

# Profil hlapljivih spojeva likera od limuna, mirte i naranče

---

**Siroglavić, Dominik**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:824550>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIKERA OD LIMUNA, MIRTE I NARANČE**

**DIPLOMSKI RAD**

**DOMINIK SIROGLAVIĆ**

**Matični broj: 15**

**Split, listopad 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIKERA OD LIMUNA, MIRTE I NARANČE**

**DIPLOMSKI RAD**

**DOMINIK SIROGLAVIĆ**

**Matični broj: 15**

**Split, listopad 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF LEMON, MYRTLE AND ORANGE**  
**LIQUEURS**

**DIPLOMA THESIS**

**DOMINIK SIROGLAVIĆ**

**Parent number: 15**

**Split, october 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско - tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**  
Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**  
Tema rada: je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско – tehnološkog fakulteta  
Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIKERA OD LIMUNA, MIRTE I NARANČE

Dominik Siroglavić, 15

#### Sažetak:

Veliki broj prirodnih spojeva u prehrambenim proizvodima nisu stabilni, osobito hlapljive tvari jer se mogu lako mijenjati prilikom procesa proizvodnje, dozrijevanja, skladištenja te uslijed djelovanja različitih vanjskih čimbenika. Zadatak ovog eksperimentalnog rada je bio identificirati hlapljive spojeve iz uzoraka domaćih likera od limuna, mirte i naranče.

Izolacija hlapljivih spojeva izvedena je pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći plavo i pink polimerno vlakno s ovojnica polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB). Izolirani spojevi su analizirani kombiniranim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Najzastupljeniji spojevi u ispitivanim uzorcima su bili: 3-metilbutan-1-ol (5,7 - 56,5 %), 1,8-cineol (3,4 - 53,3 %), etil-heksadekanoat (1,2 - 26,1 %),  $\alpha$ -terpineol (10,7 - 23,8 %) te 4-terpineol (10,7 - 19,2 %). Karakteristični spojevi u uzorcima su većinom terpeni, primjerice mirtenol, mirtenil-acetat, mirtenal i dr.

**Ključne riječi:** liker od limuna, liker od mirte, liker od naranče, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

**Rad sadrži:** 50 stranica, 23 slike, 6 tablica, 48 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

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

**Datum obrane:** 14. listopada 2021.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate study Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Thesis subject:** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6  
**Mentor:** Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF LEMON, MYRTLE AND ORANGE LIQUEURS

Dominik Siroglavić, 15

#### Abstract:

Many compounds of natural origin in food products are not stable, especially volatile substances, due to the fact that they can be easily changed during the process of production, maturation, storage and due to the action of various external factors. The aim of this graduate thesis was to identify volatile compounds from samples of homemade liqueurs of lemon, myrtle and orange.

Isolation of volatile compounds was performed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) using blue and pink fiber with polydimethylsiloxane/divinylbenzene coating (PDMS/DVB). The isolated compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The most common compounds in the tested samples were: 3-methylbutan-1-ol (5,7 - 56,5 %), 1,8-cineole (3,4 - 53,3 %), ethyl hexadecanoate (1,2 - 26,1 %),  $\alpha$ -terpineol (10,7 - 23,8 %) and 4-terpineol (10,7 - 19,2 %). Characteristic compounds in samples are mainly terpenes, namely mirtenol, mirtenyl acetate, mirtenal, etc.

**Keywords:** lemon liqueur, myrtle liqueur, orange liqueur, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 50 pages, 23 figures, 6 tables, 48 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

- |                         |              |
|-------------------------|--------------|
| 1. Marina Zekić         | chair person |
| 2. Ani Radonić          | member       |
| 3. Zvonimir Marijanović | supervisor   |

**Defence date:** 14th October 2021.

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

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju i Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko – tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od siječnja do listopada 2021. godine.*



## **ZAHVALA**

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, braći i sestrama što su mi omogućili sve potrebno kako bi upisao fakultet, okusio sve čari studentskog života te ga uspješno priveo kraju. Bili ste i ostali najveća potpora u mojem životu, hvala Vam na beskonačnoj ljubavi, vjeri u moj uspjeh i predanošću za mene.*

*Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na mentorstvu kako završnog tako i diplomskog rada. Hvala Vam na predloženoj temi, stručnoj pomoći te na svim savjetima koje ste mi dali bilo tokom predavanja u službi profesora bilo u službi mentora.*

*Čudno je doći u nepoznati grad i među nepoznate ljude, ali zahvaljujući maloj grupi velikih ljudi sve postaje tako lako. Hvala Vam dragi moji prijatelji što ste mi dali priliku da Vas upoznam i tako steknem prijateljstva koja bi mogla potrajati dugi niz godina.*

*veni, vidi, vici*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva u uzorcima domaćih likera od limuna, mirte i naranče te tako utvrditi koji su karakteristični spojevi u ovoj vrsti testiranih uzoraka.

U svrhu izoliranja spojeva i identifikacije istih potrebno je:

- ❖ Izolirati hlapljive spojeve iz uzoraka likera metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) primjenom plavog i pink vlakna koja su obložena tankim polimernim slojem polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB),
- ❖ Izolirane spojeve analizirati primjenom kombiniranog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC-MS) te utvrditi koji su karakteristični hlapljivi spojevi za ovu vrstu jakog alkoholnog pića.

## SAŽETAK

Veliki broj prirodnih spojeva u prehrambenim proizvodima nisu stabilni, osobito hlapljivi spojevi jer se mogu lako mijenjati prilikom procesa proizvodnje, dozrijevanja, skladištenja te uslijed djelovanja različitih vanjskih čimbenika. Zadatak ovog eksperimentalnog rada je bio identificirati hlapljive spojeve iz uzoraka domaćih likera od limuna, mirte i naranče.

Izolacija hlapljivih spojeva izvedena je pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći plavo i pink polimerno vlakno s ovojnica polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB). Izolirani spojevi su analizirani kombiniranim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Najzastupljeniji spojevi u ispitivanim uzorcima su bili: 3-metilbutan-1-ol (5,7 - 56,5 %), 1,8-cineol (3,4 - 53,3 %), etil-heksadekanoat (1,2 - 26,1 %),  $\alpha$ -terpineol (10,7 - 23,8 %) te 4-terpineol (10,7 - 19,2 %). Karakteristični spojevi u uzorcima su većinom terpeni, primjerice mirtenol, mirtenil-acetat, mirtenal i dr.

**Ključne riječi:** liker od limuna, liker od mirte, liker od naranče, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

## SUMMARY

Many compounds of natural origin in food products are not stable, especially volatile substances, due to the fact that they can be easily changed during the process of production, maturation, storage and due to the action of various external factors. The aim of this graduate thesis was to identify volatile compounds from samples of homemade liqueurs of lemon, myrtle and orange.

Isolation of volatile compounds was performed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) using blue and pink fiber with polydimethylsiloxane /divinylbenzene coating (PDMS/DVB). The isolated compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The most common compounds in the tested samples were: 3-methylbutan-1-ol (5,7 - 56,5 %), 1,8-cineole (3,4 - 53,3 %), ethyl hexadecanoate (1,2 - 26,1 %),  $\alpha$ -terpineol (10,7 - 23,8 %) and 4-terpineol (10,7 - 19,2 %). Characteristic compounds in samples are mainly terpenes, namely mirtenol, mirtenyl acetate, mirtenal, etc.

**Keywords:** lemon liqueur, myrtle liqueur, orange liqueur, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

## SADRŽAJ

<b>1. OPĆI DIO</b> .....	2
<b>1.1 JAKA ALKOHOLNA PIĆA</b> .....	3
1.1.1 Definicija .....	4
1.1.2 Klasifikacija .....	5
<b>1.2 RAKIJE</b> .....	6
1.2.1 Komovica.....	6
<b>1.3 TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE</b> .....	7
1.3.1 Berba, muljanje i cijedenje grožđa .....	8
1.3.2 Alkoholna fermentacija.....	8
1.3.3 Destilacija .....	9
<b>1.4 LIKERI</b> .....	12
<b>1.5 SPOJEVI AROME JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA</b> .....	14
1.5.1 Komponente primarne arome .....	15
1.5.2 Komponente sekundarne arome.....	15
1.5.3 Tvari arome nastale tijekom destilacije .....	16
1.5.4 Tvari arome nastale tijekom dozrijevanja.....	16
<b>1.6 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA</b> .....	17
1.6.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) .....	17
<b>1.7 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA</b> .....	19
1.7.1 Plinska kromatografija.....	19
1.7.2 Spektrometrija masa .....	20
1.7.3 Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) ..	21
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	23
<b>2.1 UZORCI LIKERA</b> .....	24
<b>2.2 APARATURA</b> .....	25

<b>2.3</b>	<b>IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>HLAPLJIVI SPOJEVI UZORAKA IZOLIRANI HS-SPME METODOM</b>	
	<b>39</b>	
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>46</b>

***UVOD***

Pod pojmom jaka alkoholna pića (JAP) podrazumijevamo pića koja u sebi sadrže minimalno 15 % vol. alkohola, imaju svoja specifična senzorska svojstva te su predviđeni za ljudsku potrošnju. Mogu se dobiti direktnim postupkom destilacije prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla te sadrže šećer ili procesom maceracije određenog aromatičnog bilja i plodova voća u etilnom alkoholu.

Proizvodnja jakih alkoholnih pića se intenzivno povećala nakon unaprijeđenih postupaka redestilacije i rektifikacije sredinom 19. stoljeća, a samim time je porasla kvaliteta gotovih proizvoda.

Najveće količine rakije komovice se proizvode u onim zemljama koje obiluju bogatom vinskom proizvodnjom zbog velike količine nusproizvoda (prevrela komina) pa je cilj iskoristiti nusproizvod pri proizvodnji vina. [1]

Rakija komovica nastaje destilacijom prevreloga groždanog masulja plemenite vinove loze prilikom čega se može dodati i destilat vinskog taloga. Da bi ovakav proizvod stavili na tržište, komovica mora zadovoljiti određene uvjete. Primjena ove vrste rakije u procesu dobivanja drugih jakih alkoholnih pića je najveća jer se pokazala kao odlična alkoholna baza drugim žestokim pićima.

Cilj ovog rada je odrediti kemijski profil hlapljivih spojeva iz uzoraka domaćih likera kojima je baza rakija komovica. Tehnika izolacije koja je korištena je mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Analiziranjem izoliranih spojeva pomoći plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC-MS) dobije se uvid u kemijski profil hlapljivih spojeva.



## ***1. OPĆI DIO***

## 1.1 JAKA ALKOHOLNA PIĆA

Početak proizvodnje jakih alkoholnih pića dolazi u periodu kada je proizvodnja piva i vina u svijetu bila na visokoj razini. Prva žestoka alkoholna pića dobivena su izravnom, grubo izvedenom destilacijom običnih vina. Umakanje cvjetova i trava u vodi, potom kuhanje i kondenziranje, stoljećima je imalo primjenu u medicini te kasnije u pripremi hrane i parfema. Sve većim proučavanjem procesa fermentacije i destilacije, počinje masovna proizvodnja jakih alkoholnih pića. U hladnijim krajevima, nepogodnim za proizvodnju vina, započinje se s gnječenjem i dodavanjem žitarica te proizvodnjom današnjih viskija.

Prvi proizvod dobiven destilacijom nazvan je voda života, lat. *aqua vitae*. Takav izraz s vremenom postaje prepoznatljiv dio terminologije vezane za alkoholna pića žestokog okusa. Skandinavci svojim žestokim alkoholnim pićima daju ime *aquavit*, Francuzi *eau de vie*, Rusi tzv. „mala voda“ ili *vodka* dok Kelti *uisge beatha* kasnije pretvoreno u riječ *whisky*. [1]

Obzirom da otkriće redestilacije i rektifikacije datira tek iz 19. stoljeća (slika 1.) možemo zaključiti da prvotna žestoka alkoholna pića nisu bila idealnog okusa zbog visoke koncentracije „viših alkohola“ koji daju neobrađeni okus. [2]

Modernim tehnološkim procesima žestoka alkoholna pića dobivaju dodatnu razinu posebnosti, a mogućnost dodavanja aroma, ekstrakata bilja i začina te izvođenje redestilacije i rektifikacije su samo neki od njih.

