

# Hlapljivi spojevi likera Pelinkovac

---

**Galić, Josip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:022965>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI LIKERA PELINKOVCA**  
**DIPLOMSKI RAD**

**JOSIP GALIĆ**

**Matični broj: 19**

**Split, listopad 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**HLAPLJIVI SPOJEVI LIKERA PELINKOVCA**  
**DIPLOMSKI RAD**

**JOSIP GALIĆ**

**Matični broj: 19**

**Split, listopad 2022.**

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

**VOLATILE COMPOUNDS OF PELINKOVAC LIQUEUR**  
**GRADUATE THESIS**

**JOSIP GALIĆ**

**Parental number: 19**

**Split, October 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko – 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 Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Mladenka Šarolić

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

## HLAPLJIVI SPOJEVI LIKERA PELINKOVCA

Josip Galić, 19

### Sažetak:

Pelinkovac je jako alkoholno piće koje se tradicionalno proizvodi u Republici Hrvatskoj. Pripada kategoriji biljnih likera dobiven aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla maceratima aromatičnog bilja u kojima po sastavu i količini dominira biljka pelin (*Artemisia absinthium* L.), uz komorač (*Foeniculum vulgare* L.), kadulju (*Salvia officinalis* L.) i mentu (*Menta piperita* L.), koji proizvodu daju prepoznatljiva i karakteristična organoleptička svojstva. Cilj ovog rada je bio usporediti aromatični profil pet vrsta likera Pelinkovca prisutnih na tržištu republike Hrvatske. Hlapljivi spojevi izolirani su pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), a analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Analiziranjem dobivenih rezultata utvrđen je različiti sastav hlapljivih spojeva među ispitanim uzorcima. U uzorcima A, B i E dominira *trans*-anetol (36,10 %, 43,21 % i 39,20 %), u uzorku C limonen (52,82 %) te u uzorku D *p*-menton (25,76 %). Utvrđene razlike u aromatičnom profilu upućuju na specifičnosti pojedinog proizvođača u odabiru aromatičnog bilja i tehnološkog procesa proizvodnje.

**Ključne riječi:** biljni liker, pelinkovac, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

**Rad sadrži:** 60 stranica, 30 slika, 8 tablica, 87 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

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

**Datum obrane:** 07. listopada 2022.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### GRADUATE 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 on Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology. session no. 6

**Mentor:** Mladenka Šarolić, PhD. assistant professor

**Tecnical assistance:** Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

### VOLATILE COMPOUNDS OF PELINKOVAC LIQUEUR

**Josip Galić, 19**

**Abstract:**

Pelinkovac is strong alcoholic beverage that is traditionally produced in Croatia. It belongs to the category of herbal liqueurs, obtained by aromatizing ethyl alcohol of agricultural origin with macerates of aromatic plants in which the wormwood plant (*Artemisia absinthum L.*) dominates, along with fennel (*Foeniculum vulgare L.*), sage (*Salvia officinalis L.*) and mint (*Menta piperita L.*), which give the products recognizable and characteristic organoleptic properties. The aim of this study was to compare the aromatic profile of five types of Pelinkovac liqueur present on the market of the Republic of Croatia. Volatile compounds were isolated using headspace solid phase microextraction (HS-SPME), and analyzed by a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. The analysis of the obtained results revealed a different composition of volatile compounds among the tested samples. *Trans* anethole was the dominant compound in samples A, B and E (36,10 %, 43,21 % and 39,20 %), while in sample C it was limonene (52.82 %) and in sample D *p*-menthone (25, 76 %). The established differences in the aromatic profile point to the specifics of each producer in the selection of aromatic herbs and the technological process of production.

**Keywords:** herbal liqueur, pelinkovac, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 60 pages, 30 figures, 8 tables, 87 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Ani Radonić, associate professor               | chair person |
| 2. Zvonimir Marijanović, PhD. assistant professor | member       |
| 3. Mladenka Šarolić, PhD. assistant professor     | supervisor   |

**Defence date:** October 07, 2022.

**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, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mladenke Šarolić u razdoblju od rujna 2021. do rujna 2022. godine.*



## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mladenki Šarolić na ukazanom povjerenju i stručnoj pomoći te doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala svim ljudima dobre volje koji su me pratili tijekom mog studiranja, posebno mojoj obitelji.*

***Per aspera ad astra.***

## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

- Zadatak ovog diplomskog rada bio je izolirati hlapljive spojeve iz pet uzoraka likera Pelinkovca prisutnih na tržištu Republike Hrvatske proizvedenih od različitih proizvođača korištenjem mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).
- Identificirati izolirane hlapljive spojeve primjenom vezanog sustava plinske kromatografije – spektrometrije masa (GC-MS) te usporediti dobivene rezultate.

## SAŽETAK

Pelinkovac je jako alkoholno piće koje se tradicionalno proizvodi u Republici Hrvatskoj. Pripada kategoriji biljnih likera dobiven aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla maceratima aromatičnog bilja u kojima po sastavu i količini dominira biljka pelin (*Artemisia absinthium* L.), uz komorač (*Foeniculum vulgare* L.), kadulju (*Salvia officinalis* L.) i mentu (*Menta piperita* L.), koji proizvodu daju prepoznatljiva i karakteristična organoleptička svojstva. Cilj ovog rada je bio usporediti aromatični profil pet vrsta likera Pelinkovca prisutnih na tržištu republike Hrvatske. Hlapljivi spojevi izolirani su pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), a analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Analiziranjem dobivenih rezultata utvrđen je različiti sastav hlapljivih spojeva među ispitanim uzorcima. U uzorcima A, B i E dominira *trans*-anetol (36,10 %, 43,21 % i 39,20 %), u uzorku C limonen (52,82 %) te u uzorku D *p*-menton (25,76 %). Utvrđene razlike u aromatičom profilu upućuju na specifičnosti pojedinog proizvođača u odabiru aromatičnog bilja i tehnološkog procesa proizvodnje.

**Keywords:** biljni liker, pelinkovac, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

## SUMMARY

Pelinkovac is strong alcoholic beverage that is traditionally produced in Croatia. It belongs to the category of herbal liqueurs, obtained by aromatizing ethyl alcohol of agricultural origin with macerates of aromatic plants in which the wormwood plant (*Artemisia absinthum* L.) dominates, along with fennel (*Foeniculum vulgare* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and mint (*Menta piperita* L.), which give the products recognizable and characteristic organoleptic properties. The aim of this study was to compare the aromatic profile of five types of Pelinkovac liqueur present on the market of the Republic of Croatia. Volatile compounds were isolated using headspace solid phase microextraction (HS-SPME), and analyzed by a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. The analysis of the obtained results revealed a different composition of volatile compounds among the tested samples. *Trans* anethole was the dominant compound in samples A, B and E (36,10 %, 43,21 % and 39,20 %), while in sample C it was limonene (52.82 %) and in sample D *p*-menthone (25, 76 %). The established differences in the aromatic profile point to the specifics of each producer in the selection of aromatic herbs and the technological process of production.

**Keywords:** herbal liqueur, pelinkovac, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

# SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Jaka alkoholna pića	2
1.2. Biljni ekstrakti	3
1.2.1. Maceracija	3
1.2.2. Digestija	4
1.2.3. Perkolacija	4
1.2.4. Infuzija	4
1.2.5. Dekokcija	5
1.3. Liker	5
1.3.1. Priprema likerske mase	6
1.3.2. Priprema biljnog materijala	6
1.3.3. Zaslađivanje	7
1.3.4. Filtracija	8
1.3.5. Starenje i stabilizacija	8
1.4. Pelinkovac	8
1.4.1. Hrvatski pelinkovac	9
1.4.2. Aromatično bilje za proizvodnju pelinkovca	10
1.4.2.1. Pelin gorki ( <i>Artemisia absinthium</i> L.)	11
1.4.2.2. Drugo aromatično bilje	14
1.5. Arome jakih alkoholnih pića	17
1.5.1. Spojevi primarne arome	17
1.5.2. Spojevi sekundarne arome	20
1.5.3. Tvari arome nastale tijekom destilacije	21
1.5.4. Tvari arome nastale tijekom dozrijevanja	22
1.6. Izolacija hlapljivih spojeva	22
1.6.1. Sorpcijske tehnike	23
1.7. Analiza hlapljivih spojeva	25
1.7.1. Plinska kromatografija	25
1.7.2. Spektrometrija masa (MS)	28
1.7.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)	28
2. EKSPERIMENTALNI DIO	30

2.1. Aparatura	30
2.2. Materijal	30
2.3. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	31
2.4. Plinska kromatografija-spektrometrija masa	32
3. REZULTATI	34
3.1. Hlapljivi spojevi pelinkovca	34
4. RASPRAVA	43
5. ZAKLJUČCI	53
6. LITERATURA	54

## UVOD

Svrhovita proizvodnja alkoholnih pića uobičajena je i često odražava kulturne i vjerske posebnosti koliko i zemljopisne i sociološke uvjete. Otkriće posuda iz kasnog kamenog doba sugerira da su namjerno fermentirana pića postojala već u razdoblju neolitika (oko 10 000 godina prije Krista). Sposobnost metaboliziranja alkohola vjerojatno potječe od primata koji su jeli fermentirano voće.<sup>1</sup> Istraživanja dokazuju da su stare civilizacije Mezopotamije, Egipta, Grčke i dr. poznavale alkoholnu destilaciju.

Pelinkovac je jako alkoholno piće koje pripada kategoriji likera. Njegova proizvodnja je tradicionalna u Hrvatskoj. Postoje slična pića na bazi aromatičnih biljaka diljem svijeta, no likeri u kojima se koristi gorki pelin kao jedan od glavnih sastojaka su češće prisutni u jugoistočnoj Europi.

Pelinkovac je biljni liker dobiven aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla maceratima aromatičnog bilja u kojima po sastavu i količini dominira biljka pelin (*Absinthii herba*), koja proizvodu daje prepoznatljiva i karakteristična senzorska svojstva – neznatno gorak okus i osebujan miris po biljci pelin po kojoj liker i nosi ime. S obzirom na tradiciju proizvodnje svaki proizvođač ima svoje specifičnosti u sastavu macerata, količini dodanog šećera i alkoholnoj jakosti tako da je to liker čija je alkoholna jakost 27-31 % vol. alkohola, a količina dodanog šećera 100-170 g/L. Postupak spravljanja likera počinje potapanjem odabrane smjese aromatičnog bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla kroz određeno vrijeme. Dio tako dobivenog macerata destilira se i miješa s preostalim maceratom uz dodatak dozvoljenih prehrambenih aditiva. Taj pripravak se nakon određenog vremena, koje je potrebno da se homogenizira, upotrebljava za proizvodnju pelinkovca.<sup>2</sup> Karakterističnost pelinkovca se sastoji u odabiru aromatičnog bilja za proces maceracije pri čemu je izbor aromatičnih komponenti iznimno velik.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Jaka alkoholna pića

Jaka alkoholna pića su alkoholna pića namijenjena za ljudsku potrošnju. Imaju posebna senzorska svojstva, sadrže minimalno 15 % vol. alkohola i proizvedena su izravno ili neizravno:

- izravno, destilacijom s ili bez dodavanja aroma, prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla i/ili maceracijom ili sličnom preradom bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili u destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili u jakim alkoholnim pićima. Dodaju se arome, šećer i druga sladila.
- neizravno, miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više jakih alkoholnih pića, etilnim alkoholom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog podrijetla, drugih alkoholnih pića ili pak samo određenih pića.<sup>2</sup>

Ovisno o vrsti sirovine i tehnološkom postupku proizvodnje te količini alkohola i šećera u pićima, jaka alkoholna pića se mogu svrstati u tri skupine:

1. **Prirodna jaka alkoholna pića** koja se prema sirovinama iz kojih se dobivaju dijele na:
  - a) voćne rakije (komovica, šljivovica),
  - b) žitne rakije (viski, votka) i
  - c) šećerne rakije (rum)
2. **Umjetna jaka alkoholna pića** su pića koja se proizvode maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom voćnih sokova i/ili dodatkom rafiniranog alkohola i aromatičnih tvari. Sadrže sve karakteristike sirovina iz kojih su proizvedena i to u oplemenjenom obliku.
3. **Aromatizirana vina** proizvode se maceracijom mirodija i aroma u prefermentiranim voćnim sokovima (vinima) s ili bez dodatka šećera i rafiniranog alkohola. U tu skupinu spadaju vermut i bermet.<sup>3</sup>

Također se jaka alkoholna pića dijele prema porijeklu sirovine i načinu proizvodnje na:

- rakije,



- rakije po posebnim postupcima,
- jaka alkoholna pića po posebnim postupcima,
- likeri i
- miješana jaka alkoholna pića (kokteli).<sup>2</sup>

## 1.2. Biljni ekstrakti

Biljni ekstrakti se mogu definirati kao sastojci dobiveni različitim postupcima ekstrakcije iz svježeg ili sušenog bilja te dijelova biljaka kao što su: lišće, cvjetovi, sjemenke, korijen i kora. Aktivni sastojci dobiveni su zajedno s ostalim materijalom prisutnim u biljnoj masi.<sup>4</sup>

Biljni ekstrakti se dobivaju tako što se usitnjeni dijelovi biljke, uglavnom suhi, dovode u kontakt s otapalom za ekstrakciju u odgovarajućem uređaju (ekstraktor).<sup>4</sup>

Koriste se razne metode u svrhu ekstrakcije, koncentriranja i formiranja aromatičnih tvari iz biljnih materijala, a to su:

- maceracija,
- digestija,
- perkolacija,
- infuzija i
- destilacija.

