina
- Tablica 4.2. Koeficijenti kvadratne polinomne jednadžbe i regresijski koeficijent odziva i ANOVA parametri za dobivene modele za hlapive spojeve u vinu
- Tablica 4.3. Optimalni uvjeti za pojedine grupe spojeva za SPME-*Arrow* ekstrakciju
- Tablica 4.4. Optimalni uvjeti za SPME-*Arrow* ekstrakciju, predviđene i eksperimentalno dobijene vrijednosti za pojedine skupine hlapivih spojeva

Životopis

Nina Buljević rođena je 21. srpnja 1997. godine u Splitu. Osnovnu školu Vladimira Nazora pohađala je u Postirima na otoku Braču, a opću gimnaziju završila je u Supetru na Braču 2016. godine. Po završetku gimnazije upisuje preddiplomski studij Hortikultura na Agronomskom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu. 2019. godine obranom rada: „Kakvoća i svojstva crnih vina vinogorja Brač“ završava preddiplomski studij te iste godine upisuje diplomski studij Hortikultura – Vinogradarstvo i vinarstvo. 2021. godine od Hrvatske Školske Zaklade – Miljenko Grgich Zaklada ostvaruje stipendiju za tromjesečnu stručnu praksu u vinariji Obsidian Wine Company u Sonomi, Kalifornija. 2022. godine ostvaruje stipendiju Erasmus + stručna praksa u trajanju od šest mjeseci u INRAe (L'institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement), UMR 1083 Sciences pour l'œnologie u Montpellieru gdje radi na projektu: „Production of volatile sulphur compounds during wine fermentation“. Sudjelovala je u izvannastavnim aktivnostima: Istraživačka grupa za analizu grožđa i vina, Vinarska grupa i Mala destilacijska grupa. Od 2017. godine je članica studentske udruge IAAS Hrvatska. Tečno razumije i upotrebljavau govoru i pismu engleski jezik na razini C1 te ima osnovno znanje talijanskog, francuskog i španjolskog jezika. Poznaje rad na računalu.