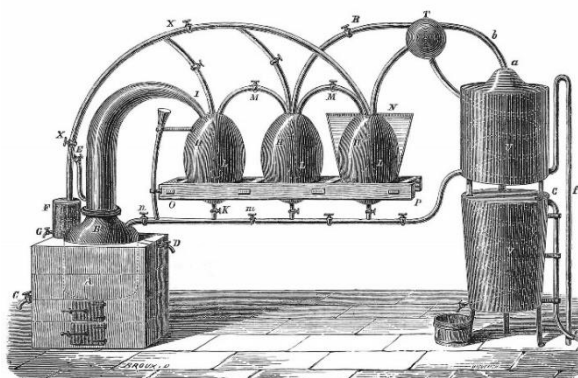


Fig. 243. — Appareil distillatoire d'Edouard Adam, breveté en 1805.

**Slika 1.** Prvi uređaj za redestilaciju iz 1805. godine [3]

### 1.1.1 Definicija

Prema definiciji iz Pravilnika o jakim alkoholnim pićima, to su alkoholna pića namijenjena za ljudsku potrošnju te imaju specifična senzorska svojstva. Moraju biti minimalne alkoholne jakosti 15% i proizvede se na sljedeće načine:

- ❖ Izravno:
  - destilacijom, uz moguće dodavanje arome, prirodno prevrele sirovine poljoprivrednog podrijetla,
  - maceracijom ili sličnom obradom bilja u destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili u svim jakim alkoholnim pićima definiranim Pravilnikom o istima,
  - dodavanjem aroma, šećera te drugih sladila i/ili drugih prehrambenih i/ili poljoprivrednih proizvoda destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili jakim alkoholnim pićima definiranim Pravilnikom o istima.
- ❖ Miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više:
  - etilnim alkoholom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog podrijetla, i/ili
  - drugih alkoholnih pića, i/ili
  - drugih jakih alkoholnih pića, i/ili
  - pića. [4]

Podrijetlo etilnog alkohola koji se upotrebljava za proizvodnju jakih alkoholnih pića te njegovih sastojaka striktno mora biti poljoprivredno. Takva vrsta alkohola dobiva se rafinacijom prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla te zadovoljava osnovne zahtjeve kakvoće propisane pravilnikom.

Senzorska svojstva etilnog alkohola koje primarno definiraju miris i okus moraju biti karakteristični za početnu sirovinu iz koje je proizveden, a minimalna alkoholna jakost mora iznositi 96,0 % vol.. Osim senzorskih obilježja, moraju biti zadovoljeni i maksimalni udjeli ostataka poput ukupne kiselosti, estera, aldehida, viših alkohola, metanola, suhi ekstrakt, hlapljivih spojeva na bazi dušika te furfurala. [5]

### 1.1.2 Klasifikacija

Jaka alkoholna pića se obzirom na vrstu sirovine, količinu alkohola i šećera te tehnološki postupak proizvodnje dijele na:

- ❖ prirodno jaka alkoholna pića,
- ❖ umjetno jaka alkoholna pića, i
- ❖ aromatizirana vina.

Proizvodnja **prirodno jakih alkoholnih pića** temelji se na destilaciji prefermentiranih komina te krajnji proizvod ima specifičnu aromu koja potječe od osnovne sirovine. Da proizvod završi na tržištu, tijekom proizvodnog procesa moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti poput zabranjene dodavanja: šećera, čistog škrobnog sirupa, sirovina na bazi škroba, umjetnih aroma i boja, proizvoda biljnog podrijetla dobivenih ekstrakcijom etilnim alkoholom te dodavanja rafiniranog etilnog alkohola. Dijele se prema vrsti sirovine iz kojih se dobivaju na voćne rakije, šećerne rakije i žitne rakije.

**Umjetno jaka alkoholna pića** se dobivaju maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom voćnih sokova i/ili dodavanjem rafiniranog alkohola i aromatičnih sastojaka. Osnovna organoleptička svojstva su definirana početnom sirovinom u procesu proizvodnje. [6]

Korištenjem aroma u procesu proizvodnje jakih alkoholnih pića, prema pravilniku koji propisuje dozvoljene prehrambene aditive u hrani, proizvode se **aromatizirana vina** procesom maceracije aroma i osušenih dijelova nekih biljaka u vinima ili prevrelim voćnim sokovima. Tijekom proizvodnog procesa može se, a i ne mora, dodati šećer i/ili rafinirani alkohol.

Prema podrijetlu sirovine i tehnološkom postupku proizvodnje jaka alkoholna pića se dijele na:

- ❖ rakije,
- ❖ rakije po posebnim postupcima,
- ❖ likere,
- ❖ jaka alkoholna pića po posebnim postupcima, i
- ❖ miješana jaka alkoholna pića. [7]

## 1.2 RAKIJE

U svrhu dobivanja rakija mogu se koristiti skoro sve vrste voća koje u sebi sadrže šećer, npr. šljive, breskve, maline, jabuke, grožđe, kruške, jagode, smokve, trešnje, sušeno voće, razni nusproizvodi u preradi voća, kao drop i kom voća te talog vina. U svrhu proizvodnje rakije vrhunske kvalitete treba se koristiti samo zrelo, očuvano voće bez vidljivih oštećenja. Proces dobivanja rakije temelji se na destilaciji prefermentiranog soka, masulja i komine grožđa te ostalog voća pa se rakije dijele na:

- ❖ rakija od grožđa – vinjak, *brandy*, komovica, lozovača, droždenka i vinovica,
- ❖ voćne rakije – od koštuničavog voća (šljiva, višnja, trešnja), jezgričavog voća (jabuka, dunja, smokva) i bobičastog voća (borovnica, ribiz, kupina),
- ❖ rakije od voćne komine,
- ❖ specijalne rakije – travarica, orahovica, klekovača, biska i dr. [8]



*Slika 2. Višnjevac, viljamovka, travarica i lozovača [9]*

### 1.2.1 Komovica

Najveće količine ovakve vrste rakije se proizvode u zemljama s bogatom vinskom proizvodnjom iz razloga da se iskoristi nusproizvod pri proizvodnji vina. Prema propisima pod imenom komovica smatra se rakija dobivena destilacijom prevreloga

groždanog masulja plemenite vinove loze kojoj se može dodati destilat vinskog taloga. S ciljem stavljanja na tržište, komovica mora zadovoljiti sljedeće uvjete:

- ❖ dobivena je strogo iz fermentirane groždane komine te destilirana nedugo sa vodenom parom ili nakon dodavanja vode grožđanoj komini,
- ❖ maksimalno dozvoljena količina dodanog vinskog taloga na 100 kg iskorištene groždane komine treba iznositi 25 kg,
- ❖ prilikom destilacije proizvedena alkoholna tekućina mora imati manje od 86 % vol. alkohola,
- ❖ maksimalno dozvoljena količina alkohola koji vuče porijeklo od taloga mora iznositi 35 % od ukupne količine alkohola u krajnjem proizvodu,
- ❖ maksimalno dozvoljena količina metanola iznosi 1000 grama po hektolitr preračunato na 100 % vol. alkohola,
- ❖ sadržaj ukupnih hlapljivih tvari mora iznositi najmanje 140 grama po hektolitr preračunato na 100 % vol. alkohola,
- ❖ redestilacija je dopuštena na identičnu alkoholnu jakost,
- ❖ rakija komovica koja se stavlja na tržište kao gotov proizvod treba imati alkoholnu jakost najmanje 37,5 %. [10]

Rakija komovica je najveću primjenu našla u proizvodnji ostalih jakih alkoholnih pića poput travarice, orahovice te u proizvodnji domaćih likera gdje služi kao temeljna rakija. [11]

### **1.3 TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE**

Tehnološki postupak dobivanja rakije komovice uključuje određene korake čijom se pravilnom izvedbom može dobiti proizvod vrhunske kvalitete, a sastoji se od sljedećih operacija:

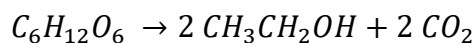
- ❖ berba grožđa,
- ❖ muljanje i cijedenje grožđa,
- ❖ alkoholna fermentacija,
- ❖ destilacija prevrele komine,
- ❖ odležavanje, dozrijevanje i završna obrada rakije.

### 1.3.1 Berba, muljanje i cijedenje grožđa

Berba grožđa se kod manjih proizvođača najčešće obavlja ručno što rezultira boljim očuvanjem plodova, ali je vremenski sporije nego mehanički način berbe. Stručnjaci smatraju da je kvaliteta svih rakija, pa tako i komovice, bolja ako se prilikom procesa muljanja i cijedenja grožđa odstrane peteljke, ali to nije nužno. Proces muljanja i odvajanja peteljki se obavlja pomoću muljače/runjače, a takvo izmuljano grožđe naziva se masulj, koji nakon toga ide na alkoholnu fermentaciju. [12]

### 1.3.2 Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija, koja često nosi naziv i alkoholno vrenje, je biokemijski proces gdje dolazi do mikrobiološkog pretvaranja monosaharida (fruktoza i glukoza) u alkohol etanol i ugljikov dioksid. Djelovanje mikroorganizama se u ovom slučaju pripisuje kvascima (rodovi *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Candida*, *Kloeckera*, *Schizosaccharomyces*, *Metschnikowia* i dr.) koji uz pomoć velikog broja enzima i idealnih uvjeta vrše transformaciju monosaharida. Prvu formulu alkoholnog vrenja dao je Gay-Lussac 1815. godine: [13]



Neprevrela (slatka) komina se stavlja u vrionik. Pritom je bitno da se vrionik ne napuni više od 70% ukupnog obujma jer se prilikom alkoholne fermentacije stvara ugljikov dioksid koji podiže dijelove komine prema vrhu. Prilikom pripreme neprevrele komine u svrhu proizvodnje rakije komovice nije potrebno dodavati hranu za kvasce, namještati kiselost same komine ili dodavati enzimske pripravke.

Sam proces alkoholne fermentacije uobičajeno traje 4-10 dana i prvenstveno ovisi o temperaturi unutar i van vrionika te o koncentraciji šećera u grožđu. Kraj fermentacije može se lako odrediti metodom mjerenja preostale koncentracije šećera pomoću moštne vage po Oechsleu, a fermentacija se smatra gotovom kada vrijednost iznosi od 0 do 3° Oe. [14]

### 1.3.3 Destilacija

Nakon uspješno provedene alkoholne fermentacije komine pristupa se procesu destilacije (pečenja) rakije. Svrha destilacije je odijeliti etilni alkohol i poželjne tvari arome od ostalih sastojaka. Obzirom da kvaliteta procesa destilacije ima najveći utjecaj na gotov proizvod, smatra se da je to najvažniji korak u tehnološkom procesu. [15]

Međutim, ni najbolje izvedene destilacije neće osigurati kvalitetan krajnji proizvod ako prethodno nije osigurana kvalitetna sirovina, a kasnije i prevrela komina. Sam proces destilacije predstavlja pretvaranje tekuće faze u parnu fazu procesom grijanja te zatim kondenziranja (ukapljivanja) parne faze u tekuću.

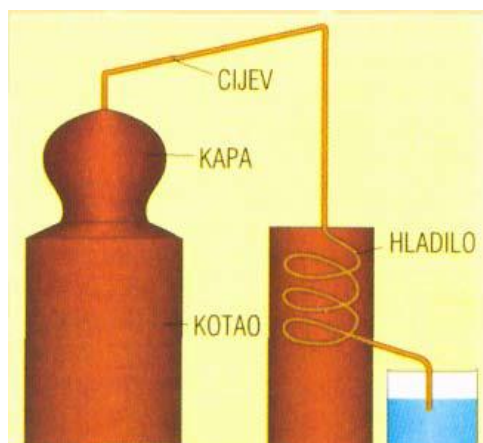
Osnovni sastojci komine koja je prevrela su uvijek voda i etanol (alkohol). Uzimajući u obzir temperature vrenja etanola i vode (etanol pri 78,3 °C, a voda pri 100 °C), pri zagrijavanju više isparava etanol u odnosu na vodu. Postepenim povećavanjem temperature destilacije isparavat će sve više vode, pa pretjerano zagrijavanje komine nije poželjno jer cilj je dobiti gotovi proizvod sa što većim sadržajem alkohola.

Tijekom destilacije osim vode i etanola dolazi do isparavanja i ostalih hlapljivih spojeva komine, poput acetaldehida i esteri octene kiseline. Sve hlapljive tvari kojima je temperatura vrelišta viša u odnosu na etanol, isparavaju kasnije (npr. patočno ulje). [16]

Provođenjem ponovljene (druge) destilacije moguće je odijeliti određene tvari u svrhu dobivanja kvalitetnog destilata prilikom čega kontrola temperature predstavlja glavni faktor. Postoji čitav niz uređaja za destilaciju jednostavne izvedbe (u narodu često nazvani kotlovi, kazani i dr.) koji se uglavnom razlikuju konstrukcijski.