Također posljednjih godina koriste se i nekonvencionalne tehnike kao što su ekstrakcija superkritičnim fluidima, turbo ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija mikrovalovima.<sup>5</sup>

### 1.2.1. Maceracija

Maceracija je postupak namakanja biljnog materijala (usitnjenog ili mljevenog) u zatvorenoj posudi s otapalom, pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Nakon izvršene ekstrakcije, smjesa ide na prešanje ili filtraciju kako bi se odvojio ekstrakt od netopivog biljnog materijala (tropa). S obzirom na statičnost sistema, izuzevši povremeno miješanje, maceracija se zasniva na principima molekularne difuzije te je stoga spora. Povremenim miješanjem postiže se cirkulacija zasićenog i svježeg otapala koja pogoduje difuziji.<sup>4</sup>

Nakon ekstrakcije biljni materijal se odvaja dekantiranjem uz filtriranje. Kako bi se osigurala iscrpna ekstrakcija, nakon dekantiranja, može se dodati svježe otapalo (remacerizacija – obično se provodi dva puta uzastopno, tzv. bimaceracija). Uzastopna maceracija se pretežno primjenjuje za ekstrakciju biljnog materijala čvršće strukture. Općenito, bimaceracijom se postiže *cca.* 20% bolji iscrpak, međutim daljnje povećanje broja postupaka (trimaceracija i dr.) utječe znatno manje na iscrpak.<sup>6</sup>

Stupnjevita maceracija podrazumijeva proces u kojem se pojedine sastavnice (otapala) sredstva za ekstrakciju dodaju postepeno.<sup>6</sup>

### **1.2.2. Digestija**

Digestija je oblik maceracije u kojem se postupak ekstrakcije provodi uz djelomično zagrijavanje pri temperaturi do 40 °C. Ova metoda koristi se kada je umjereno povišena temperatura poželjna čime se povećava djelotvornost otapala. Digesti su tekući ekstrakti biljaka gdje se biljka tretira s otapalima niskog vrelišta poput etanola pri povišenoj temperaturi kako bi se povećala ekstrakcija slabo topivih spojeva.<sup>4</sup>

### **1.2.3. Perkolacija**

Perkolacija (lat. *percolare* - pomoću kapi) je kontinuirana ekstrakcija propisano usitnjene droge na sobnoj temperaturi, koja se izvodi proticanjem propisanog otapala kroz stupac biljne droge u perkolatoru.<sup>7</sup>

Ova metoda često se koristi prilikom ekstrakcije aktivnih sastojaka u pripremi tinktura i tekućih ekstrakata u uređaju koji se naziva perkolator.<sup>4</sup>

### **1.2.4. Infuzija**

Uobičajeni naziv infuzija u hrvatskom jeziku je napitak čaj. Aktivne tvari biljaka se ekstrahiraju vrućom vodom kojom se osušeno bilje prelije. Infuzi se rade tako da se voda zagrije do vrenja te se u nju stavi osušena i/ili usitnjena biljka i ostavi stajati pokrivena između 5 i 15 minuta. Talog se zatim odvoji od tekućine. Infuzi se najčešće dobivaju od biljnih dijelova kao što je list, cvijet ili cijeli nadzemni dio zeljaste biljke.<sup>4</sup>

Hladna infuzija priprema se hladnom vodom i ostavi stajati preko noći. Kod ovakvih infuzija potrebno je obratiti pozornost na čistoću i stabilnost, pogotovo ako se

koriste biljke koje sadrže sluzi, a za koje se najčešće preporučuje ovaj način pripreme (korijen bijelog sljeza).<sup>8</sup>

### 1.2.5. Dekokcija

Dekokt je ekstrakt biljke dobiven kuhanjem u ključaloj vodi od 10 do 20 minuta pri čemu se poboljšava ekstrakcija. Prikladni su za tvrde biljne dijelove kao što su podanak, korijen i kora gdje je potrebno duže vrijeme da vruća voda prodre u unutrašnjost biljnih dijelova i ekstrahira aktivne tvari.<sup>6</sup>

U ovom postupku sirovi biljni materijal se kuha u određenom volumenu vode neko vrijeme, nakon čega se hladi, cijedi i zatim filtrira.<sup>4</sup>

### 1.3. Liker

Riječ liker potječe od latinskog *liquefacere*, što znači "napraviti tekućinu". Likere su vjerojatno prvi put komercijalno proizvodili srednjovjekovni redovnici i alkemičari. Nazvani su balzamima, kremama, eliksirima i uljima te su se stoljećima koristili kao lijekovi, tonici, afrodisijaci.<sup>9</sup>

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) „Liker je jako alkoholno piće:

- koje sadrži najmanju količinu šećera, izraženu kao invertni šećer:
  - 70 grama na litru za liker od trešanja/višanja kod kojeg etilni alkohol proizlazi isključivo od rakije od trešanja/višanja.
  - 80 grama na litru za liker od encijana ili slične likere pripremljene s encijanom ili sličnim biljkama kao jedinom aromatičnom tvari.
  - 100 grama na litru u svim drugim slučajevima;
- proizveden aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla ili destilata poljoprivrednog podrijetla ili jednog ili više jakih alkoholnih pića ili njihovih mješavina te zaslađeno, s dodatkom proizvoda poljoprivrednog podrijetla ili prehrambenih proizvoda poput vrhnja, mlijeka ili drugih mliječnih proizvoda, voća, vina ili aromatiziranog vina sukladno Zakonu o vinu (96/03).“<sup>2</sup>

Uglavnom velika poduzeća obavljaju proizvodnju i pripremu svih sirovina za proizvodnju likera. Najčešće se one nabavljaju kod drugih proizvođača pa se proizvođači likera bave samo finalizacijom koju sačinjavaju:

- formiranje likerske mase,
- starenje (odležavanje, homogenizacija),
- filtracija,
- punjenje u boce,
- skladištenje i
- stavljanje u promet.<sup>10</sup>

Alkoholna jakost likera koji se stavlja na tržište kao gotov proizvod je najmanje 15% vol. Kod proizvodnje likera dozvoljeno je aromatiziranje prirodnim aromatičnim tvarima i pripravcima.<sup>2</sup>

### **1.3.1. Priprema likerske mase**

Formiranje likerske mase predstavlja osnovnu operaciju proizvodnje likera. Prethodno je potrebno točno utvrditi količinu, sastav i kvalitetu likera tj. recepturu. Na osnovi željene količine i planirane kvalitete likera vrši se proračun i nalaženje potrebnih količina sirovina, imajući u vidu njihov sastav i sadržaj pojedinih komponenti: šećera, bojanih tvari, aromatičnih tvari i drugih sastojaka. Količine sirovina miješaju se u prikladnim posudama s uređajem za miješanje.<sup>10</sup>

Što se tiče kvalitete alkohola za pripravljanje rakija i likera, smatra se da su najbolje žitne rakije ili rakija lozovica (loza). U svakom slučaju alkohol mora biti dobre kvalitete jer se od lošega alkohola sigurno ne može napraviti prvorazredan liker. Također se preporučuje 96%-tna vinska žesta, tj. alkohol dobiven destilacijom vina jer se iz voća najbolje iscrpe vrijedni sastojci i arome. Najčešće se uzima rakija od žitarica sa 37,5 – 42 vol. % alkohola koje su posve neutralna okusa stoga se neće promijeniti okus potopljenog bilja ili voća.<sup>11</sup>

### **1.3.2. Priprema biljnog materijala**

Voće i bilje za ulaganje u alkohol mora biti zdravo, čisto i po mogućnosti potpuno dozrelo jer samo takvo daje potpunu aromu. Većinu voća i bilja ne treba rezati na sitnije komade jer pri filtriranju može nastati mutni talog s mnogo malih čestica, koje

vrlo brzo začepi filter. Bilje treba stavljati tako da se uzimaju cijele grančice, npr. estragon, jer je poslije olakšano vađenje i nužno filtriranje. Korijenje se reže na manje komade ili kriške. Korijenje je obično gorko, a količinu je lakše odrediti ako je narezano na manje komade. Većinu začina treba ostaviti u komadima one veličine u kojima su nabavljeni. Oni svoju aromu predaju alkoholu na zadovoljavajući način.<sup>11</sup>

Mali dio aromatičnog bilja se obrađuje u svježem stanju, a većina se suši. Sušenje se provodi u sjeni, na prozračnom mjestu, najčešće kod sobne temperature ili u struji toplog zraka. Osim vode, mnoge biljke mogu sušenjem izgubiti i dio eteričnog ulja. Promjene i gubici tijekom sušenja i skladištenja aromatičnog bilja mogu biti:

- isparavanje hlapljivih spojeva,
- osmoljavanje,
- enzimske promjene,
- kemijske promjene (npr. oksidacija osobito nezasićenih sastojaka),
- promjene u boji (sadržaj klorofila) i dr.<sup>6</sup>

U većini receptura koje se rabe od starih vremena, zadan je položaj na kojem mora stajati voće ili bilje u alkoholu, a da pritom nije objašnjeno zašto to tako mora biti. Međutim, za to postoje određeni praktični razlozi. Kod pripravljanja rakija i likera postupkom potapanja različitog voća, bilja i dijelova biljaka u alkohol, to bilje uzrokom je promjene boje upotrijebljenog alkohola. Tvari koje daju takve različite boje često nisu stabilne kad su izložene djelovanju ultraljubičastih zraka, a upravo takve zrači naše Sunce. Takve su primjerice nježne voćne boje ili zelena boja od metvice ili kopljastog trpuca. Ako se takve boje dulje izlažu sunčevoj svjetlosti prelaze u neuglednu smeđu boju. Alkoholni pripravci s češerima, korijenjem i začинима u pravilu su neosjetljivi na sunčevu svjetlost. Uz to treba istaknuti da je svrha "stajanja na Suncu" jako zagrijati rakiju i liker. Toplina je nužna jer u toploj otopini sastojci voća i bilja lakše i brže prelaze u alkohol.<sup>11</sup>

### **1.3.3. Zasladiivanje**

Nije nužno da svaki liker treba biti po okusu sladak. Za zasladiivanje se koriste saharoza, med ili glukozni sirup. Ovisno o dodacima likeri mogu biti slatki (voćni likeri, likeri s voćnom aromom, aromatičnim destilatima i aromatizirani likeri), gorki (gorki ekstrakti biljaka) i specijalni (kordijal, emulzioni i punč).<sup>12</sup>

Kod proizvodnje biljnog likera često je potrebno dodavanje šećera jer aromatično bilje nema prirodno zadovoljavajući sadržaj šećera kao što ima voće koje se koristi u proizvodnji voćnih likera.