Klasični jednostavni uređaj za destilaciju čija je shema prikazana na slici 3, čine kotao s dijelom za ložište i dijelom za destilaciju, gornji dio kotla (klobuk, kapa ili poklopac), cijev koja se proteže od klobuka do hladila te samo hladilo. [17]





**Slika 3.** Shematski prikaz jednostavnog (klasičnog) uređaja za destilaciju [18]

Iskustveno, u prosjeku od 100 kg prevrele komine dobivene od vina (jačine oko 10 % vol. alkohola) može se dobiti oko 13-14 litara rakije komovice alkoholne jakosti oko 45 % vol. Prevrelu kominu se preporuča destilirati nedugo nakon završene alkoholne fermentacije ili najkasnije 14 dana nakon završetka vrenja.

U slučaju da se prevrela komina ne podvrgne procesu destilacije odmah, može doći do gubitka alkohola i ostalih tvari arome pa samim time i gotovi proizvod ima lošiju kvalitetu. Proces destilacije može se vremenski odgoditi na način da se prevrela komina napuni u posude ili bačve te onemogućiti pristup zraku (kod kućnih izvedbi se stavlja najlon na kominu preko kojeg se stavlja sloj zemlje i pijeska). Onemogućavanjem pristupa zraku sprječava se mogućnost kvarenja prevrele komine uz uvjet da je kod predviđenog dugotrajnog ostavljanja komine, potrebno namjestiti pH vrijednost. [18]

Rakija komovica se skladišti u staklenim bocama prilikom čega aroma ostaje očuvana, a rakija bezbojna. Skladištenjem u hrastovim bačvama se može dobiti i aromatiziranija komovica prilikom čega rakija poprima i zlatno žutu boju. Obzirom da se komovica koristi najčešće kao baza za proizvodnju drugih jakih alkoholnih pića (likeri, travarica i dr.) preferiraju se komovice bez izraženih aroma i boje.

Tijekom procesa destilacije razlikuju se tri osnovne frakcije:

- ❖ prvi tok (prvijenac),
- ❖ drugi tok, srednja frakcija (srce),
- ❖ treći tok (patoka).

## PRVI TOK (prvijenac)

Prvi tok (prvijenac) je karakteriziran bijelom bojom, izraženog zamućenja, neugodnog i oštrog mirisa te niske koncentracije alkohola etanola. Obzirom da se u prvom toku većinski nalaze komponente koje imaju nisko vrelište, njihova prisutnost uzrokuje nepoželjnu boju i miris. U tu grupu komponenata spadaju ketoni, aldehidi, viši alkoholi, metanol i esteri (npr. etil-acetat).

Kako napreduje destilacija, a samim time i dolazi do povećanja temperature u kotlu, udio etanola se povećava, a koncentracija neželjenih tvari smanjuje pa mutnoća lagano nestaje. Alkoholna vrijednost prve frakcije iznosi oko 70-75 % vol. te se zbog svih loših karakteristika baca.

## DRUGI TOK, srednja frakcija (srce)

Srednji tok odlikuje čisti okus bez oštrog aroma uz voćne note što finalnom proizvodu donosi posebnost. Vrijeme skupljanja ove frakcije je duže u odnosu na ostale.

Znanje i iskustvo same osobe koja vrši destilaciju najviše dolazi do izražaja prilikom skupljanja srednje frakcije jer prisutnost prvijenca i patoke direktno utječe na kvalitetu gotovog proizvoda. Vrijednost alkoholne jakosti srednjeg toka se vremenski smanjuje od 60-75 % vol. do 40-45 % vol. [19]

## TREĆI TOK (patoka)

Pravovremenim prekidom skupljanja srednjeg toka u rakiju neće dospjeti tvari iz trećeg toka, tzv. patoke koju karakteriziraju viši alkoholi i esteri čija prisutnost donosi loš, neugodan i oštar karakter. Kiselij okus gotove rakije najčešće je zbog dospijeća tvari iz trećeg toka, poput hlapljivih kiselina koje mogu tokom skladištenja uzrokovati zamućenje.

U odnosu na prvi tok, treći tok se nakon prekida destilacije može skupiti te vratiti na ponovnu destilaciju prilikom čega se može dobiti 30-35 % drugog toka i na taj način povećati ukupna količina gotovog proizvoda. Kraj destilacije se određuje jednostavnim mjerenjem količine alkohola pomoću alkoholometra čija vrijednost treba iznositi nula ili kada temperatura dosegne 94 °C. [20]

## 1.4 LIKERI

Likeri pripadaju posebnoj grupi jakih alkoholnih pića, a osobina svih je da su proizvedeni od alkohola i šećernog sirupa. Početak proizvodnje likera datira iz srednjeg vijeka kada su uglavnom korišteni u medicinske svrhe, ali tijekom 19. stoljeća, zbog ugodnog okusa, konzumiraju se iz užitka. Ovisno o dodanim tvarima likeri mogu biti slatki (voćni likeri, aromatizirani likeri, likeri s dodanim voćnim aromama), gorki (dodavanjem gorkih ekstrakata određenih biljaka) i specijalni.

Najmanja količina šećera koju sadrži liker, izražena kao invertni šećer varira od vrste dodane tvari i njena vrijednost iznosi od 70 do 100 grama na litru likera. Propisana alkoholna jakost likera prilikom stavljanja na tržište mora iznositi najmanje 15 % vol., a ovisno o tehnološkom procesu i vrsti sirovine, odlaze na tržište kategorizirani kao voćni likeri, likeri od voćnog soka, biljni likeri, likeri od rakija, likeri od kave, čaja, kakaa, čokolade i cole, emulzijski likeri, aromatizirani likeri, likeri s vinom te ostali likeri. [21]

### LIMUN (*Citrus limon L.*)

Zbog svoje višestruke primjene, smatra se važnom biljkom u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Limun je također dekorativna zimzelena biljka koja pripada porodici Rutaceae. U prehrani se često dodaje za aromatiziranje u raznim proizvodima na način da se koža limuna struže ili reže. Najveću primjenu limun je našao u proizvodnji svježih sokova ili pića na bazi citrusa. [22]

Velika količina zaostale kore limuna nakon prerade smatra se bogatim izvorom fenola. U odnosu na ostale biljke, plodovi limuna (slika 4) sadrže obilje brojnih spojeva od kojih se ističu flavanoni, polimetoksilirani flavoni i flavanonski glikozidi. Osim navedenih, limun sadrži razne bioaktivne spojeve (limunska kiselina, hesperidin, diosmin, eriocitrin i D-limonen). [23]



**Slika 4.** Plodovi limuna (*Citrus limon L.*) [24]

### **MIRTA** (*Myrtus communis L.*)

Mirta je endemska voćna vrsta iz porodice mirta (Myrtaceae), karakteristična za područje Mediterana, a može se još pronaći na zapadu Azije. Godinama se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog raznih pozitivnih svojstava, pa se tako koristi u proizvodnji začina, pića, parfema. Stablo mirte je visine do 3 metra kojeg krasi sitni listovi tamnozeleno boje i okruglasti plodovi (slika 5) plave do crne boje (postoje vrste sa bijelim plodom). [25]

Jaki aromatični miris biljke se pripisuje plodovima koji su bogati eteričnim uljima. Zahvaljujući izvrsnim antioksidativnim svojstvima, stručnjaci preporučuju korištenje mirte (ekstrakta ploda) u prehrambene i medicinske svrhe. Od spojeva koji čine kemijski sastav, najinteresantnije su organske kiseline, fenolni spojevi, antocijani i flavonoidi. [26]

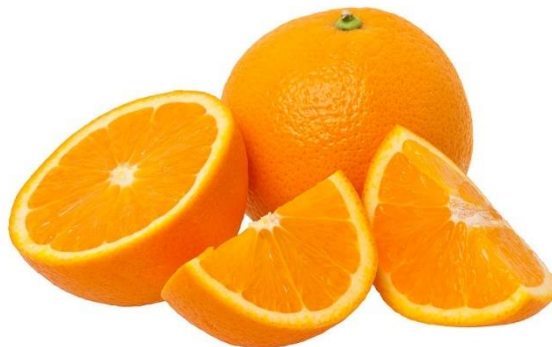


**Slika 5.** Plodovi mirte (*Myrtus communis L.*) [25]

## NARANČA (*Citrus sinensis* L.)

Slatka naranča iz porodice Rutaceae spada u biljke kojima najviše odgovara tropska i suptropska klima pa se najviše uzgajaju u Južnoj Africi (Brazil), Kaliforniji i Sredozemlju. Stablo može narasti do visine od 12 metara i godišnje proizvesti oko 500 plodova zbog čega se naranča svrstava u jednu od najplodnijih vrsta voća uz bananu i grožđe. Plod naranče (slika 6) je prepoznatljive narančaste boje, a čine ga kora, parenhimski mezokarp te meso sa sokom. Plodovi se koriste u prehranbene, medicinske i kozmetičke svrhe. [27]

Kemijski sastav naranče karakterizira prisustvo antioksidativnih spojeva poput askorbinske kiseline (vitamin C) i fenolnih spojeva (narirutin, hesperidin i naringin). Od organskih kiselina najzastupljenija je limunska kiselina te jantarna i jabučna. [28]



*Slika 6. Plodovi naranče (Citrus sinensis L.) [29]*

### 1.5 SPOJEVI AROME JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA

Berbom sirovine odličnih svojstava, provođenjem pravilnog gnječenja grožđa, izvedbom pravilne alkoholne fermentacije, načinom destilacije te kvalitetnim dozrijevanjem destilata može se očekivati krajnji proizvod vrhunskog kemijskog sastava uz specifična senzorska svojstva rakije. U procesu alkoholnog vrenja nastaju razni produkti djelovanja mikroorganizama koji se destilacijom izdvajaju te uvelike utječu na

senzorska svojstva destilata. Sve te komponente arome mogu se razvrstati u sljedeće skupine:

- ❖ komponente primarne arome,
- ❖ komponente sekundarne arome,
- ❖ tvari arome nastale tijekom destilacije,
- ❖ tvari arome nastale tijekom dozrijevanja.

Smatra se da su najzastupljeniji spojevi u jakim alkoholnim pićima iz grupe estera, viših alkohola, hlapljivih kiselina i aldehida. [30]

#### 1.5.1 Komponente primarne arome

Prisutnost ovih spojeva se pripisuje početnoj sirovini u kojoj se stvaraju zahvaljujući sekundarnom metabolizmu biljke koji se odvija pod djelovanjem enzima u fazama zrenja i rasta biljnog tkiva. U procesu proizvodnje rakija od voća, cilj je spojeve primarne arome sačuvati u što većoj mjeri i na taj način osigurati voćnu aromu u destilatu. Terpeni i fenoli se smatraju važnim spojevima primarne arome i nositelji su poželjnog cvjetnog mirisa. Količina prisutnog alkohola metanola ovisi o enzimskoj razgradnji pektina jer tu nastaje kao produkt, a zbog velike topljivosti u vodi nema značajan utjecaj na aromu rakije. [31]

#### 1.5.2 Komponente sekundarne arome

U procesu alkoholne fermentacije nastaju razni kemijski spojevi koji određuju profil sekundarnih aroma. Glavnim skupinama koje grade sekundarnu aromu se smatraju esteri i viši alkoholi. Etil-acetat i etil-laktat te etilni esteri masnih kiselina smatraju se glavnim esterima iz voćnih rakija. Obzirom da veliki broj prisutnih estera u rakiji ima nisku točku vrenja, njihova koncentracija može se kontrolirati pravilnom destilacijom na način da se smanji ili poveća vrijeme skupljanja prve frakcije. [32]

Najzastupljenijom grupom kemijskih spojeva u jakim alkoholnim pićima smatraju se alkoholi koji u strukturi sadrže više od 2 atoma. Obzirom da visoka koncentracija viših

alkohola u destilatu ima negativan, a niska koncentracija pozitivan utjecaj, njihova količina će uvelike odrediti aromatični profil gotovog proizvoda. Od alkohola su najvažniji propan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-feniletanol i 3-metilbutan-1-ol.

Osim viših alkohola i estera, kao produkti alkoholne fermentacije također nastaju aldehidi (acetaldehid), ketoni, kiseline (octena, laurinska, kaprinska i kaprilna) i terpeni (linalool, nerol, geraniol, citronelol i  $\alpha$ -terpineol).