#### **1.3.4. Filtracija**

Poslije formiranja likerske mase pristupa se filtraciji, najbolje zatvorenim naplavnim filterom, kako bi se odstranile eventualne čestice mutnoće kojih po pravilu nema mnogo ako su sirovine prethodno bile filtrirane. Filtriranjem se stabilizira i potiče proces sazrijevanja likera. Pri miješanju ili kupaži različitih sirovina dolazi do poremećaja fizikalno–kemijske ravnoteže u njima, pa može doći do zamućivanja osnovne likerske mase.<sup>10</sup>

Proces filtracije se radi i više puta u proizvodnji likera visoke kvalitete i zavidne reputacije. Tako se npr. kod proizvodnje Jägermeistera prva filtracija radi poslije procesa maceracije, druga poslije godinu dana odležavanja likera u bačvi te treća, fina filtracija, u finalnoj fazi nastajanja Jägermeistera. Temeljit proces filtracije je potreban jer odvaja talog od polugorkog likera kako bi se postigla željena čistoća, bez gubitka arome.<sup>13</sup>

#### **1.3.5. Starenje i stabilizacija**

Starenjem, likeri se stabiliziraju i dobivaju zaokruženi okus. Ova faza proizvodnje najbolje se odvija u starijim, već korištenim ili ovinjenim hrastovim posudama. Vrijeme starenja je različito i ovisi o vrsti likera. Za vrijeme starenja likera dolazi do smanjenja alkohola u likerskoj masi. Da bi se izbjeglo naknadno dodavanje alkohola koje bi destabiliziralo uspostavljenu ravnotežu između sastojaka u liker, u osnovnu masu se doda malo više alkohola.<sup>10</sup>

Dozrijevanjem (odležavanjem, starenjem) aromatični profili likera često se mijenjaju uslijed niza biokemijskih reakcija. Količina kisika u posudi (boca, bačva i dr.) i njezina izloženost UV zračenju mogu znatno promijeniti aromu likera. Chartreuse, jedan od najpoznatijih svjetskih likera, poznat je kao odležavajući liker.<sup>14</sup>

### **1.4. Pelinkovac**

Pelinkovac je jako alkoholno piće koje pripada kategoriji likera. To je biljni liker dobiven aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla maceratima

aromatičnog bilja u kojima po sastavu i količini dominira biljka pelin (*Absintii herba*), koja proizvodu daje prepoznatljiva i karakteristična senzorska svojstva – neznatno gorak okus i osebujan miris po biljci pelin po kojoj liker i nosi ime. S obzirom na tradiciju proizvodnje svaki proizvođač ima svoje specifičnosti u sastavu macerata, količini dodanog šećera i alkoholnoj jakosti tako da je to liker čija je alkoholna jakost 27-31% vol. alkohola, a količina dodanog šećera 100-170 g/L.<sup>15</sup>

Postupak spravljanja likera počinje potapanjem odabrane smjese aromatičnog bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla kroz određeno vrijeme. Dio tako dobivenog macerata destilira se i miješa s preostalim maceratom uz dodatak dozvoljenih prehrambenih aditiva. Taj pripravak se, nakon određenog vremena koje je potrebno da se homogenizira, upotrebljava za proizvodnju pelinkovca.<sup>15</sup>

#### **1.4.1. Hrvatski pelinkovac**

Hrvatski pelinkovac se tradicionalno proizvodi u Hrvatskoj i povijest njegove proizvodnje datira od 1862. godine od kada se bez prekida proizvodi. U Muzeju grada Zagreba čuva se originalna boca Pelinkovca iz 1862. godine kao potvrda autohtonosti i tradicionalnosti proizvoda.<sup>15</sup>

Hrvatski pelinkovac je tradicionalno jako alkoholno piće koje pripada kategoriji likera. Dobiva se iz etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla koji je zaslađen i aromatiziran maceratima aromatičnog bilja u kojima po sastavu i količini dominira biljka pelin (*Artemisia absinthium* L.), uz komorač (*Foeniculum vulgare* L.), kadulju (*Salvia officinalis* L.) i mentu (*Menta piperita* L.), koji proizvodu daju prepoznatljiva i karakteristična organoleptička svojstva po kojima se proizvod razlikuje od ostalih jakih alkoholnih pića iz iste kategorije.<sup>15</sup>

Najstariji i najpoznatiji biljni liker u Hrvatskoj, proizvodi se tradicionalnim postupkom maceracije u kojem se odabrano ljekovito bilje, među kojim dominira pelin, potapa u osnovnu tekućinu nakon čega odležava u drvenim bačvama. Prepoznatljiv je po specifičnom gorkom okusu pelina u optimalnom skladu s aromatičnim biljem. Izvrstan je kao aperitiv ili digestiv kao i u kombinaciji s drugim pićima. U narodu se pelinkovac od davnina koristi i kao lijek kod tegoba želuca.<sup>16</sup>

Boje koje dominiraju potječu od macerata aromatičnog bilja i njihov spektar se kreće od svijetlo do tamnije smeđe, a najčešće se zadržava u granicama tople smeđe

boje. Miris potječe od aromatičnog bilja, a kako je dominantna biljka pelin, njezina karakteristična aroma ističe se u mirisu Hrvatskog pelinkovca. Miris je snažan i prepoznatljiv i prevladavaju travnate note pelina. Okus je svjež s nazalnom taninskom notom u kojemu prevladava gorčina. Pelin sadrži absintin, anabsintin, artabsin, matricin te neke fenolne spojeve koji su uglavnom izrazito gorki i baš zbog svoje gorčine imaju veliku ulogu u terapijskom djelovanju pelina. Utječu na receptore za gorki okus na jeziku i tako potiču lučenje želučanih žlijezda, te na taj način poboljšava probavu i apsorpciju hranjivih tvari.<sup>15</sup>

### 1.4.2. Aromatično bilje za proizvodnju pelinkovca

Korištenje aromatičnih i začinskih biljaka za pripremu napitaka datira još iz drevne mediteranske povijesti, kada je maceracija bilja i začina u vinu bila uobičajena praksa. Jedan od prvih proizvođača ovih pripravaka bio je Hipokrat, vjerojatno izumitelj aromatiziranog vina, poznatog i kao "Hipokratsko vino" koje se smatra pretkom današnjeg Vermuta. Neki od najčešće korištenih prirodnih izvora aroma za proizvodnju različitih vrsta aromatiziranih alkoholnih pića podijeljeni su prema svojim karakteristikama (tablica 1).<sup>17</sup>

**Tablica 1.** Prirodni izvori aroma korištenih u proizvodnji aromatiziranih alkoholnih pića<sup>17</sup>

<b>Aromatično obilježje</b>	<b>Izvor</b>
gorko	smola aloe, drvo kvazije, vrste roda <i>Artemisie</i> , korijen encijana, artičoka
aromatično i gorko	stolisnik, maslačak, sikavica, rabarbara, rimska kamilica, gorka naranča
izrazito aromatično	anđelika, zvjezdasti anis, muškatna kadulja, paprena metvica
začinsko	klinčić, cimet, muškatni oraščić

Izbor aromatičnog bilja za proizvodnju Hrvatskog pelinkovca varira od proizvođača do proizvođača. Glavnina sastojaka je poznata, no svaki proizvođač ima svoju tajnu recepturu. Mnogo biljaka korištenih u proizvodnji pelinkovca je planinskog



podrijetla, posebice na području Velebita. Sami liker je dobio ime po biljci pelin čijih 15 vrsta je prisutno u Hrvatskoj.

#### 1.4.2.1. Pelin gorki (*Artemisia absinthium* L.)

**Pelin** (*Artemisia absinthium* L.) je aromatična biljka koja uglavnom raste u područjima mediteranskih zemalja.<sup>18</sup> Latinski naziv roda *Artemisia* potječe od imena grčke božice Artemide. Pelin pripada porodici Asteraceae (glavočike), jednoj od najvećih u biljnom svijetu, koja sadrži preko 20 000 biljnih vrsta i 800 rodova.<sup>19</sup>

Samih pelina ima preko 400 vrsta, a rasprostranjeni su diljem Europe, Azije, Afrike i Sjeverne Amerike. Od njih su najpoznatiji: *Artemisia absinthium* L., *Artemisia annua* L., *Artemisia alba* Turra, *Artemisia dracunculus* L., *Artemisia vulgaris* L. i druge.<sup>20</sup>

Hrvatski naziv za *Artemisia absinthium* L. je gorki, gorski ili pravi pelin (slika 1). Višegodišnja je u donjem dijelu drvenasta trajnica ili polugrm, aromatična i jakog mirisa te vrlo gorka okusa, visine 30-100 cm. Raste na suhom i kamenitom tlu, najčešće na zapuštenim obradivim površinama, uz staze i rubove šuma, u primorskim područjima, a sadi se i u vinogradima.<sup>21</sup>



**Slika 1.** Gorski pelin (*Artemisia absinthium* L.)<sup>22</sup>

Gorki pelin pospješuje lučenje želučanog soka i žuči. Rabi se za izradu tinktura i ekstrakata, kao i za dobivanje eteričnog ulja. Eterično ulje stimulira živčani sustav i

može se koristiti u liječenju depresije i stresa. Povoljno djeluje u liječenju kroničnog gastritisa, kod bolnih i neredovityh menstruacija, dijabetesa, bolesti crijeva, jetre, bubrega i mjehura. Pelin se rabi i u industriji alkoholnih pića. U nas je poznato piće naziva pelinkovac, dok je u svijetu poznatiji liker absint koji osim gorkog pelina sadrži anis i komorač. U pučkoj medicini se pelinova rakija ili pelinovo vino rabi protiv crijevnih nametnika. Ako je pelin sadržan u većoj koncentraciji ili se napitci uzimaju dulje vrijeme, može doći do neželjenih posljedica, odnosno do teških psihičkih poremećaja. Uzrok su kemijski spojevi  $\alpha$ - i  $\beta$ - tujon.<sup>21,23</sup>

Eterično ulje pelina sadrži različite bioaktivne kemijske spojeve koji imaju široku primjenu u prehrambenoj i kemijskoj industriji, medicini i drugdje. Najznačajnija je njihova primjena u prehrambenoj industriji gdje se koriste kao sredstva za poboljšanje okusa i mirisa prehrambenih proizvoda te u kemijskoj industriji gdje se koriste kao baze za polusinteze vrlo složenih molekula.<sup>24</sup>

Komponente eteričnog ulja pelina (tablica 2) imaju različita bioaktivna svojstva te se koriste kao: antibakterijsko, antifugalno, antiparazitsko sredstvo, sredstvo za uništenje/odbijanje različitih kukaca, narkotik, digestiv i dr.<sup>24</sup> Eterična ulja pelina imaju izrazito gorak okus zbog prisutnosti artabsina (seskviterpenskog laktona) i absintina (dimernog seskviterpenskog laktona).<sup>18</sup>

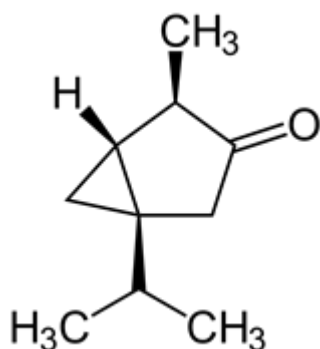
Sastav eteričnih ulja *A. absinthium* nije stalan i ovisi o više čimbenika kao što su: geografski položaj, klimatski uvjeti, obrada zemljišta, pH tla, obrada biljke nakon branja te metoda ekstrakcije.<sup>25</sup>

**Tablica 2.** Sadržaj glavnih sastojaka (iznad 2%) eteričnog ulja pelina (*Artemisia vulgaris* L., %) dobivenih različitim postupcima ekstrakcije<sup>26</sup>

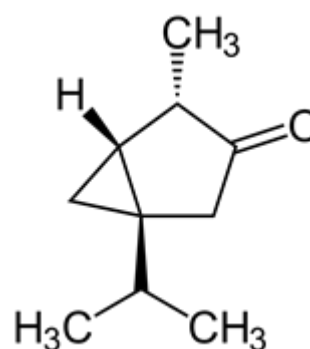
Redni broj	Sastojak	% (w/w) u eteričnom ulju
1.	$\alpha$ -tujen	2,97
2.	$\alpha$ -tujon	10,24
3.	$\beta$ -tujon	13,48
4.	sabinen	2,66
5.	$\beta$ -mircen	2,57
6.	<i>cis</i> -6,7-	6,87

	epoksomicin	
7.	1,8-cineol	0,9
8.	kamfor	10,78
9.	artemizin keton	4,91
10.	$\alpha$ -terpineol	4,37
11.	linalool	4,97
12.	terpin-4-ol	5,17
13.	tujon acetat	22,4

Tujon je monoterpenski keton i koji se javlja pretežno u dva dijastereomerna (epimerna) oblika: (-)- $\alpha$ -tujon i (+)- $\beta$ -tujon (slike 2 i 3).<sup>27</sup>



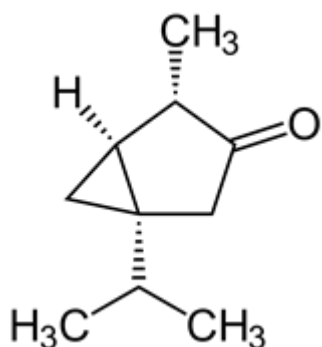
Slika 2. (-)- $\alpha$ -tujon<sup>27</sup>



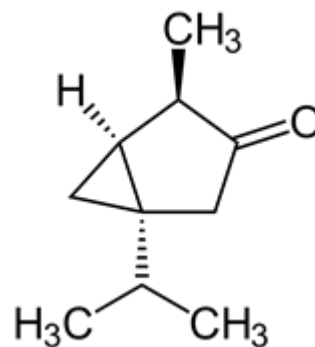
Slika 3. (+)- $\beta$ -tujon<sup>27</sup>

Iako je najpoznatiji kao kemijski spoj u jakom alkoholnom piću apsintu, malo je vjerojatno da će biti odgovoran za navodne stimulativne i psihoaktivne učinke apsinta zbog prisutnih malih količina.<sup>28</sup>

Osim prirodno prisutnih (-)- $\alpha$ -tujona i (+)- $\beta$ -tujona, moguća su još dva oblika: (+)- $\alpha$ -tujon (slika 4) i (-)- $\beta$ -tujon (slika 5). Pronađeni su u prirodi 2016. godine, u biljci **ljekovita kadulja** (*Salvia officinalis* L.).<sup>29</sup>



Slika 4. (+)- $\alpha$ -tujon<sup>27</sup>



Slika 5. (-)- $\beta$ -tujon<sup>27</sup>

#### 1.4.2.2. Drugo aromatično bilje

**Anis**, *Pimpinella anisum* L., (slika 6) se često koristi u proizvodnji alkoholnih pića. Destilat sjemena anisa priprema se tako da se mljeveno sjeme prelije 40 %-tnim alkoholom i destilira u destilacijskom uređaju. Koristi se srednja frakcija destilata koja čini približno 70 % ukupnog destilata. Destilat sjemena koristi se u proizvodnji gorkih likera. Glavni je nositelj mirisa i okusa u poznatim alkoholnim pićima kao što je mastika (tursko piće), ouzo (grčko piće) i aquavit (dansko piće).<sup>30</sup> U Republici Hrvatskoj se tradicionalno proizvodi rakija *Anižeta* na otoku Korčuli.

Anis sadrži eterično ulje koje se sastoji uglavnom od *trans*-anetola, a sadrži i anisaldehyd, anisketon, anisevu kiselinu, *p*-metoksiacetofenon,  $\alpha$ -terpineol i *D*-limonen. Plod anisa vrlo je aromatičnog mirisa te slatkastog okusa. Aktivnost ploda ovisi o sastavu i sadržaju eteričnog ulja.<sup>31</sup>



Slika 6. Anis (*Pimpinella anisum* L.)<sup>32</sup>

**Koromač**, *Foeniculum vulgare* Mill., (slika 7) je biljka koja raste na području Južne Europe. To je biljka s malim prugastim i razgranatim stabljikama te plavo-zelenim igličastim listovima. Cvate od srpnja do listopada.<sup>33</sup>

Kao lijek primjenjuje se čitava biljka i sjemenke. Sadrži eterično i masno ulje, proteine, flavonoide i kumarine. Eterično ulje slatkog komorača sadrži 80-90 % *trans*-anetola, 4,2-5,4 % limonena, 0,4-0,8 %  $\alpha$ -pinena te manje od 1 % (+)-fenhona, metilkavikola, anisaldehida, fenikulina, terpineola i različite terpenke ugljikovodike u manjim količinama. Eterično ulje gorkog komorača za razliku od slatkog komorača ima manji sadržaj anetola i veći udio fenhona.<sup>31</sup>



**Slika 7.** Koromač (*Foeniculum vulgare* Mill.)<sup>34</sup>

Komorač se upotrebljava u medicini za lakše iskašljavanje i kao umirujuće sredstvo za djecu. Odlično je sredstvo protiv nadimanja i vjetrova u crijevima. Vrlo često ulazi u sastav raznih čajnih mješavina.<sup>30</sup>

**Kadulja**, *Salvia officinalis* L., (slika 8) je autohtona ljekovita biljka Hrvatske. Sadržaj i sastav eteričnog ulja „dubrovačke žalfije“ mjerilo je svjetske kvalitete. Ljekovita svojstva kadulje su u otklanjanju dišnih tegoba jer dezinficira sluznicu. Macerat kadulje rjeđe se koristi za pripremu likera i travarica dok je destilat zastupljen u mnogim biljnim likerima pa i travaricama. Kadulja, bilo u obliku destilata ili macerirana, je vrlo goraka.<sup>35</sup>

Eterično ulje kadulje je koncentrirana smjesa hlapljivih i biološki aktivnih spojeva koje treba koristiti s velikim znanjem. Dobiva se destilacijom iz biljnog

materijala. Eterično ulje kadulje ima mnoga ljekovita djelovanja. Najčešće sadrži: salviol, salven, tujon,  $\alpha$ -pinen, 1,8-cineol, borneol, kamfor, a biljka još i tanine, gorke tvari, bjelančevine, škrob, gumu, ljepljive tvari, kalcijev oksalat, soli fosforne kiseline, kalijeve i kalcijeve soli.<sup>35</sup>



**Slika 8.** Kadulja (*Salvia officinalis* L.)<sup>36</sup>

**Paprena metvica, *Mentha piperita* L.,** (slika 9) sadrži mnogobrojne djelotvorne i aromatične spojeve kao što su: 0,8-4 % eteričnog ulja s mentolom, mentil-acetatom, mentonom, pulegonom i mentofuranom. U lišću ima 1-2 % ružmarinske kiseline, fenolnih kiselina, triterpenskih kiselina: oko 0,3 % ursolske i oko 0,1 % oleanolske kiseline, flavonoida: rutina, hesperetina i mentozida, zatim karotenoida, betaina, kolina i mineralnih soli. Paprena metvica djeluje na smirenje bolova i uklanja grčeve. Uklanja nervozne smetnje, nervozno lupanje srca i pridonosi uklanjanju svih hipohondričnih duševnih stanja koja se pojavljuju uslijed grčeva i bolova.<sup>30</sup>



### Slika 9. Paprena metvica (*Mentha piperita* L.)<sup>37</sup>

Drugo aromatično bilje koje se koristi u proizvodnji pelinkovca:

**Anđelika** (*Angelica archangelica*), **borovica** (*Juniperus communis*), **idirot** (*Acorus calamus* L.), **iva trava** (*Teucrium montanum* L.), **izop ili miloduh** (*Hyssopus officinalis* L.), **jagoda šumska** (*Fragaria vesca* L.), **kičica** (*Centaureum umbellatum* Gillb), **korijander** (*Coriandrum sativum* L.), **majčina dušica** (*Thymus serpyllum* L.), **matičnjak** (*Melissa officinalis* L.), **mažuran** (*Majorana hortensis* Moench), **neven** (*Calendula officinalis* L.), **oman** (*Inula helenium* L.), **ružmarin** (*Rosmarinus officinalis* L.), **sikavica** (*Silybum marianum* L.), **maslačak** (*Taraxacum officinale* L.), **muškantni oraščić** (*Myristica fragrans* L.), **klinčić** (*Syzygium aromaticum* L.), **cimet** (*Cinnamomum verum* L.), **origano** (*Origanum vulgare* L.) i mnoge druge.<sup>16</sup>

## 1.5. Arome jakih alkoholnih pića

Komponente arome jakih alkoholnih pića klasificiraju se u četiri skupine:

- spojevi primarne arome,
- spojevi sekundarne arome,
- tvari arome nastale tijekom destilacije i
- tvari arome nastale tijekom dozrijevanja.<sup>38</sup>

Viši alkoholi, prisutni u višim koncentracijama, kao i komponente prisutne u nižim koncentracijama imaju važnu ulogu u konačnoj aromi. Kvasci proizvode sumporne spojeve koji su jako bitni za aromu pića.<sup>39</sup>

### 1.5.1. Spojevi primarne arome

Spojevi primarne arome potječu iz biljaka u kojima nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka djelovanjem enzima tijekom zrenja i dozrijevanja biljnog tkiva iz prekursora arome. Primarna aroma sadrži mnogo spojeva koji su prisutni s različitim udjelima. Prilikom proizvodnje biljnih rakija treba paziti da ovi spojevi budu zadržani u što većoj količini.<sup>40</sup>

Od hlapljivih spojeva jako su važne fenolne i terpenске tvari koje su nosioci cvjetnog mirisa.<sup>41</sup>

Naziv terpeni potječe od terpentina, hlapljive tekućine koja se dobiva destilacijom smole drveta bora. Terpeni ili terpenoidi su velika i strukturno vrlo raznolika grupa prirodnih organskih spojeva čiji je osnovni strukturni element spoj od pet ugljikovih atoma, 2-metilbuta-1,3-dien, trivijalnog imena izopren. Pravilni terpeni sastoje se od izoprenskih jedinica ili C5 jedinica povezanih po načelu "glava na rep". Prema takozvanom izoprenskom pravilu koje je ustanovio Otto Wallach 1881. razgranati dio jedne C5 jedinice povezuje se na nerazgranati dio druge C5 jedinice. Terpeni mogu biti i nepravilni, a njihove C5 jedinice ne povezuju se po načelu „glava na rep“.<sup>42</sup>

Moderna definicija terpena je da su to ugljikovodici biljnog porijekla kemijske formule  $(C_5H_8)_n$  te njihovi oksidirani, hidrogenirani i dehidrogenirani derivati. Prema funkcijskim skupinama terpeni mogu biti terpeniski ugljikovodici, alkoholi, fenoli, kiseline, esteri, oksidi, aldehidi, ketoni i drugi.<sup>43</sup>

Ugljikovodici su česta grupa spojeva u eteričnim uljima. Oni mogu biti monoterpeni (10 ugljikovih atoma), seskviterpeni (15 ugljikovih atoma) i diterpeni (20 ugljikovih atoma). Dalje se dijele na acikličke, poput  $\beta$ -mircena iz ulje **tršlje** (*Pistacia lentiscus*), cikličke poput  $\alpha$ -terpinena i limonena iz ulja usplođa limuna, te  $\alpha$ -pinena iz eteričnih ulja raznih borova. *p*-Cimen je vrlo čest aromatski ugljikovodik u **timijanu** iz kojeg nastaju vrlo važni fenoli, timol i karvakrol. Seskviterpeni ugljikovodici mogu biti aciklički poput raznih farnezena, monociklički kao germakren D iz ylang ylang-a, bicklički kadineni otkriveni su u ulju **smrče** (*Juniperus oxycedrus*).<sup>44</sup>

Monoterpeni alkoholi i fenoli su uz ugljikovodike i etere (okside) najčešće sastavnice eteričnih ulja s biološkom aktivnosti. Monoterpeni nastaju povezivanjem dvije izoprenske jedinice. Geraniol je glavna sastavnica eteričnog ulja **palmarose** (*Cymbopogon martinii*), a terpinen-4-ol komercijalnog kemotipa **čajevca** (*Melaleuca alternifolia*). (-)-Mentol se nalazi u eteričnom ulju paprene **metvice** (*Mentha piperita* L.). U eteričnom ulju **timijana** (*Thymus satureioides* L.) nalazi se borneol.<sup>45</sup>