### 1.5.3 Tvari arome nastale tijekom destilacije

Vrijeme kada će destilacija biti izvedena ima veliki utjecaj na konačni profil aromatičnih spojeva u gotovom proizvodu jer odgođenom destilacijom može doći do povećanja koncentracije kiselina, estera, metanola, aldehida i ostalih loših komponenti. U samom procesu destilacije često nastaju novi spojevi poput heterocikličkih spojeva, furfurala i spojeva koji sadrže sumpor. Moguće su i reakcije između aldehida i alkohola pa kao produkt nastaju tvari koje imaju pozitivan utjecaj na ukupni profil arome. [32]

### 1.5.4 Tvari arome nastale tijekom dozrijevanja

Kao u proizvodnji svih alkoholnih pića, tako i u proizvodnji rakija veliki utjecaj na ukupnu aromu ima vrijeme i način dozrijevanja alkohola u za to predviđenim posudama (hrastove bačve). Tokom odležavanja rakije dolazi do interakcije između drveta i destilata pri čemu se stvaraju novi spojevi, a razgrađuju već prisutni. Istraživanja pokazuju da 60 % svih aromatičnih tvari koje se nalaze u gotovom proizvodu potječu iz hrastove bačve tj. drveta. Kao bitni spojevi smatraju se aromatični aldehidi, siringin i vanilin te produkti esterifikacije i oksidacije. [32]

## 1.6 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

Razvojem novih tehnika i metoda u svrhu izoliranja hlapljivih spojeva, nastaju tehnike u kojima se koriste jednostavne aparature visoke učinkovitosti. Cilj bilo koje metode izolacije hlapljivih spojeva je odrediti kemijski profil određenog proizvoda čime se dokazuje porijeklo samog proizvoda te otkriti moguće dodane tvari tijekom proizvodnje. [33]

### 1.6.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

Ovu metodu izolacije hlapljivih spojeva je otkrio Janusz Pawliszyn i suradnici 1989. godine. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) spada u vrlo jednostavnu i učinkovitu sorpcijsku tehniku koja se prvenstveno koristi u svrhu izoliranja aromatičnih spojeva. Često se koristi zajedno sa vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa.

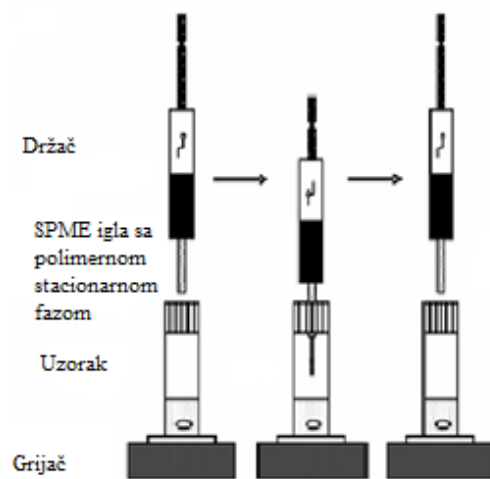
Jednostavnost ove tehnike leži u integraciji više koraka (uzorkovanje, ekstrakcija i koncentriranje) u jedan korak uz određene prednosti (ne koristi se otapalo). Sam proces ekstrakcije hlapljivih spojeva iz uzorka se događa upotrebom raznih silikonskih vlakana koja mogu biti različite polarnosti, polarni, nepolarna i miješana. [34]

Uloga vlakna je adsorbirati i koncentrirati organske spojeve iz uzorka. Odabir vrste vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije, pa se polarni spojevi izoliraju pomoću polarnog vlakna, a nepolarni pomoću nepolarnog vlakna. Koliko će se spojeva ekstrahirati, ovisi ne samo o vrsti vlakna nego i o vremenu ekstrakcije te o zasićenosti uzorka hlapljivim spojevima. Prije same upotrebe, vlakno je potrebno kondicionirati pomoću visoke temperature u vremenu od 0,5 do 4 sata.

Sama izolacija se izvodi tako da se uzorak smjesti u posebnu posudicu, zatvori septom i zagrijava prilikom čega dolazi stvaranja vršnih para u prostoru iznad uzorka. Nakon toga se vlakno koje se nalazi u sklopu igle postavljene u SPME držač (slika 7), ubacuje u prostor vršnih para probijanjem septuma bočice iglom. Kada je igla ušla u prostor vršnih para, pritiskom na klip izbacuje se vlakno te započinje adsorpcija hlapljivih



spojeva. Nakon točno određenog vremena adsorpcije, vlakno se uvlači nazad u iglu i prenosi na desorpciju u injektor plinskog kromatografa.



*Slika 7. Prikaz uređaja za HS-SPME [35]*

Nedostatak ove tehnike je što količina hlapljivih spojeva ovisi o vrsti, dužini i debljini vlakna te o temperaturi i vremenu uzorkovanja. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi osim navedenih nedostataka, ima i određene prednosti u odnosu na ostale tehnike ekstrakcije, a to su:

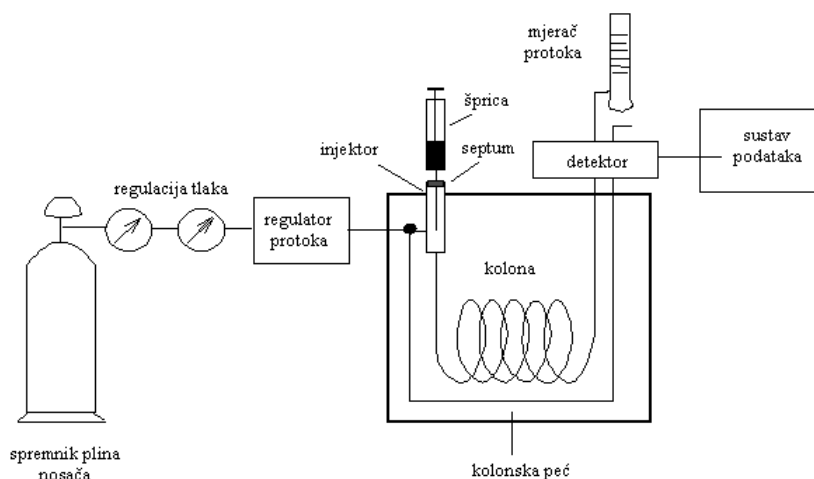
- ❖ jednostavnost i brzina izolacije,
- ❖ ponovljivost,
- ❖ stabilnost vlakana,
- ❖ nije potrebno otapalo,
- ❖ visoka osjetljivost,
- ❖ potreban mali volumen uzorka,
- ❖ niska cijena analize. [36]

## 1.7 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Nakon provedene izolacije hlapljivih spojeva iz uzorka, potrebno je provesti analizu s ciljem dobivanja kemijskog profila i to se najčešće izvodi pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Analiza hlapljivih spojeva podrazumijeva kvalitativnu analizu (identifikacija pojedinih sastojaka smjese) te kvantitativnu analizu (određivanje udjela identificiranih sastojaka smjese). [37]

### 1.7.1 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je fizikalna metoda odvajanja komponenti koju su prvi put koristili Anthony T. James i Archer J. P. Martin 1950-tih godina. Smatra se najčešće korištenom tehnikom za odjeljivanje hlapljivih spojeva, a izvodi se u plinskom kromatografu (slika 8). Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone, detektora, pojačala i pisara (računalo). U plinskom kromatografu postoje dvije faze od kojih je jedna stacionarna (selektivna tekućina ili krutina), a druga mobilna i ima svoj put gibanja (inertni plin). [38]



*Slika 8. Shematski prikaz uređaja za plinsku kromatografiju [39]*

Proces izvođenja plinske kromatografije započinje automatskim ili ručnim ubacivanjem uzorka u injektor gdje dolazi do isparavanja uzorka i njegovog prenošenja u kolonu uz pomoć plina nosioca (Ar, He, N<sub>2</sub> ili H). Plin nosioc se skladišti u cilindrima i bocama za plin pod pritiskom te je njihova čistoća od velike važnosti jer utječe na kvalitetu analize.

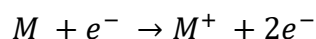
Tijekom analize, određene komponentne smjese imaju različiti koeficijent razdvajanja zbog različite polarnosti i hlapljivosti, pa imaju različite brzine gibanja kroz kolonu. Nakon prolaska kroz kolonu, plin i analit odlaze na detekciju preko detektora koji očitava neko fizikalno-kemijsko svojstvo analita (promjena vodljivosti plina nosioca). Postoje razne izvedbe detektora, a to su:

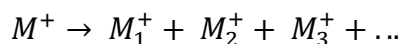
- ❖ plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID),
- ❖ plamenofotometrijski detektor (engl. *Flame Photometric Detector*, FPD),
- ❖ fotoionizacijski detektor (engl. *Photo-ionization Detector*, PID),
- ❖ detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD),
- ❖ detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, FPD),

Nastankom očitnog električnog signala, računalo ga prihvaća i pretvara u digitalni oblik te ga prikazuje kao kromatogram. Mogućnost razdvajanja komponenti u složenim smjesama u visokom postotku efikasnosti i prihvatljivom vremenu te preciznim rezultatima svrstava plinsku kromatografiju u najkorištenije metode analize kemijskih smjesa. [40]

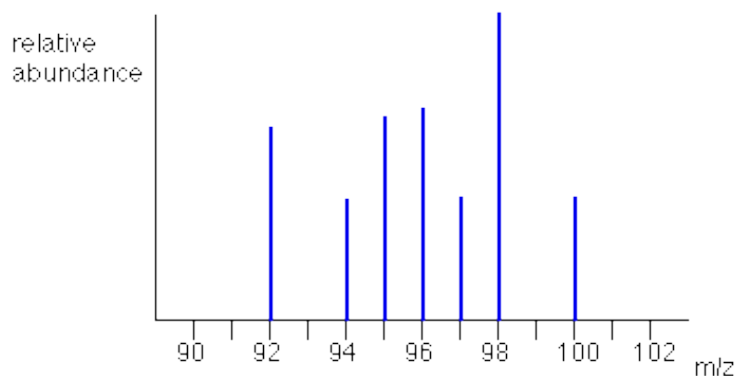
### 1.7.2 Spektrometrija masa

Spektrometrija masa spada u analitičku tehniku u kojoj dolazi do ioniziranja molekula, a zatim do razdvajanja nastalih iona prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja. Ova tehnika pruža najveći broj podataka potrebnih za identifikaciju i određivanje strukture složenih organskih spojeva. Izvođenje ove metode uključuje dva koraka, a to su ionizacija uzorka te razdvajanje i određivanje iona. U koraku ionizacije uzorka dolazi do bombardiranja uzorka s elektronima velike energije pri čemu nastaje pozitivni ion M<sup>+</sup> koji se fragmentira prema sljedećoj formuli:





Na prikazani način nastaju razni fragmenti koji se naknadnom analizom identificiraju i na taj način daju mogućnost određivanja kemijske strukture spoja te koliko iznosi njegova molekulska masa. Nastali ioni odlaze u analizator na razvrstavanje prema intenzitetu i omjeru mase i naboja,  $m/z$ , a analizator ih registrira u obliku električnog signala. Na taj način se dobiva spektar masa koji se prikazuje u obliku linijskog dijagrama (slika 9) s odnosom omjera mase i naboja fragmenta ( $m/z$ ) te relativnog intenziteta. [41]



**Slika 9.** Dijagram spektra masa [42]

### 1.7.3 Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) se koristi u svrhu analiziranja smjesa hlapljivih spojeva. Dobivanje velikog broja podataka iz male količine uzorka predstavlja glavnu prednost ove metode analize. Pomoću plinskog kromatografa postiže se vrhunsko odjeljivanje i kvantizacija, ali je kvalitativna analiza nesigurna u čemu je spektrometrija masa gotovo savršena. [43]

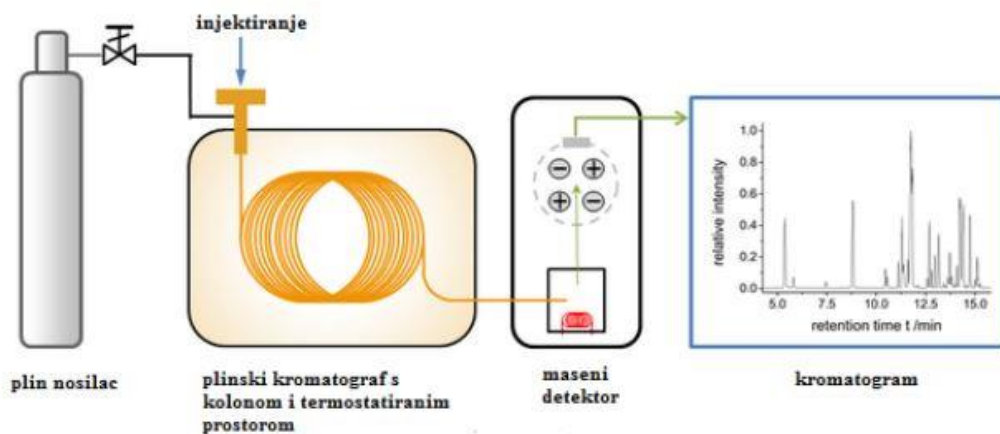
Obzirom na odlično nadopunjavanje plinske kromatografije i spektrometrije masa, njihovim kombiniranjem dobiva se odlična instrumentalna metoda za analiziranje smjesa hlapljivih spojeva.

Prvi dio analize se svodi na odjeljivanje sastojaka smjese u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa, dok u drugom dijelu odijeljeni sastojci odlaze u detektor

(spektrometar masa) koji će detektirati potpuno (sve fragmente) ili selektivno (određeni fragmenti). Kada spektrometar masa obavi analizu, računalo uz pomoć baze podataka vrši usporedbu dobivenih spektara masa na osnovu slaganja u postotku te obavlja identifikaciju spojeva. [44]

Glavne komponente GC-MS uređaja (slika 10) su:

- ❖ boca s plinom nositeljem,
- ❖ injektor,
- ❖ kromatografska kolona (peć),
- ❖ detektor (spektrometar masa),
- ❖ računalo. [33]



*Slika 10. Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa [45]*

## **2. *EKSPERIMENTALNI DIO***

## 2.1 UZORCI LIKERA

U svrhu izolacije hlapljivih spojeva korištena su 3 različita likera:

- ❖ Domaći liker od limuna (slika 11)
  - Sastojci – limun, šećer, rakija komovača,
  - Alkoholna jakost – 16,8 % vol.,
  - Neto – 200 mL,
  - Godina proizvodnje – 2016.,
- ❖ Domaći liker od mirte (slika 12)
  - Sastojci – mirta, šećer, rakija komovača,
  - Alkoholna jakost – 16 % vol.,
  - Neto – 200 mL,
  - Godina proizvodnje – 2016.,
- ❖ Domaći liker od naranče (slika 13)
  - Sastojci – naranča, šećer, rakija komovača,
  - Alkoholna jakost – 21 % vol.,
  - Neto – 200 mL,
  - Godina proizvodnje – 2016.,

Proizvodi i puni – OPG Darinka Krnčević, Prijatelj Lastova



*Slika 11. Liker od limuna*



*Slika 12. Liker od mirte*



*Slika 13. Liker od naranče*

## 2.2 APARATURA

Tijekom izvođenja ovog eksperimentalnog rada korištena je sljedeća aparatura:

- ❖ Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)
  - Vodena kupelj s termostatom – Heidolph EKT 3001, Njemačka,
  - Držač za mikroekstrakciju vršnih para – Supelco Co., SAD,
  - Plavo vlakno dužine 5 cm s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) – Supelco Co., SAD,
  - Pink vlakno dužine 5 cm s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) – Supelco Co., SAD.
- ❖ Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)
  - GC 7820A – Agilent Technologies, SAD,
  - MSD 5977E – Agilent Technologies, SAD,
  - GC kapilarna kolona HP-SMS, J&W, SAD.

## 2.3 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Hlapljivi i poluhlapljivi spojevi iz uzoraka domaćih likera izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći „plavo“ i „pink“ vlakno. Nakon procesa izolacije, slijedi proces analiziranja izoliranih spojeva pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Proces mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) je proveden u sljedeća četiri koraka:

- ❖ Kondicioniranje vlakna – prije korištenja vlakna, potrebno ga je aktivirati kondicioniranjem, a to se radi tako da se SPME igla u kojoj je vlakno postavi u injektor plinskog kromatografa na temperaturu od 250 °C u vremenskom periodu od 30 minuta. Vlakno je nakon procesa kondicioniranja spremno za ekstrakciju vršnih para uzorka (slika 14).





*Slika 14. Plavo vlakno s ovojnicom PDMS/DVB [46]*

- ❖ Priprema uzorka – potrebno je staviti 5 mL uzorka likera u specifičnu staklenu bočicu koja ima volumen od 15 mL. Nakon stavljanja uzorka, vrh bočice se hermetički zatvara PTFE/silikon septom te se tako zatvorena bočica postavlja u vodenu kupelj na 60 °C uz konstantno miješanje uz pomoć magnetske miješalice. Korištena aparatura je prikazana na slici 15.
- ❖ Ekstrakcija vršnih para – nakon pravilno izvedene pripreme uzorka i kondicioniranja vlakna slijedi adsorpcija hlapljivih spojeva iz uzorka. SPME igla se probijanjem septe uvodi u bočicu s uzorkom te izbacivanjem vlakna započinje proces adsorpcije spojeva koji traje 40 minuta.
- ❖ Desorpcija i analiza – nakon uzorkovanja, vlakno se uvlači iglu te se SPME igla uvodi u GC-MS injektor. Proces desorpcije se odvija na 250 °C u vremenskom periodu od 7 minuta. Ubacivanje SPME igle u GC-MS se obavilo ručno uz pomoć držača za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).



*Slika 15. Aparatura korištena u pripremi uzorka [46]*

## 2.4 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Nakon izolacije spojeva tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi slijedi analiza uzorka pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). U tu svrhu je korišten plinski kromatograf Agilent Technologies (model 7820A, SAD) u kombinaciji s masenim spektrometrom Agilent Technologies (model 5977E, SAD). U sklopu ovog vezanog sustava nalazi se i računalo, slika 16.



*Slika 16. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa u Zavodu za organsku kemiju KTF-a (GC-MS)*

Karakteristike kolone plinskog kromatografa (HP-5MS nepolarna kapilarna kolona):

- ❖ Promjer – 0,25 mm,
- ❖ Duljina – 30 m,
- ❖ Stacionarna faza – (5 % fenil)-metilpolisiloksan,
- ❖ Debljina sloja stacionarne faze – 0,20  $\mu\text{m}$ .

Plinski kromatograf (GC) – uvjeti rada:

- ❖ Postavljena početna radna temperatura iznosi 70 °C u vremenskom periodu od 2 min, a zatim započinje konstantan rast temperature u iznosu od 3 °C po minuti sve do krajnje temperature od 200 °C,
- ❖ Temperatura plinskog injektora – 250 °C, *splitless mode*,
- ❖ „*solvent delay*“ (vrijeme izlaska otapala pa se spektar ne snima) – 3 minute,
- ❖ Količina injektiranog uzorka – 1 µL,
- ❖ Protok mobilne faze (helij) – 1 mL/min.

Spektrometar masa (MS) – uvjeti rada:

- ❖ Temperatura detektora – 280 °C,
- ❖ Interval snimanja spektra masa – 30-300 masenih jedinica,
- ❖ Energija ionizacije – 70 eV.

Nakon provedene analize hlapljivih spojeva pomoću plinskog kromatografa-spektrometra masa, za svaki analizirani uzorak dobivaju se rezultati u obliku:

- ❖ Kromatogram ukupne ionske struje,
- ❖ Pik na kromatogramu koji predstavlja vrijeme zadržavanja svake komponente
- ❖ Udio površine pojedinog pika u ukupnoj površini kromatograma koji predstavlja relativni udio pojedine komponente (izraženo u postotcima),
- ❖ Naziv spoja ili spojeva iz baze podataka čiji se spektar najviše poklapa spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje (izraženo u postotcima).

Identifikacija svih dobivenih pojedinačnih komponenti provedena je tehnikom usporedbe njihovih masenih spektara s masenim spektrima pohranjenim u komercijalnoj biblioteci masenih spektara (Wiley 9 MS library i NIST14) uz mogućnost korištenja druge literature.

### **3.     *REZULTATI***

Rezultati analiza uzoraka domaćih likera od limun, mirte i naranče pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa, prikazani su tablično i u obliku kromatograma.

**Tablica 1.** *Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku domaćeg likera od limuna, izoliranih HS-SPME metodom korištenjem plavog vlakna*

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>1.</b>	<900	etil-acetat	3,6
<b>2.</b>	<900	2-metilpropan-1-ol	1,2
<b>3.</b>	<900	3-metilbutan-1-ol	10,2
<b>4.</b>	<900	2-metilbutan-1-ol	3,3
<b>5.</b>	1023	$\alpha$ -terpinen	2,6
<b>6.</b>	1031	<i>p</i> -cimen	2,1
<b>7.</b>	1035	limonen	5,1
<b>8.</b>	1039	1,8-cineol	3,9
<b>9.</b>	1065	$\gamma$ -terpinen	1,1
<b>10.</b>	1103	linalol	1,0
<b>11.</b>	1122	2-feniletanol	6,8
<b>12.</b>	1172	borneol	2,5
<b>13.</b>	1182	4-terpineol	19,2
<b>14.</b>	1194	$\alpha$ -terpineol	23,2
<b>15.</b>	1242	( <i>Z</i> )-citral	2,5
<b>16.</b>	1258	<i>cis</i> -piperiton-oksid	1,0
<b>17.</b>	1273	( <i>E</i> )-citral	1,5
<b>18.</b>	1992	etil-heksadekanoat	1,2
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b><i>91,0%</i></b>

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku domaćeg likera od limuna, izoliranih HS-SPME metodom korištenjem pink vlakna

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	3-metilbutan-1-ol	5,7
2.	<900	2-metilbutan-1-ol	3,1
3.	1035	limonen	3,7
4.	1039	1,8-cineol	3,4
5.	1103	linalol	1,0
6.	1122	2-feniletanol	6,2
7.	1172	borneol	2,4
8.	1182	4-terpineol	18,4
9.	1194	$\alpha$ -terpineol	23,8
10.	1242	(Z)-citral	1,6
11.	1258	cis-piperiton-oksidi	0,9
12.	1273	(E)-citral	1,5
13.	1593	etil-dodekanoat	3,8
14.	1992	etil-heksadekanoat	16,6
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>92,1%</b>

**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku domaćeg likera od mirte, izoliranih HS-SPME metodom korištenjem plavog vlakna

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	etil-acetat	4,2
2.	<900	2-metilpropan-1-ol	7,0
3.	<900	3-metilbutan-1-ol	56,5
4.	1039	1,8-cineol	23,4

5.	1122	2-feniletanol	1,1
6.	1207	mirtenol	3,1
7.	1335	mirtenil-acetat	3,1
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>98,4%</b>

**Tablica 4.** *Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku domaćeg likera od mirte, izoliranih HS-SPME metodom korištenjem pink vlakna*

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	3-metilbutan-1-ol	15,2
2.	<900	2-metilbutan-1-ol	7,7
3.	1039	1,8-cineol	53,3
4.	1122	2-feniletanol	3,8
5.	1181	dietil-sukcinat	1,1
6.	1198	mirtenal	2,9
7.	1207	mirtenol	7,9
8.	1335	mirtenil-acetat	5,2
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>97,1%</b>

**Tablica 5.** *Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku domaćeg likera od naranče, izoliranih HS-SPME metodom korištenjem plavog vlakna*

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	etil-acetat	7,1
2.	<900	2-metilpropan-1-ol	2,1

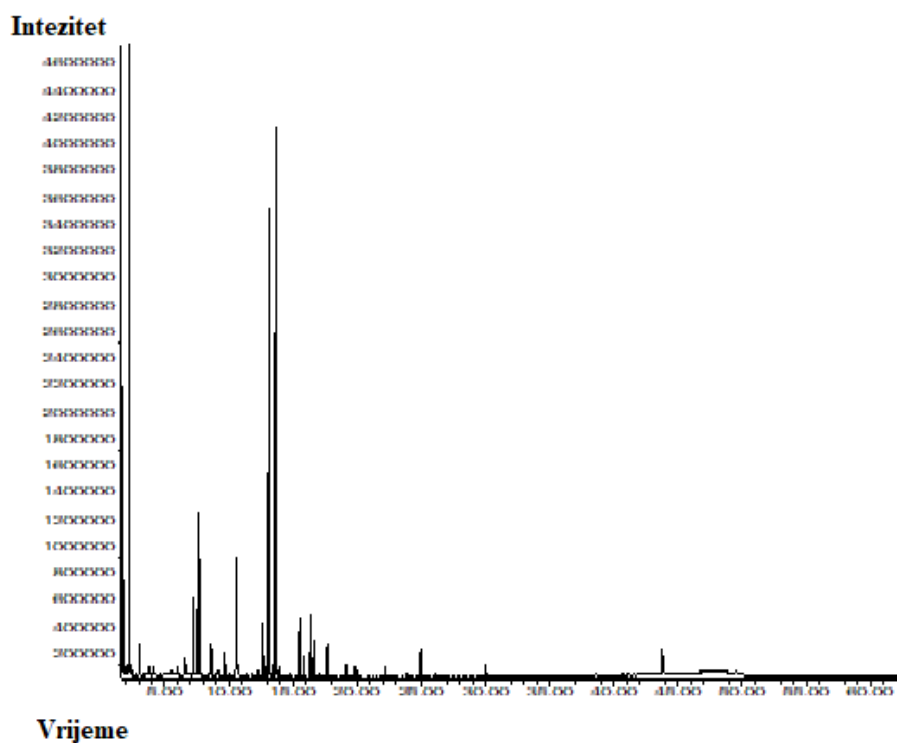
3.	<900	3-metilbutan-1-ol	30,1
4.	<900	2-metilbutan-1-ol	6,4
5.	<900	izoamil-acetat	4,3
6.	988	etil-heksanoat	4,4
7.	1031	<i>p</i> -cimen	1,4
8.	1035	limonen	5,8
9.	1039	1,8-cineol	7,1
10.	1122	2-feniletanol	3,6
11.	1182	4-terpineol	10,7
12.	1194	$\alpha$ -terpineol	10,7
13.	1196	etil-oktanoat	2,1
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>95,8%</b>