Esteri nastaju reakcijom karboksilne kiseline i alkohola. U prirodi nastaju pod utjecajem enzima. Esteri u eteričnim uljima su obično malih molekulskih masa, ugodnog, intenzivnog mirisa tako da eterična ulja bogata njima imaju ugodan, slatkast ili cvjetni miris. Reakcija nastajanja estera je ravnotežna, ester i voda kontinuirano



nastaju, ali se istodobno i ester raspada. Esteri u eteričnim uljima mogu biti građeni od mono- i seskvi-terpenskih gradivnih spojeva ili od neterpenskih spojeva (nisu sintetizirani u reakcijama sinteze terpena). Kemijski se dijele po broju C-jedinica.<sup>46</sup>

Aldehidi su važna grupa kemijskih spojeva u prirodi i organskoj sintetskoj kemiji, a karakterizira ih njihova snažna reaktivnost. Geranial i neral su dvije molekule koje imaju zajednički naziv citral. Eterično ulje **limunske trave** (*lemongrassa*, *Cymbopogon flexuosus*) sadrži 25-35% nerala i 35-47% geraniala. Citronelal je dominantni spoj eteričnog ulja **limunskog eukaliptusa** (*Eucalyptus citriodora*) u kojem ga bude više od 75%. Mirtenal je spoj koji se nalazi u eteričnom ulju **mirte** (*Myrtus communis* L.). Kuminaldehid (kuminal) nalazi se u sastavu eteričnog ulja sjemenki poznatog začina **kumina** (*Cuminum cyminum* L.), a *trans*-cinamaldehyd dominantni je sastojak eteričnog ulja kore pravog **cimetovca** (*Cinnamomum Schaeff.*).<sup>47</sup>

Ketoni sadrže karakterističnu keto (karbonilnu) skupinu u svojoj strukturi. Neka najtoksičnija ulja sadrže ketone, ali neki ketoni su potpuno netoksični kao npr. verbenon. U eteričnom ulju gorkog **pelina** (*Artemisia absinthium* L.) nalazi se artemizija keton s vrlo toksičnim  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujonom.  $\alpha$ -Tujon glavni je spoj eteričnog ulja **tuje** (*Thuja occidentalis* L.). U eteričnom ulju ljekovite **kadulje** (*Salvia officinalis* L.) prisutni su  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujon. Pulegon je toksičan spoj koji se nalazi u mirisnoj (barskoj) **metvici** (*Mentha pulegium* L.). Kamfor je jedan od najpoznatijih spojeva koji se koristi u farmaceutskoj industriji u pripravcima za bolne mišiće i zglobove te za dišni sustav. Na tržištu je prisutan sintetski kamfor.<sup>48</sup>

Metoksifenoli su metilni eteri fenola. Vodik u fenolnoj skupini djeluje kao kiselina, daje svojstvo iritativnosti i omogućuje antimikrobno djelovanje. Metoksifenoli su zbog manjka vodika manje iritativni i slabijeg antimikrobnog djelovanja. Najpoznatiji metoksifenoli su estragol (metil-kavikol) i *E*-anetol. Estragol je prisutan u eteričnom ulju **bosiljka** (*Ocimum basilicum* L.) i **estragona** (*Artemisia dracuncululus* L.), dok se *E*-anetol nalazi u eteričnim uljima **komorača** (*Foeniculum vulgare* Mill.) i **anisa** (*Pimpinella anisum* L.).<sup>49</sup>

Cikloeteri (oksidi) su vrlo česti spojevi u eteričnim uljima. Glavni predstavnik cikloetera je 1,8-cineol koji se nalazi u mnogim eteričnim uljima. Spomenuti spoj je monoterpeni cikloeter koji se nalazi u eteričnim uljima mnogih vrsta rodova

**eukaliptusa** (*Eucalyptus*), **čajevaca** (*Melaleuca*), ulju **ravensare** (*Cinnamomum camphora* L.) i **timijana** (*Thymus vulgaris* L.).<sup>50</sup>

Terpeni su kemijski spojevi karakteristični za aromatične sorte i glavni su nositelji tzv. primarnih ili sortnih aroma.<sup>51</sup> Najčešće se nalaze u višim biljkama, ali i u drugim organizmima kao što su gljive i vodeni organizmi. Između ostalog to su spojevi koji biljkama daju miris.<sup>43</sup>

U grožđu je primjerice identificirano preko 40 terpenskih spojeva, a među najmirisnijima su neki od monoterpenskih alkohola, poglavito linalol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol i citronelol. Olfaktivni pragovi tih spojeva su prilično niski.<sup>52</sup>

Miris linalola i geraniola obično se uspoređuje s mirisom ruže ili cvijeća općenito, a miris  $\alpha$ -terpineola s mirisom cvijeta ljiljana ili mirisom kamfora, te citronelol s mirisom limuna. Nadalje, olfaktivni utjecaj terpenskih spojeva je međuovisan tj. djeluju u sinergiji.<sup>53</sup>

Osjetilni prag terpena je relativno nizak. Visoka temperatura i nizak pH mogu dovesti do njihove oksidacije što negativno utječe na aromu.<sup>38</sup>

### **1.5.2. Spojevi sekundarne arome**

Pri stvaranju i formiranju sekundarnog aromatičnog profila glavnu ulogu ima alkoholna fermentacija. Dvije najvažnije skupine spojeva arome jakih alkoholnih pića su viši alkoholi i esteri.<sup>54</sup>

Viši alkoholi su alkoholi sa više od dva ugljikova atoma i kvantitativno su najzastupljeniji spojevi u destiliranim alkoholnim pićima. Nastaju kao usporedni proizvodi alkoholne fermentacije iz aminokiselina. Imaju veliki utjecaj na aromatični profil destiliranih pića.<sup>54</sup> U malim koncentracijama pridonose ugodnom okusu i mirisu dok u visokim koncentracijama negativno utječu na aromu destilata. Za aromu alkoholnih pića važni su 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, propan-1-ol i 2-feniletanol. Izobutanol (2-metilpropan-1-ol) i izoamilni alkohol (3-metilbutan-1-ol) nositelji su alkoholnog mirisa i mirisa otapala. Miris propan-1-ola opisuje se kao slatkast i ugodan dok visok sadržaj može ukazivati na kvarenje i podsjećati na otapalo. Udio butan-1-ola povezan je sa slabom kvalitetom sirovine te negativno utječe na okus. Heksan-1-ol potječe iz sirovine i u visokim koncentracijama

doprinosi zelenoj aromi. 2-Feniletanol je aromatski alkohol koji nastaje iz L-fenilalanina djelovanjem kvasaca. Ima nizak prag osjetljivosti. U malim koncentracijama doprinosi ugodnom okusu i mirisu ruže.<sup>41</sup>

Esteri su spojevi nastali reakcijom karboksilne skupine organske kiseline i hidroksilne skupine alkohola ili fenola. Ovi spojevi su vrlo bitni u formiranju aromatičnog potencijala rakije jer joj daju voćni karakter. Najznačajniji esteri u rakiji su etil-acetat i etil-laktat. U prvom toku se nalazi etil-acetat, dok je etil-laktat najčešće u zadnjem toku. U rakiji su značajni još i etilni esteri masnih kiselina nastali reakcijom etanola i prekursora zasićenih monokarboksilnih kiselina. Način provođenja destilacije može imati značajan utjecaj na prisutnost estera u rakiji. Većina estera ima nisku točku vrelišta i izdvajaju se u ranoj fazi destilacije pa je bitno kontrolirati u kojem će se trenutku prekinuti prvi tok destilacije. U vremenu između završene fermentacije i destilacije dolazi do nastanka estera između alkohola i kiselina sintetiziranih tijekom alkoholne fermentacije.<sup>38</sup>

Aldehidi i ketoni većinom nastaju kao popratni proizvodi alkoholne fermentacije. Acetaldehid je najzastupljeniji aldehid u alkoholnim pićima. Miris mu se opisuje kao iritirajući te odbojan pa nije poželjan u visokim koncentracijama. U malim koncentracijama ima voćnu aromu koja se povezuje s trešnjama, lješnjacima i prezrelim jabukama. Acetaldehid i ostali kratkolančani alifatski aldehidi imaju užegao, opor i miris po masnoći, stoga su nepoželjni u jakim alkoholnim pićima. Dugolančani aldehidi imaju ugodniju aromu te su prisutni u malim količinama.<sup>54</sup>

Najzastupljenija kiselina u jakim alkoholnim pićima je octena kiselina koja ima karakterističan okus i jak miris. Povišen udio ove kiseline pokazatelj je mikrobiološkog kvarenja, negativno utječe na aromu te doprinosi nastajanju povišenih udjela etil-acetata. Kratkolančane masne kiseline poput laurinske, kaprinske i kaprilne imaju neugodan miris na užegli maslac i pokvareni sir. Prisutnost u visokim koncentracijama znak je loše kvalitete alkoholnih pića.<sup>54</sup>

### **1.5.3. Tvari arome nastale tijekom destilacije**

Destilaciju je potrebno provesti u što kraćem roku kako se ne bi povećao udio metanola, kiselina, estera, aldehida i drugih nepoželjnih tvari te kako se ne bi izgubili poželjni spojevi sekundarne arome. U procesu destilacije mogu nastati i razni drugi

spojevi poput furfurala, heterocikličkih spojeva te spojeva sa sumporom. Furfural daje destilatu miris gorkih badema dok povećana koncentracija ovog spoja pojačava osjećaj peckanja i vrućine. Povećava se i udio estera, a aldehidi se mogu reducirati u alkohole. Reakcijom alkohola i aldehida mogu nastati spojevi koji doprinose aromi voćnih destilata.<sup>41</sup>

#### **1.5.4. Tvari arome nastale tijekom dozrijevanja**

Odležavanje destiliranih pića izuzetno je bitan faktor za konačnu karakterizaciju alkoholnih pića. Temelji se na ekstrakciji molekula iz drveta i njihovoj interakciji s tekućinom pri čemu nastaju novi spojevi i razgrađuju se postojeći. Približno 60% aromatičnih tvari prisutnih u konačnom proizvodu potječe iz drveta. Drvo se sastoji većinom od celuloze, hemiceluloze i lignina. Razgradnjom lignina nastaju aromatični aldehidi. Vanilin i siringin su važni za stvaranje specifičnog profila arome starog pića. Tijekom dozrijevanja dolazi do niza kemijskih reakcija oksidacije i esterifikacije.<sup>41</sup>

Pod djelovanjem vatre drvo mijenja svoju strukturu, šećeri sadržani u njemu se karameliziraju, oslobađaju se neke aromatične komponente koje će se pojaviti u piću s notama vanilije, kave, tosta, začina. Povećava se sadržaj furan aldehida u drvu, uglavnom furfurala, fenolnih aldehida (vanilin, sirinaldehid), (3-metil- $\gamma$ -oktalakton). Gotova bačva se ponovno loži, što pićima u njoj daje karakterističnu aromu svježeg kruha, kore, karamela i prženih badema. Ragrađnjom drvnih tvari smanjuje se ukupna količina ekstrahiranih tanina, obogaćuju se komponente, dobivaju se alkoholi više kvalitete.<sup>55</sup>

#### **1.6. Izolacija hlapljivih spojeva**

Profiliranje hlapljivih spojeva važan je korak u određivanju arome jakih alkoholnih pića. Hlapljivi spojevi nastaju tijekom fermentacije, destilacije, dozrijevanja i skladištenja alkoholnog pića, a na njih utječu različiti čimbenici poput vrste sirovine, tehnološkog procesa proizvodnje, uvjeta dozrijevanja i dr.<sup>56</sup>

Odabrana metoda izolacije treba osigurati izolaciju spojeva arome s minimalnim gubitcima i bez nastajanja neželjenih nusprodukata. U cilju dobivanja cjelovitog profila aromatičnih spojeva treba imati na umu sve prednosti i nedostatke različitih metoda izolacije hlapljivih spojeva.<sup>57</sup>

Metode izolacije hlapljivih spojeva mogu se podijeliti na:

- metode ekstrakcije otapalima
- destilacijske metode
- izolacija upotrebom mikrovalne ekstrakcije
- ultrazvučna ekstrakcija (ekstrakcija otapalima potpomognuta ultrazvukom)
- ekstrakcije superkritičnim i subkritičnim fluidima (ekstrakcija s CO<sub>2</sub>)
- tehnike „vršnih para“
- sorpcijske tehnike.<sup>56</sup>

### 1.6.1. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike omogućavaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na raspodjeli organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. Najpoznatije i najviše korištene tehnike su mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.<sup>57</sup>

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

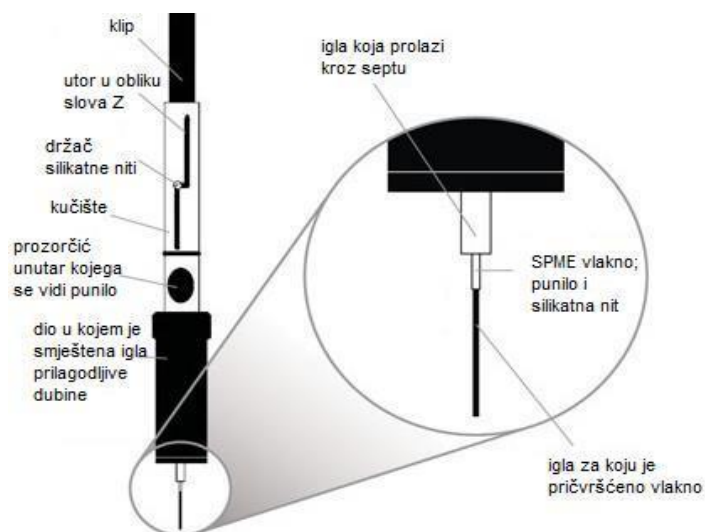
Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) je metoda koju su 1990. izumili dr. Janusz Pawliszyn i njegovi suradnici na Sveučilištu u Waterloo-u, Kanada.<sup>58</sup>

HS-SPME omogućuje uzorkovanje, ekstrakciju i koncentriranje u jednom koraku bez otapala, a njezino korištenje smanjuje vrijeme pripreme uzorka i povećava osjetljivost u odnosu na druge ekstrakcije. Stoga se može smatrati vrlo jednostavnom, učinkovitom i ekološki prihvatljivom metodom.<sup>59</sup>

Ova tehnika koristi silikonsko vlakno (duljine 1 do 2 cm) napravljeno od odgovarajućih polimera koje služi za sakupljanje hlapljivih spojeva uzorka (slika 10). Tip vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije, polarna vlakna apsorbiraju polarne spojeve, a nepolarna vlakna apsorbiraju nepolarne spojeve. Na tržištu postoji veliki broj različitih vrsta vlakana, a najčešće su u upotrebi njih četiri.<sup>60</sup> To su:

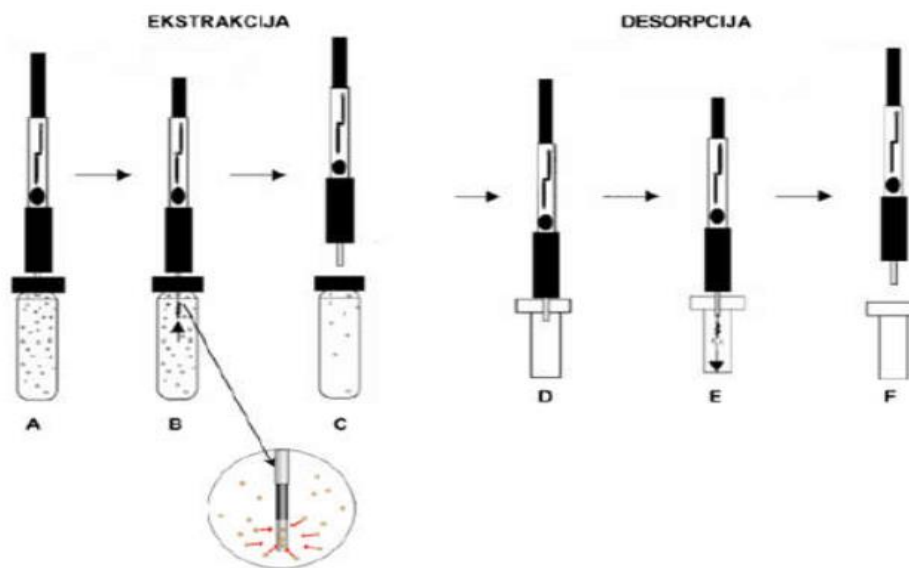
- polidimetilsiloksan (PDMS),
- polidimetilsiloksan-divinilbenzen (PDMS-DVB),

- karboksen-polidimetilsiloksan (CAR-PDMS) i
- polidimetilsiloksan-divinilbenzenkarboksen (PDMS-DVB-CAR).<sup>57</sup>



**Slika 10.** Silikonsko vlakno<sup>61</sup>

Na slici 11 prikazani su koraci HS-SPME metode. Nakon bušenja septuma bočice u kojoj je prethodno stavljena određena količina uzorka, izvlači se vlakno i uvodi u vršne pare iznad uzorka, a može se uroniti i u tekući uzorak. Nakon točno određenog vremena u kojem su se hlapljivi spojevi apsorbirali na prekrivaču vlakna, vlakno se uvlači u iglu, a zatim se igla uvodi u injektor plinskog kromatografa gdje se desorbira. SPME vlakno se re-kondicionira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa 5-15 min. Nedostaci ove tehnike su što je aromatični profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisan o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna, kao i o temperaturi i vremenu uzorkovanja, a neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve.<sup>62</sup>



Slika 11. Koraci ekstrakcije i desorpcije kod HS-SPME <sup>63</sup>

## 1.7. Analiza hlapljivih spojeva

Najviše korištena metoda za analizu hlapljivih spojeva je plinska kromatografija s masenim spektrometrom kao detektorom. Plinska kromatografija i masena spektrometrija su komplementarne metode, a njihovom kombinacijom postiže se osjetljivost tehnike u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari. <sup>64</sup>

### 1.7.1. Plinska kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, odnosno stacionarna, dok je druga pokretna, odnosno mobilna, i giba se u određenom smjeru. Mobilna faza može biti plin, tekućina ili fluid pri superkritičnim uvjetima. Kromatografija se u analitici koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje spojeva u uzorku. <sup>65</sup>

Plinska kromatografija je metoda separacije u kojoj se komponente uzorka razdjeljuju između stacionarne faze i mobilne plinske faze. Kao pokretna faza se koristi inertni plin nositelj dok je nepokretna faza selektivna tekućina velike viskoznosti ili selektivna krutina. Stoga se plinska kromatografija može podijeliti na:

- plinsko-čvrstu kromatografiju (GSC) u kojoj je stacionarna faza u krutom stanju i
- plinsko-tekućinsku kromatografiju (GLC) u kojoj je stacionarna faza tekućina. <sup>66</sup>

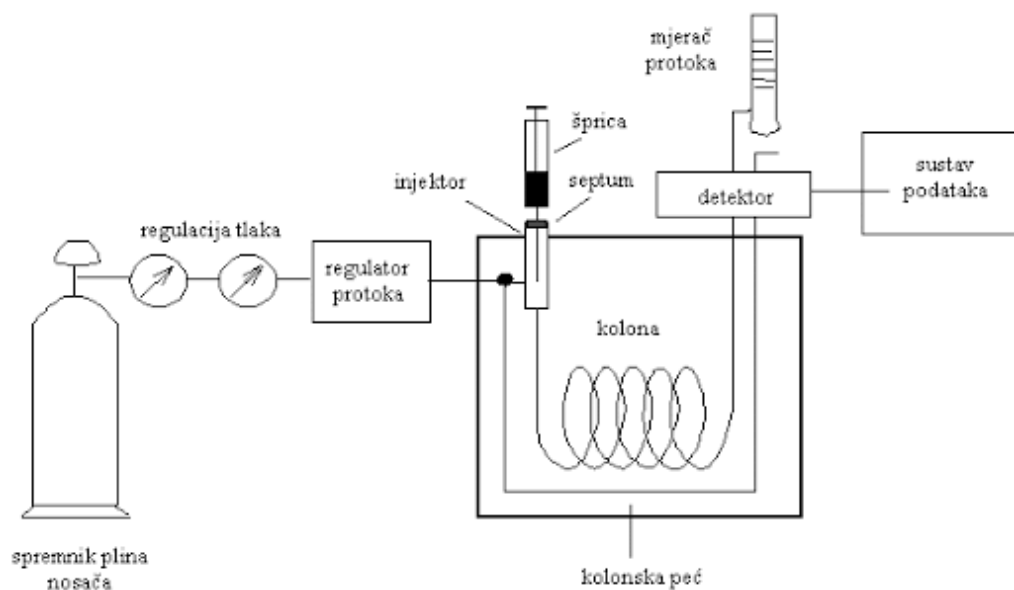
Tijekom postupka razdjeljivanja u plinskoj kromatografiji uzorak se prevodi u paru nakon čega ga pokretna faza, tj. plin nosi kroz kolonu. Razdjeljivanje komponenti se postiže na temelju relativnog tlaka para i afinitetu prema stacionarnoj fazi. Afinitet prema stacionarnoj fazi se može opisati izrazom koeficijenta razdjeljivanja  $K_c$ , prikazan formulom (1):

$$K_c = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

- $[A]_s$  predstavlja koncentraciju komponente A u stacionarnoj fazi
- $[A]_m$  predstavlja koncentraciju komponente A u mobilnoj fazi.

$K_c$  ovisi o temperaturi i kemijskim svojstvima stacionarne faze. Poboljšanje razdvajanja komponenti postiže se odabirom prikladne stacionarne faze i/ili regulacijom temperature.<sup>66</sup>

Na slici 12 dan je shematski prikaz plinske kromatografije. U plinskom kromatografu uzorak se unosi u injektor gdje se isparava i prenosi na kolonu pomoću plina nositelja. Komponente uzorka se zatim razdvajaju između mobilne i stacionarne faze unutar kolone. Nakon izlaska iz kolone plin nositelj i analit dolaze do detektora koji daje odziv na neko fizikalno-kemijsko svojstvo analita pri čemu nastaje električni signal, a računalo daje integrirani kromatogram.<sup>67</sup>



**Slika 12.** Shematski prikaz plinske kromatografije<sup>68</sup>



Kao plin nositelj najčešće se upotrebljavaju argon, helij, dušik ili vodik, a kao izvor plina koriste se cilindri i boce s plinom pod pritiskom te generatori plina. Koriste se plinovi izrazito visoke čistoće jer kvaliteta plina nositelja može utjecati na kvalitetu analize. Plin nositelj nema interakciju s uzorkom, inertan je. Selektivnost metode može se pripisati stacionarnoj fazi. Izbor plina ovisi o izboru detektora i o izboru kolone.<sup>41</sup>

Injektor služi za kvantitativno uvođenje uzorka u struju plina nositelja. Termostatiran je na temperaturu određenu metodom analize koja mora biti najmanje 20 °C viša od temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente u uzorku. Nakon što se uzorak unese u injektor dolazi do trenutnog isparavanja i miješanja s plinom nositeljem. Injektiranje uzoraka može biti ručno ili automatski pomoću autosamplera. Postoji nekoliko vrsta injektora, a najčešće se koristi „split-splitless“ injektor.<sup>41</sup>

Kolone mogu biti kapilarne ili punjene. Kod punjenih kolona nepokretna faza imobilizirana je na granuliranoj podlozi. Najčešći čvrsti nosač su dijatomejske zemlje. Kod kapilarnih kolona unutarnja stjenka kapilare je presvučena, izravno ili preko tankog sloja poroznog čvrstog nosača, tankim filmom tekuće nepokretne faze. Kapilara je otvorena cijev duljine i do 100 m, unutarnjeg promjera 0,15-1 mm.<sup>69</sup>

Detektori moraju omogućiti selektivno i/ili osjetljivo dokazivanje. Najčešći su plameno-ionizacijski detektor (FID), detektor termičke vodljivosti (TCD) i detektor zahvata elektrona (ECD). U obzir dolaze i termionski detektor te spektroskopski detektori. Za pouzdanu identifikaciju odijeljenih spojeva sve više se koristi sustav plinska kromatografija- masena spektrometrija, GC-MS.<sup>69</sup>

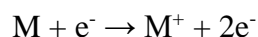
Obrada podataka se vrši na način da se signal sa detektora prenosi na računalo koji ga prevodi u digitalni oblik te ga bilježi kao pik na kromatogramu. Površina pika se određuje integriranjem površine ispod pika pomoću računala te se dobivaju kvantitativni podatci. Za određivanje stvarne količine komponente visina ili površina pika se uspoređuje sa standardom poznate koncentracije.<sup>41</sup>

Usporedbom sa ostalim kromatografskim metodama, plinska kromatografija predstavlja najbržu metodu separacije.<sup>67</sup> Zbog visoke efikasnosti plinski kromatograf omogućava razdvajanje komponenti složenih smjesa u prihvatljivom vremenu te daje precizne rezultate. Danas su dostupni razni detektori s visokom osjetljivošću, a mogu se kombinirati i s masenim spektrometrom.<sup>66</sup>

### 1.7.2. Spektrometrija masa (MS)

Spektrometrija masa je metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a zatim se ioni razdvajaju prema masi. Postupak se primjenjuje za određivanje relativnih molekulskih masa preko molekulskih formula. Ova metoda uključuje dva ključna postupka: prvi je ionizacija uzorka, potom slijedi razdvajanje i određivanje iona.

Spektrometar masa sastoji se od komore za bombardiranje u koju se unosi mala količina plinovitog uzorka. Unutrašnjost spektrometra je pod vakuumom pa se ioni mogu kretati od izvora do senzora bez sudara s drugim molekulama. Kod elektronske ionizacije uzorak se bombardira elektronima visoke energije pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivni ion koji se fragmentira:



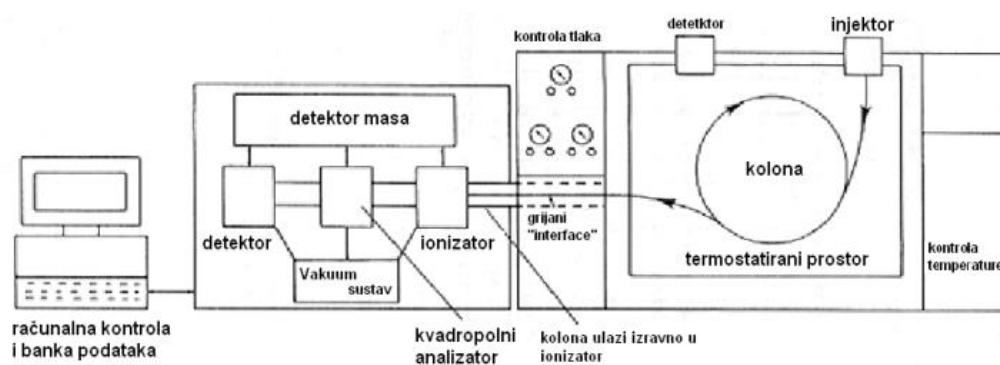
Nastaju različiti fragmenti te se analizom može zaključiti kakva je struktura spoja i kolika mu je molekulska masa. Dobiveni ioni se razvrstavaju u analizatoru prema intenzitetu i omjeru  $m/z$ , a na osjetljivom dijelu analizatora registriraju se kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala. Tako se dobiva spektar masa koji se uglavnom prikazuje kao linijski dijagram s odnosom relativnog intenziteta i omjera mase i naboja fragmenta ( $m/z$ ). Tumačenje samog fragmentiranja važno je za dokazivanje spoja.<sup>69</sup>

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

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (slika 13) omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine uzorka. Kod ove tehnike spektrometar masa djeluje kao vrlo osjetljiv detektor za plinsku kromatografiju. Spektrometar masa može djelovati kao opći kada detektira sve fragmente  $m/z$  u zadanom intervalu ili vrlo selektivno kada detektira samo određene fragmente  $m/z$  koji su karakteristični za pojedinu strukturu.<sup>70</sup>

Plinska kromatografija je uspješna metoda za separaciju i kvantizaciju međutim nepouzdana je za kvalitativno određivanje gdje je spektrometrija masa skoro savršena.<sup>66</sup> Kombinacijom ovih dviju metoda može se postići visoka osjetljivost te se mogu analizirati smjese s velikim brojem komponenti relativno velikom brzinom. Komponente smjese odjeljuju se u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa, zatim odijeljene komponente odlaze plinom nositeljem u detektor.<sup>70</sup>

Za svaki odijeljeni spoj vezani sustav GC-MS daje dva važna podatka za identifikaciju spoja, a to su spektar masa, vrijeme zadržavanja spoja na koloni ili retencijsko vrijeme.<sup>71</sup> Dobiveni spektar masa uspoređuje se s računalnom bazom spektara i određuje se postotak slaganja na osnovu čega se identificira spoj. Vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni također je važan podatak za identifikaciju spoja.



**Slika 13.** Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS<sup>43</sup>

Navedene tehnike izolacije (HS-SPME) i analize (GC-MS) već su uspješno primijenjene u analitičkim istraživanjima usmjerenim na analizu hlapljivih spojeva iz različitih uzoraka hrane kao što su biljna ulja, alkoholna pića, mesne prerađevine, ocat ili riba. Međutim, metodologija do danas nije na odgovarajući način razvijena za proizvode kao što su sirova žestoka pića. Stoga postoji potreba za poboljšanjem metoda kontrole kvalitete ovih poluproizvoda (sirovi alkoholni poljoprivredni destilati) u industrijskoj praksi.<sup>72</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Aparatura

Pri provedbi eksperimentalnog dijela ovoga rada korištena je sljedeća aparatura:

- tehnička vaga Kern 572
- magnetska miješalica, Heidolph MR her-Standard s termostatom Heidolph EKT 3001, Njemačka
- držač za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi, Supelco Co., SAD
- sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD)
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies, Santa Clara, SAD: plinski kromatograf model GC 7890 A i spektrometar masa model MS 5975.

### 2.2. Materijal

Kemijska analiza provedena u svrhu identifikacije hlapljivih spojeva arome je provedena na pet uzoraka likera pelinkovca kupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Tablica 3 prikazuje oznake uzoraka likera pelinkovca. Dobiveni rezultati analize hlapljivih spojeva svih uzoraka predstavljaju srednju vrijednost od tri ponavljanja.

**Tablica 3.** Uzorci likera Pelinkovaca

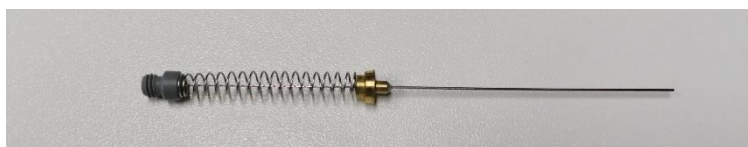
Redni broj	Oznaka uzorka
1.	A
2.	B
3.	C
4.	D
5.	E

### 2.3. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Osam mililitara uzorka stavljeno je u staklenu posudu od 15 mL. Posuda je hermetički zatvorena teflonskom PTFE/silikon septom te postavljena u vodenu kupelj na 40 °C, a sadržaj je miješan pomoću magnetske miješalice (Heidolph MR Her-Standard, 1000 o/min; slika 15).

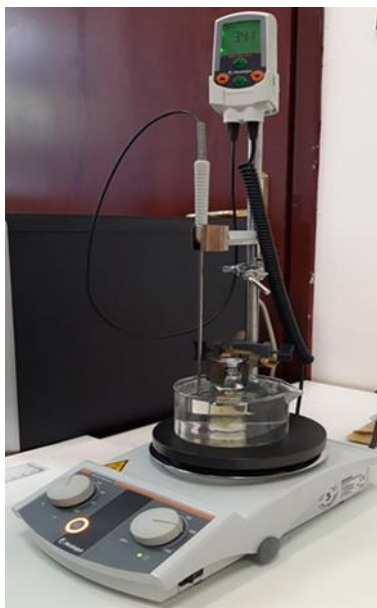
Prije upotrebe vlakno je aktivirano kondicioniranjem u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD). Nakon kondicioniranja, vlakno je odmah korišteno za izolaciju vršnih para uzorka.

Za izolaciju hlapljivih spojeva iz uzoraka likera pelinkovaca korišteno je sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (slika 14).



**Slika 14.** Sivo vlakno za HS-SPME (Izvor: autor)

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu s uzorkom te je provedena ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC injektor (250 °C, 7 min) gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu. Injektiranje uzoraka provodilo se ručno pomoću držača za HS-SPME.



**Slika 15.** Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi HS-SPME (Izvor: autor)

## **2.4. Plinska kromatografija-spektrometrija masa**

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Za plinsku kromatografiju korišten je plinski kromatograf Agilent Technologies GC 7890A u kombinaciji sa spektrometrom masa MS 5975 (slika 16). Za analize je korištena nepolarna HP-5MS kapilarna kolona.

### **Kolona HP-5MS:**

Stacionarna faza: 5 % fenil-metilpolisiloksan

Duljina: 30 m

Promjer: 0,25 mm

Debljina sloja stacionarne faze: 0,25  $\mu\text{m}$

### **Uvjeti rada plinskog kromatografa:**

- temperaturni program kolone: 3 minute izotermno pri 40 °C, od 40 do 200 °C s porastom od 3 °C/min
- temperatura injektora: 220 °C; „*splitless mode*“
- mobilna faza (plin nositelj): helij s protokom 1,3 mL min<sup>-1</sup>.

### **Uvjeti rada spektrometra masa:**

- energija ionizacije: 70 eV

- temperatura ionskog izvora: 230 °C
- interval snimanja spektara: 30-300 masenih jedinica.

Za svaki uzorak dobiveni su sljedeći podatci:

- kromatogram ukupne ionske struje
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima tj. udio površine pika u ukupnoj površini kromatograma
- vrijeme zadržavanja svake komponente
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje (sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postocima).

Identifikacija dobivenih pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima komercijalne biblioteke masenih spektara (Wiley 9 MS library i NIST14) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.



**Slika 16.** Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

(Izvor: autor)

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Hlapljivi spojevi pelinkovca

Hlapljivi spojevi analiziranih pelinkovaca određeni su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) na koloni HP-5MS. Rezultati ispitivanja prikazani su u tablicama 4-8. Spojevi u tablicama su poredani prema redoslijedu eluiranja (retencijsko vrijeme) sa kolone HP-5MS. Udio svakog spoja u uzorku (%) predstavlja udio površine pika toga spoja u ukupnoj površini svih pikova.