**Tablica 6.** *Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku domaćeg likera od naranče, izoliranih HS-SPME metodom korištenjem pink vlakna*

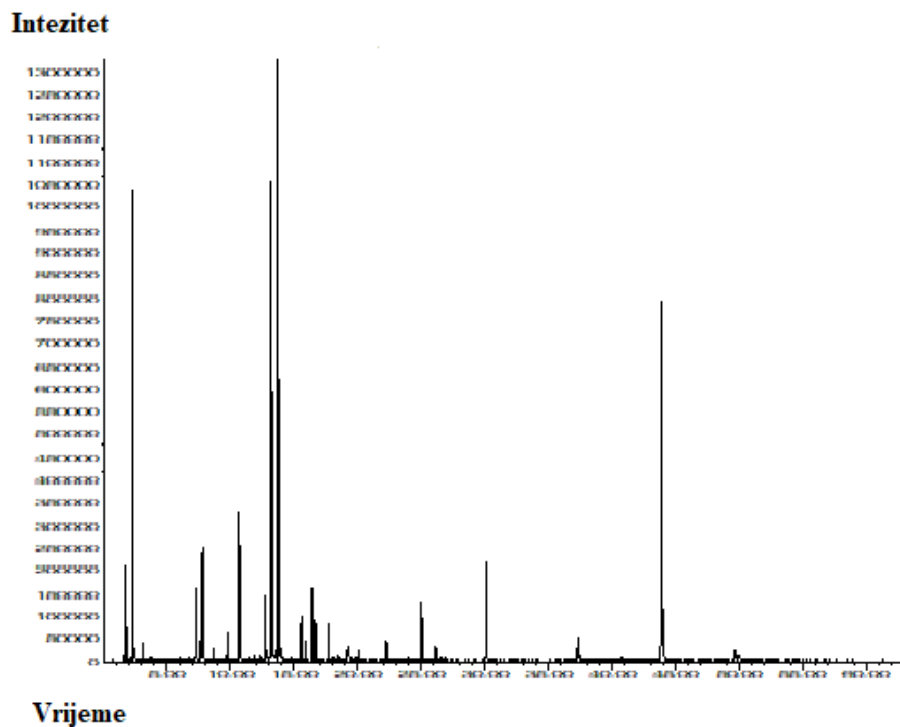
<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	etil-acetat	1,9
2.	<900	3-metilbutan-1-ol	14,3
3.	<900	2-metilbutan-1-ol	7,3
4.	<900	izoamil-acetat	1,8
5.	988	etil-heksanoat	1,9
6.	1035	limonen	1,0
7.	1039	1,8-cineol	5,5
8.	1122	2-feniletanol	6,7
9.	1172	borneol	1,3
10.	1182	4-terpineol	10,7



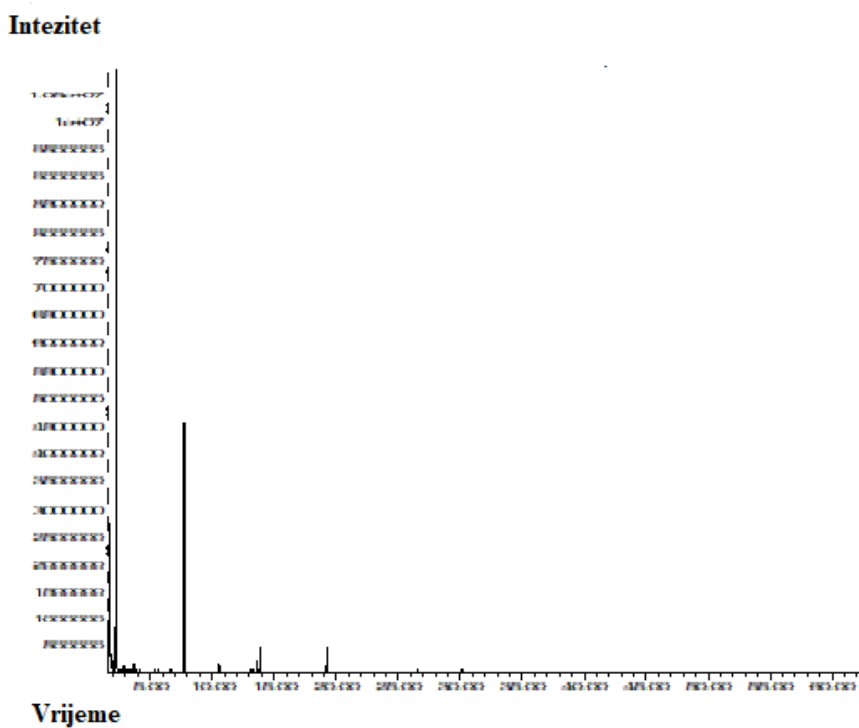
11.	1194	$\alpha$ -terpineol	15,2
12.	1196	etil-oktanoat	1,0
13.	1992	etil-heksadekanoat	26,1
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>94,7%</b>



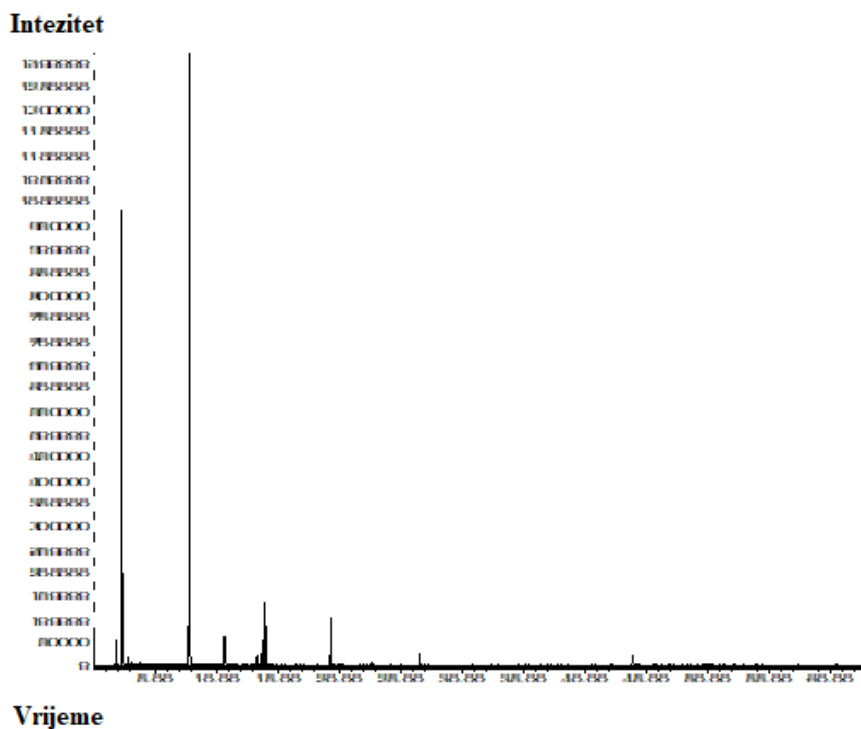
*Slika 17. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva domaćeg likera od limuna izoliranih pomoću HS-SPME korištenjem plavog vlakna*



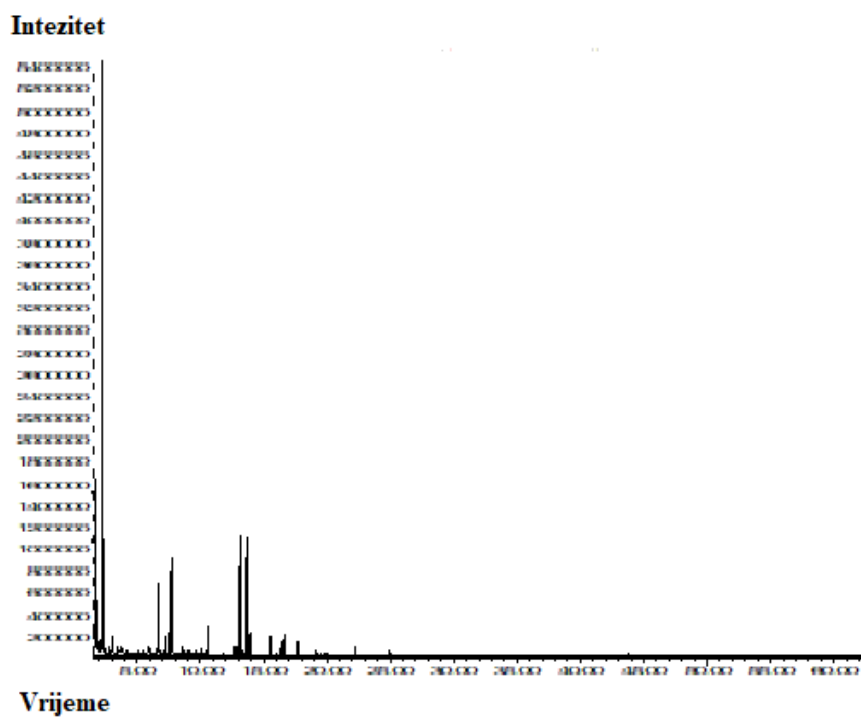
*Slika 18. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva domaćeg likera od limuna izoliranih pomoću HS-SPME korištenjem pink vlakna*



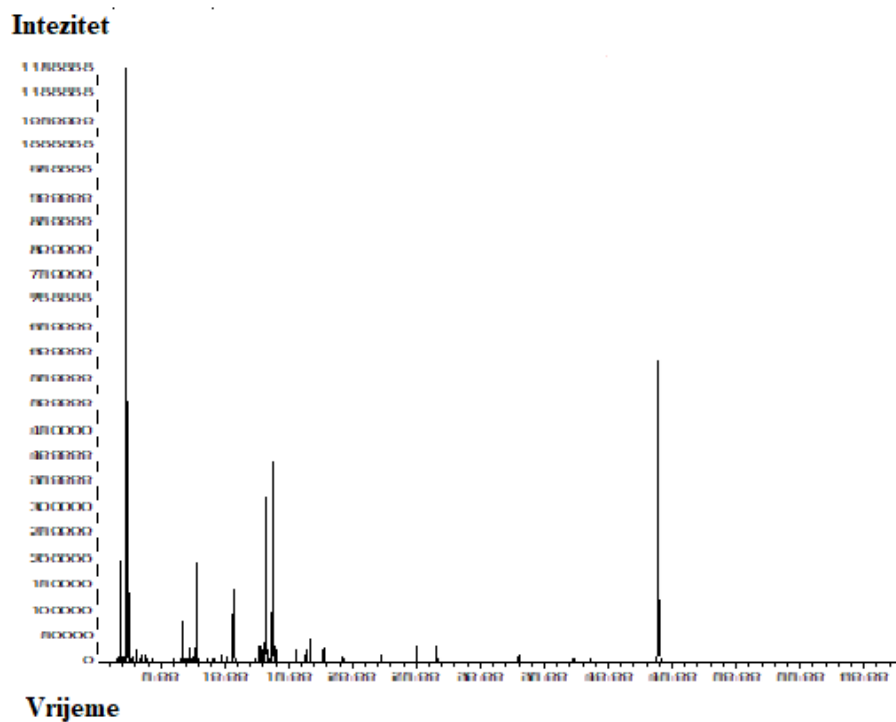
*Slika 19. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva domaćeg likera od mirte izoliranih pomoću HS-SPME korištenjem plavog vlakna*



*Slika 20. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva domaćeg likera od mirte izoliranih pomoću HS-SPME korištenjem pink vlakna*



*Slika 21. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva domaćeg likera od naranče izoliranih pomoću HS-SPME korištenjem plavog vlakna*



*Slika 22. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva domaćeg likera od naranče izoliranih pomoću HS-SPME korištenjem pink vlakna*

#### **4. RASPRAVA**

Kvaliteta prehrambenih proizvoda proizlazi iz kvalitete primarnih sirovina za proizvodnju, načina na koji je proizvod dobiven, ali i o podneblju u kojem su rasle primarne sirovine za proizvodnju. U ovom diplomskom radu su analizirani hlapljivi spojevi izolirani iz uzoraka domaćih likera od limuna, mirte i naranče s ciljem utvrđivanja kemijskog sastava hlapljivih spojeva te identifikacije mogućih karakterističnih spojeva koji potvrđuju prisutnost maceriranog bilja unutar likera.

Obzirom da je proces dobivanja ovakve vrste alkoholnog pića vrlo zahtjevan i osjetljiv u mnogim fazama tehnološkog postupka proizvodnje, kemijski profil hlapljivih spojeva gotovog proizvoda itekako ovisi o svim koracima proizvodnje.

Za izolaciju hlapljivih spojeva, korištena je metoda mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći plavo (PDMS/DVB) i pink vlakno (PDMS/DVB). Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu korišten je vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

#### **4.1 HLAPLJIVI SPOJEVI UZORAKA IZOLIRANI HS-SPME METODOM**

Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći oba vlakna u svim uzorcima je izolirano ukupno 26 spojeva. Pogledom na rezultate analize u tablicama 1 - 6 može se vidjeti da su izolirani sljedeći spojevi:

U vršnim parama domaćeg likera od limuna izoliranim korištenjem plavog vlakna identificirano je 18 spojeva (tablica 1), što predstavlja 69,2 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni spoj identificiran u ovom uzorku je  $\alpha$ -terpineol (23,2 %). Ostali spojevi koji su izolirani su: 4-terpineol (19,2 %), 3-metilbutan-1-ol (10,2 %), 2-feniletanol (6,8 %), limonen (5,1 %), 1,8-cineol (3,9 %), etil-acetat (3,6 %), 2-metilbutan-1-ol (3,3 %),  $\alpha$ -terpinen (2,6 %), borneol (2,5 %), (*Z*)-citral (2,5 %), *p*-cimen (2,1 %), (*E*)-citral (1,5 %), etil-heksadekanoat (1,2 %), 2-metilpropan-1-ol (1,2 %),  $\gamma$ -terpinen (1,1 %), *cis*-piperiton oksid (1,0 %) te linalol (1,0 %).

U vršnim parama domaćeg likera od limuna izoliranim korištenjem pink vlakna identificirano je 14 spojeva (tablica 2), što predstavlja 53,8 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni spoj identificiran u ovom uzorku je  $\alpha$ -terpineol (23,8 %). Ostali spojevi koji su izolirani su: 4-terpineol (18,4 %), etil-heksadekanoat (16,6 %), 2-

feniletanol (6,2 %), 3-metilbutan-1-ol (5,7 %), etil-dodekanoat (3,8 %), limonen (3,7 %), 1,8-cineol (3,4 %), 2-metilbutan-1-ol (3,1 %), borneol (2,4 %), (Z)-citral (1,6 %), (E)-citral (1,5 %), linalol (1,0 %) te *cis*-piperiton oksid (0,9 %).

U vršnim parama domaćeg likera od mirte izoliranim korištenjem plavog vlakna identificirano je 7 spojeva (tablica 3), što predstavlja 26,9 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni spoj identificiran u ovom uzorku je 3-metilbutan-1-ol (56,5 %). Ostali spojevi koji su izolirani su: 1,8-cineol (23,4 %), 2-metilpropan-1-ol (7,0 %), etil-acetat (4,2 %), mirtenil-acetat (3,1 %), mirtenol (3,1 %) te 2-feniletanol (1,1 %).

U vršnim parama domaćeg likera od mirte izoliranim korištenjem pink vlakna identificirano je 8 spojeva (tablica 4), što predstavlja 30,8 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni spoj identificiran u ovom uzorku je 1,8-cineol (53,3 %). Ostali spojevi koji su izolirani su: 3-metilbutan-1-ol (15,2 %), mirtenol (7,9 %), 2-metilbutan-1-ol (7,7 %), mirtenil-acetat (5,2 %), 2-feniletanol (3,8 %), mirtenal (2,9 %) te dietil-sukcinat (1,1 %).

U vršnim parama domaćeg likera od naranče izoliranim korištenjem plavog vlakna identificirano je 13 spojeva (tablica 5), što predstavlja 50 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni spoj identificiran u ovom uzorku je 3-metilbutan-1-ol (30,1 %). Ostali spojevi koji su izolirani su:  $\alpha$ -terpineol (10,7 %), 4-terpineol (10,7 %), etil-acetat (7,1), 1,8-cineol (7,1 %), 2-metilbutan-1-ol (6,4 %), limonen (5,8 %), etil-heksanoat (4,4 %), izoamil-acetat (4,3 %), 2-feniletanol (3,6 %), etil-oktanoat (2,1 %), 2-metilpropan-1-ol (2,1 %) te *p*-cimen (1,4 %).

U vršnim parama domaćeg likera od naranče izoliranim korištenjem pink vlakna identificirano je 13 spojeva (tablica 6), što predstavlja 50% od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni spoj identificiran u ovom uzorku je etil-heksadekanoat (26,1 %). Ostali spojevi koji su izolirani su:  $\alpha$ -terpineol (15,2 %), 3-metilbutan-1-ol (14,3 %), 4-terpineol (10,7 %), 2-metilbutan-1-ol (7,3 %), 2-feniletanol (6,7 %), 1,8-cineol (5,5 %), etil-acetat (1,9 %), etil-heksanoat (1,9 %), izoamil-acetat (1,8 %), borneol (1,3 %), etil-oktanoat (1,0 %) te limonen (1,0 %).

Esteri su jedni od najzastupljenijih hlapljivih spojeva unutar sastava jakih alkoholnih pića, a njihova prisutnost je potvrđena i u ispitanim uzorcima. Najveći udio kod svih ispitanih uzoraka imao je etil-heksadekanoat (26,1 %). Od ostalih izoliranih spojeva iz grupe estera zabilježeni su etil-acetat, etil-heksanoat, etil-oktanoat, etil-

dodekanoat, dietil-sukcinat te izoamil-acetat. Esteri masnih kiselina koji u strukturi sadrže od 8 do 18 ugljikovih atoma u destilatima žestokih alkoholnih pića osiguravaju ugodan voćni miris. Voćne i cvjetne arome se često ističu prisustvom etil-dodekanoata. Prisutnost etil-acetata je potpuno prirodna jer je on redoviti ester vina i proizvoda dobivenih od iste primarne sirovine (grožđe), a pogoduje stvaranju voćnih nota i kompleksne arome.

Jedna od najvažnijih kemijskih skupina u jakim alkoholnim pićima su viši alkoholi, a nastaju najčešće u procesu alkoholne fermentacije prilikom pretvorbe šećera iz mošta pomoću kvasaca. Izolirani viši alkoholi u ispitanim uzorcima su 2-metilpropan-1-ol (izobutanol), 2-metilbutan-1-ol (amilni alkohol), 3-metilbutan-1-ol (izoamilni alkohol) te 2-feniletanol. Najveći udio u ispitanim uzorcima ima 3-metilbutan-1-ol (izoamilni alkohol) koji uglavnom dominira u odnosu na ostale više alkohole što je potpuno očekivano za jaka alkoholna pića. Izoamilni alkohol je karakteriziran oporom aromom i aromom po bilju.

Specifičan spoj koji je izoliran koristeći plavo i pink vlakno iz likera od mirte je ciklički monoterpenski eter 1,8-cineol (plavo vlakno 23,4 % te pink vlakno 53,3 %). Obzirom da je ovaj spoj normalan sastojak mnogih eteričnih ulja, njegovu prisutnost pripisujemo korištenju biljke mirte (*Myrtus communis L.*). Osim njega, prisutni su i ostali specifični spojevi koji su u mnogim istraživanjima izolirani iz listova, cvatova i plodova mirte. Izolirani hlapljivi spojevi koji dokazuju prisutnost biljke mirte su mirtenal, mirtenol te mirtenil-acetat. [47]

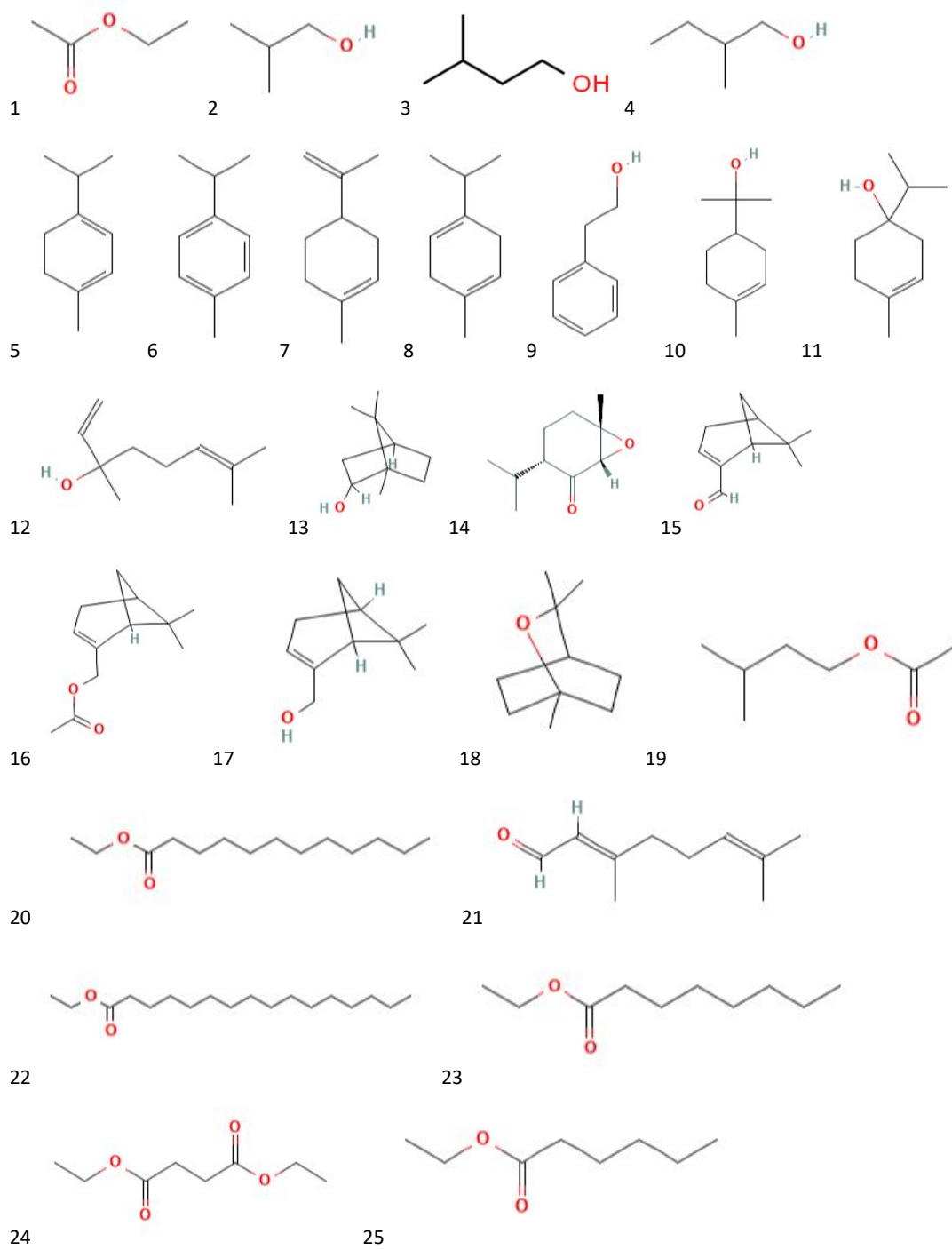
Osim već navedenih kemijskih spojeva, u korištenim uzorcima je izolirana velika količina ugljikovodika koji mogu biti monoterpenski, seskviterpenski i diterpenski. Od cikličkih monoterpenskih ugljikovodika najzastupljeniji je  $\alpha$ -terpineol (23,8 %) koji uz limonen dokazuju prisutnost ulja iz usplođa limuna. Izolirani su i ostali terpenski spojevi, a to su 4-terpineol, *p*-cimen, linalol,  $\alpha$ -terpinen te  $\gamma$ -terpinen. Prisutnost spoja limonena osigurava ugodan miris na citruse, limun i naranču.

Analizom rezultata i pregledom svih izoliranih hlapljivih spojeva čije su kemijske strukture prikazane na slici 23, možemo pretpostaviti da su se u proizvodnji ispitanih uzoraka koristili listovi, cvatovi i/ili plodovi limuna, mirte i naranče. Razlika u koncentracijama određenih spojeva ukazuje na različitost aromatičnih profila korištenih uzoraka, a posljedica su odabira aromatičnog bilja te načina njegove maceracije.



Kemijske strukture spojeva označene su rednim brojevima kako odgovara slici 23:

- 1) etil-acetat
- 2) 2-metilpropan-1-ol
- 3) 3-metilbutan-1-ol
- 4) 2-metilbutan-1-ol
- 5)  $\alpha$ -terpinen
- 6) *p*-cimen
- 7) limonen
- 8)  $\gamma$ -terpinen
- 9) 2-feniletanol
- 10)  $\alpha$ -terpineol
- 11) 4-terpineol
- 12) linalol
- 13) borneol
- 14) *cis*-piperiton-oksid
- 15) mirtenal
- 16) mirtenil-acetat
- 17) mirtenol
- 18) 1,8-cineol
- 19) izoamil-acetat
- 20) etil-dodekanoat
- 21) citral
- 22) etil-heksadekanoat
- 23) etil-oktanoat
- 24) dietil-sukcinat
- 25) etil-heksanoat



*Slika 23. Pregled svih kemijskih struktura izoliranih spojeva [48]*

## **5. ZAKLJUČAK**

Na osnovu analize izoliranih hlapljivih spojeva i uvidom u dobivene rezultate određivanja kemijskog profila hlapljivih spojeva ispitanih uzoraka domaćih likera od limuna, mirte i naranče možemo zaključiti:

- ❖ Cilj ovog diplomskog rada je bio analizirati hlapljive spojeve u uzorcima domaćih likera od limuna, mirte i naranče koristeći se metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Za metodu izolacije hlapljivih spojeva korišteno je plavo vlakno s ovojnicom (PDMS/DVB) te pink vlakno s ovojnicom (PDMS/DVB). Izolirani spojevi su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).
- ❖ Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) je idealna metoda za izolaciju najhlapljivijih spojeva koji imaju malu molekulsku masu. Stoga, treba koristiti više različitih metoda izolacije kako bi dobili kvalitetniji uvid u kompletni kemijski sastav ispitanih uzoraka. Korištenom metodom izolacije (HS-SPME) može se dobiti uvid u udio spojeva unutar vršnih para, ali to ne znači da je taj isti udio i u samom uzorku.
- ❖ Koristeći plavo vlakno kod svih ispitivanih uzoraka najzastupljeniji su sljedeći spojevi: 3-metilbutan-1-ol (56,5 %), 1,8-cineol (23,4 %),  $\alpha$ -terpineol (23,2 %), 4-terpineol (19,2 %), etil-acetat (7,1 %), 2-metilpropan-1-ol (7,0 %), 2-feniletanol (6,8 %), limonen (5,1 %), mirtenol (3,1 %) te mirtenil-acetat (3,1 %).
- ❖ Koristeći pink vlakno kod svih ispitivanih uzoraka najzastupljeniji su sljedeći spojevi: 1,8-cineol (53,3 %), etil-heksadekanoat (26,1 %),  $\alpha$ -terpineol (23,8 %), 4-terpineol (18,4 %), 3-metilbutan-1-ol (15,2 %), mirtenol (7,9 %), 2-metilbutan-1-ol (7,7 %), 2-feniletanol (6,2 %) te mirtenil-acetat (5,2 %).
- ❖ Od ostalih spojeva u manjim koncentracijama izolirani su sljedeći: borneol,  $\alpha$ -terpinen, *p*-cimen, limonen,  $\gamma$ -terpinen, linalol, etil-dodekanoat, dietil-sukcinat, mirtenal, etil-oktanoat, etil-heksanoat, (*Z*)-citral, (*E*)-citral, *cis*-piperiton-oksidi i izoamil-acetat.
- ❖ Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti kako su esteri, viši alkoholi te terpeni najzastupljeniji hlapljivi spojevi u svim ispitivanim uzorcima. Pretpostavlja se da se u procesu proizvodnje ispitivanih likera koristilo aromatično bilje poput limuna, mirte i naranče.

## **6. *LITERATURA***

- [1] I. Gately, *Drink, A cultural history of alcohol*, New York: Gotham books, 2008..
- [2] J. B. & C. Lippincott, »Science History Institute,« u *Adam's Still for the Distillation of Alcohol, In Encyclopædia of Chemistry, Theoretical, Practical, and Analytical, as Applied to the Arts and Manufacturers*, Vol. I. Philadelphia, Pennsylvania, 1877., p. 83.
- [3] L. Figuiet, 15 Lipanj 2021.. [Mrežno]. Available: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:%C3%89douard\\_Adam%27s\\_distillation\\_device\\_1877.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:%C3%89douard_Adam%27s_distillation_device_1877.jpg). [Pokušaj pristupa 15 Svibanj 2021..].
- [4] »Pravilnik o jakim alkoholnim pićima,« Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2009..
- [5] »Leksikografski zavod Miroslav Krleža,« 2021.. [Mrežno]. Available: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=1821>. [Pokušaj pristupa 27 Svibanj 2021..].
- [6] Ž. Pavlović, *Usporedna ispitivanja hlapljivih spojeva rakije travarice, Diplomski rad*, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2020..
- [7] »Prvi hrvatski vinogradarski portal,« [Mrežno]. Available: <http://www.vinogradarstvo.com/vocarstvo/jaka-alkoholna-pica/29-tehnologija-jakih-pica>. [Pokušaj pristupa 2 Lipanj 2021..].
- [8] R. Lučić, *Proizvodnja jakih alkoholnih pića*, 1. izdanje, Beograd: Nolit, 1986..
- [9] »Hercegovina Vino,« [Mrežno]. Available: <http://hercegovinavino.com/hr/hercegovinavino/rakije>. [Pokušaj pristupa 3 Srpanj 2021..].
- [10] »Vinopedia - riznica znanja o lozi i vinu,« [Mrežno]. Available: <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=komovica>. [Pokušaj pristupa 5 Srpanj 2021..].
- [11] S.-T. V. i S. Grba, »Proizvodnja jakih alkoholnih pića,« u *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*, Zagreb, Plejada, 2010., pp. 230-252.
- [12] R. Sahor, *Proizvodnja proizvoda od vinskog destilata, Interna skripta*, Zagreb, 1999..
- [13] S. Orlić i A. Jeromel, »Proizvodnja vina,« u *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*, Zagreb, Plejada, 2010., pp. 141-162.
- [14] P. Cesar, *Fizikalno – kemijske karakteristike voćnih rakija, Završni rad*, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2020..

- [15] »Kemijski rječnik,« [Mrežno]. Available: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=destilacija>. [Pokušaj pristupa 15 Srpanj 2021.].
- [16] »Tehnologija hrane,« 12 Kolovoz 2013.. [Mrežno]. Available: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-vocnih-rakija#toc-destilacija-komine>. [Pokušaj pristupa 16 Srpanj 2021.].
- [17] S. Jović, Priručnik za spravljanje rakije, Beograd: Partenon, 2006..
- [18] M. Banić, Rakije, whisky i likeri, Zagreb: Biblioteka Obitelj i gospodarstvo, 2006..
- [19] N. Spaho, P. Durr, S. Grga, E. Velagić-Habul i M. Blesić, Effects of distillation cut on the distribution of higher alcohols and esters in brandy produced from three plum varieties, Institute of Brewing & Distilling, 2013..
- [20] N. Spaho, Distillation Techniques in the Fruit Spirits Production, IntechOpen, 2016..
- [21] K. Anita, *Utjecaj alkoholne baze vinovice na senzorska svojstva likera od mente i meda, Završni rad*, Požega: Veleučilište u Požegi, 2018..
- [22] S. John, S. J. Monica, P. S., S. C. i A. P., *Antioxidant and Antimicrobial Efficacy of Lemon (Citrus limonum L.) Peel*, India: Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 2017..
- [23] »Zdravlje vašeg tijela,« 20 Lipanj 2020. [Mrežno]. Available: [https://prirucnik.hr/limuni-101-prehrambene-cinjenice-i-zdravstvene-koristi/#Ostali\\_biljni\\_spojevi](https://prirucnik.hr/limuni-101-prehrambene-cinjenice-i-zdravstvene-koristi/#Ostali_biljni_spojevi). [Pokušaj pristupa 20 Srpanj 2021.].
- [24] »Wikimedia Commons,« 2 Veljača 2005.. [Mrežno]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lemon.jpg>. [Pokušaj pristupa 28 Srpanj 2021.].
- [25] M. Kuzelj, »Kreni Zdravo,« [Mrežno]. Available: <https://www.krenizdravo.hr/zdravlje/alternativna-medicina/biljna-ljekarna/mirta-biljka-karakteristike-staniste-uzgoj-kao-lijek-recepti>. [Pokušaj pristupa 30 Srpanj 2021.].
- [26] B. Duralija, E. Lozica, N. Mikulec, L. M. Bandić i S. Voća, »Kemijski i mineralni sastav ploda mirte (Myrtus communis L.), Stručni rad,« *Glasnik zaštite bilja*, 19 Travanj 2021..
- [27] »Agroklub, (R)Evolucija poljoprivrede,« 2005.. [Mrežno]. Available: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/naranca-19/>. [Pokušaj pristupa 30 Srpanj 2021.].
- [28] G. Gattuso, D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi i C. Caristi, *Flavonoid composition of Citrus juices*, *Molecules* 12(8):1641-73, 2007..

- [29] Evan-Amos, »Wikimedia Commons,« 2 Svibanj 2012.. [Mrežno]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Orange-Fruit-Pieces.jpg>. [Pokušaj pristupa 1 Kolovoz 2021..].
- [30] N. Banović, *Kvaliteta rakije loze proizvedene pri različitim uvjetima fermentacije od sorte grožđa Izabela, Diplomski rad*, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2016..
- [31] M. Prce, *Utjecaj sistema za destilaciju na kakvoću destilata od jabuke, Diplomski rad*, Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2012..
- [32] D. Jurić, *Primjena plinske kromatografije za određivanje sastava i udjela hlapivih komponenti različitih vrsta rakija s područja Hercegovine, Diplomski rad*, Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2018..
- [33] M. Margarita, *Isparljivi spojevi meda Galactites tomentosa Moench., Završni rad.*, Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011..
- [34] M. L. Čikeš, *Profil hlapljivih spojeva začina origana prije i nakon zagrijavanja, Završni rad.*, Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018..
- [35] A.-M. Lovrić, *Optimizacija i validacija HS SPME GC MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu, Diplomski rad.*, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2016..
- [36] J. Pawliszyn, u *Handbook of Solid Phase Microextraction*, London, Chemical Industry Press, 2009., pp. 7-15.
- [37] D. A. Skoog, S. R. Crouch i F. J. Holler, *Principles of instrumental analysis*, Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007..
- [38] W. R. i M. R., *Capillary gas chromatography in food control and research*, Lancaster: Technomic Publishing Company Inc., 1993..
- [39] S. Luterotti, »Uvod u kemijsku analizu,« 19 Srpanj 2006.. [Mrežno]. Available: [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/). [Pokušaj pristupa 21 Kolovoz 2021..].
- [40] P. Ratajč, »Od rastline do aromaterapije,« 18 Ožujak 2017.. [Mrežno]. Available: <https://petraratajc.com/2017/03/18/gcms/>. [Pokušaj pristupa 21 Kolovoz 2021..].
- [41] A. Kasum, *Karakterizacija mednoga proizvoda "abbamele" i sastav isparljivih spojeva tipičnih uniflornih medova sardinije, Doktorski rad.*, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2011..
- [42] [Mrežno]. Available: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html#top>. [Pokušaj pristupa 22 Kolovoz 2021..].



- [43] R. L. Grob i E. F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th Edition, Hoboken/ New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004..
- [44] J. Pupačić, *Karakterizacija hlapljivih spojeva iz trajne kobasice Bosanski sudžuk, Završni rad.*, Split.: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018..
- [45] A. Perković, *Kvantitativno određivanje fenola iz uzorka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode, Diplomski rad.*, 2018.: Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.
- [46] Z. Marijanović, *Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda, Doktorska dizertacija.*, Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku., 2014..
- [47] I. Jerković, »Doprinos istraživanju slobodnih i glikozidno vezanih isparljivih spojeva od 2001. do 2006.,« u *Slobodni i glikozidno vezani isparljivi spojevi*, Split, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2006., pp. 199-207.
- [48] »PubChem,« National Library of Medicine, [Mrežno]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Pokušaj pristupa 16 Rujan 2021.].