$t_R$  – vrijeme zadržavanja u minutama

**Tablica 4.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca A

Redni broj	Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ /min)	Kemijski spoj	Udio (%)
1.	5,273	etil-butanoat	0,87
2.	9,330	metoksi fenil oksim	0,36
3.	10,657	kamfen	2,12
4.	14,296	<i>p</i> -cimen	0,80
5.	14,474	limonen	1,38
6.	14,571	1,8-cineol	3,54
7.	17,306	fenhon	0,59
8.	18,216	$\beta$ -tujon	11,01
9.	18,788	$\alpha$ -tujon	11,96
10.	19,955	kamfor	1,31
11.	21,586	4-terpineol	0,29
12.	22,256	$\alpha$ -terpineol	1,34
13.	22,645	estragol	3,82



14.	25,145	<i>trans</i> -anetol	36,10
15.	27,073	sabinil-acetat	8,33
16.	27,445	karvakrol	0,13
17.	30,833	$\beta$ -burbonen	0,08
18.	31,205	$\beta$ -elemen	0,06
19.	31,514	etil-kaprat	0,22
20.	32,269	$\beta$ -kariofilen	0,38
21.	32,652	$\gamma$ -terpinen	0,09
22.	33,665	$\alpha$ -humulen	0,38
23.	35,004	$\beta$ -selinen	0,35
24.	35,387	$\beta$ -bisabolen	0,40
25.	36,154	$\delta$ -3-karen	0,15
26.	36,211	geranil-isovalerat	0,13
27.	36,555	$\delta$ -kadinen	0,06
28.	38,723	neril-acetat	0,34
<b>Ukupno identificirano (%)</b>			<b>86,57</b>

**Tablica 5.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca B

Redni broj	Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ /min)	Kemijski spoj	Udio (%)
1.	9,501	metoksi fenil oksim	0,18
2.	10,079	$\alpha$ -pinen	0,33
3.	10,686	kamfen	1,37
4.	12,843	mircen	0,57
5.	14,325	<i>p</i> -cimen	1,02
6.	14,537	limonen	8,13
7.	15,973	$\gamma$ -terpinen	0,55
8.	17,352	fenhon	1,85
9.	18,250	$\beta$ -tujon	5,75
10.	18,839	$\alpha$ -tujon	7,55
11.	17,978	kamfor	0,67
12.	21,609	4-terpineol	0,57
13.	22,278	$\alpha$ -terpineol	0,52
14.	22,685	estragol	3,97
15.	25,174	<i>trans</i> -anetol	43,21
16.	27,119	sabinil-acetat	5,81
17.	27,457	karvakrol	0,09
18.	30,175	ocimen	0,04
19.	30,478	$\alpha$ -kopaen	0,05
20.	30,850	$\beta$ -burbonen	0,13

21.	31,210	$\beta$ -elemen	0,18
22.	31,519	etil-kaprat	0,06
23.	31,628	aromadendren	0,18
24.	31,777	$\beta$ -kariofilen	0,59
25.	32,658	$\beta$ -mircen	0,12
26.	33,539	$\alpha$ -longipinen	0,06
27.	33,688	$\alpha$ -humulen	1,01
28.	34,684	$\alpha$ -amorfen	0,20
29.	34,827	$\alpha$ -murolen	0,27
30.	35,027	$\beta$ -selinen	1,71
31.	35,393	leden	0,87
32.	36,223	geranil-isovalerat	0,20
33.	36,560	$\delta$ -kadinen	0,60
34.	38,729	neril-acetat	0,53

---

**Ukupno identificirano (%)** **88,97**

**Tablica 6.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku Pelinkovca C

Redni broj	Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ /min)	Kemijski spoj	Udio (%)
1.	3,774	fenil-benzoat	3,68
2.	10,085	$\alpha$ -pinen	0,35
3.	11,905	sabinen	0,32
4.	12,849	mircen	0,65
5.	14,737	limonen	52,82
6.	15,984	$\gamma$ -terpinen	0,25
7.	17,420	terpinolen	0,18
8.	18,199	$\beta$ -tujon	2,78
9.	18,765	$\alpha$ -tujon	11,26
10.	19,875	$\alpha$ -felandren	0,15
11.	20,499	<i>p</i> -menton	2,11
12.	21,271	lavandulol	0,06
13.	21,437	mentol	1,56
14.	21,598	4-terpineol	0,23
15.	22,639	estragol	0,09
16.	22,759	etil-kaprilat	0,76
17.	23,062	dekanal	0,57
18.	24,487	pulegon	0,03
19.	24,642	neral	0,07
20.	25,300	$\alpha$ -terpineol	0,09

21.	26,015	citral	0,10
22.	26,616	<i>trans</i> -anetol	1,66
23.	27,062	sabinil-acetat	7,75
24.	27,457	karvakrol	0,06
25.	30,478	$\alpha$ -kopaen	0,05
26.	30,839	$\beta$ -burbonen	0,05
27.	30,993	nerol	0,05
28.	31,525	etil-kaprat	0,49
29.	32,275	$\beta$ -kariofilen	0,31
30.	33,677	$\alpha$ -humulen	0,17
31.	35,010	$\beta$ -selinen	0,27
32.	35,376	neril-propionat	0,22
33.	36,148	geranil-isovalerat	0,35
34.	36,555	$\delta$ -kadinen	0,07
35.	38,729	neril-acetat	0,36

---

<b>Ukupno identificirano (%)</b>			<b>89,98</b>
----------------------------------	--	--	--------------

**Tablica 7.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca D

Redni broj	Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ /min)	Kemijski spoj	Udio (%)
1.	4,163	fenil-benzoat	12,73
2.	9,513	metoksi fenil oksim	0,67
3.	14,308	<i>p</i> -cimen	0,33
4.	14,491	limonen	3,61
5.	18,725	$\beta$ -tujon	0,64
6.	20,110	isopulegol	0,23
7.	20,527	<i>p</i> -menton	25,76
8.	21,494	mentol	11,10
9.	22,650	estragol	0,17
10.	22,278	$\alpha$ -terpineol	0,25
11.	22,759	etil-kaprilat	0,32
12.	24,481	pulegon	0,26
13.	25,145	<i>trans</i> -anetol	4,60
14.	25,380	feniletil-acetat	0,20
15.	27,073	sabinil-acetat	7,85
16.	27,245	etil-pelargonat	0,24
17.	30,844	$\beta$ -burbonen	0,38
18.	31,210	$\beta$ -elemen	0,17
19.	31,519	etil-kaprat	0,16
20.	34,987	kurkumen	0,17

21.	36,154	$\beta$ -mircen	0,11
22.	38,735	$\beta$ -pinen	0,12
<b>Ukupno identificirano (%)</b>			<b>65,82</b>

**Tablica 8.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca E

<b>Redni broj</b>	<b>Vrijeme zadržavanja (<math>t_R</math> /min)</b>	<b>Kemijski spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	3,728	fenil-benzoat	4,99
2.	10,380	kamfen	0,62
3.	14,296	<i>p</i> -cimen	0,81
4.	14,474	limonen	0,64
5.	14,571	1,8-cineol	4,04
6.	17,306	$\alpha$ -tujon	11,71
7.	18,216	$\beta$ -tujon	11,11
8.	19,955	kamfor	2,98
9.	21,586	4-terpineol	0,20
10.	22,256	$\alpha$ -terpineol	0,80
11.	22,645	estragol	6,20
12.	25,145	<i>trans</i> -anetol	39,20
13.	27,073	sabinil-acetat	2,85
14.	31,514	etil-kaprat	0,24
15.	32,269	$\beta$ -kariofilen	0,04
16.	33,665	$\alpha$ -humulen	0,26
17.	35,004	$\beta$ -selinen	0,03
18.	35,387	leden	0,57
19.	38,723	neril-acetat	0,06
<b>Ukupno identificirano (%)</b>			<b>85,04</b>



## 4. RASPRAVA

Kemijska analiza spojeva arome daje podatke o kvaliteti proizvoda. Na temelju tih podataka mogu se poboljšati određeni postupci u proizvodnji koji će osigurati ujednačenu kvalitetu proizvoda.<sup>38</sup>

Hlapljivi organski spojevi su spojevi koji pri standardnim uvjetima imaju visoki tlak para kao rezultat niske točke vrelišta, zbog čega lako dolazi do njihovog isparavanja ili sublimacije već pri vrlo blagim uvjetima rada.<sup>73</sup>

Ispitivanja eteričnih ulja biljke pelin (*Artemisia absinthium* L.) koja su se vodila u Argentini, Estoniji, Grčkoj, Litvi, Italiji, Španjolskoj, Ukrajini, Francuskoj, SAD-u, Srbiji, Crnoj Gori, Hrvatskoj i mnogim drugim zemljama su pokazala znatno različite rezultate. Razlike se povezuju s:

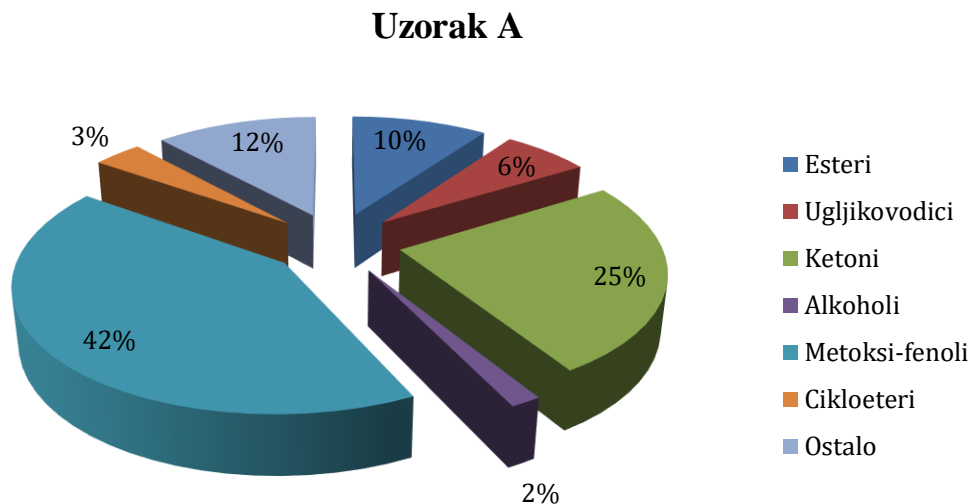
- geografskim položajem i klimom
- vrstom tla
- uvjetima sušenja
- načinu skladištenja.<sup>74</sup>

Imajući to na umu i znajući kako je gorki pelin samo jedna od mnogih biljaka koje se koriste za proizvodnju pelinkovca, te različitim tehnologijama proizvodnje pojedinih proizvođača, očekivano je da će rezultati ispitivanih uzoraka uvelike varirati.

Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva iz pet uzoraka biljnih likera pelinkovca različitih proizvođača prisutnih na tržištu Republike Hrvatske te usporediti dobivene rezultate. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je metoda mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Izolirani hlapljivi spojevi identificirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Rezultati analiza prikazani su tablicama 4-8.

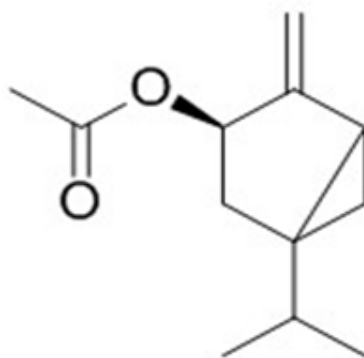
Pored već prethodno prikazanih tabličnih rezultata, prikazani su i grafički na slikama 17, 19, 21, 23 i 25, gdje su hlapljivi spojevi kategorizirani po funkcijskim skupinama: ugljikovodici, monoterpenski alkoholi, monoterpenski fenoli, esteri, monoterpenski aldehidi, monoterpenski ketoni, ciklički monoterpenski eteri i derivati metoksifenola. Zbog jednostavnijeg zapisa u grafičkom obliku koriste se izrazi:

ugljikovodici, alkoholi, fenoli, esteri, aldehidi, ketoni, cikloeteri i metoksifenoli. Kemijske skupine s udjelom ispod 1% te neidentificirani spojevi su kategorizirani pod Ostalo.



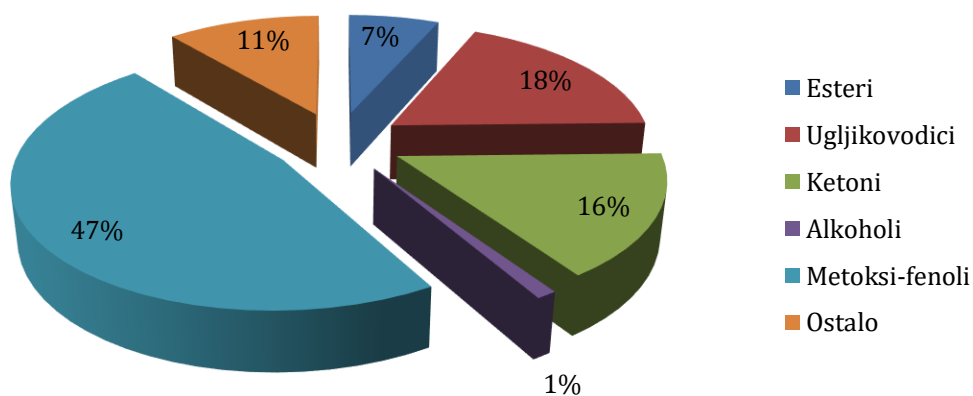
**Slika 17.** Zastupljenost hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca A

U uzorku A ukupno je identificirano 28 spojeva koji čine 86,57 % od ukupne površine kromatograma (slika 17). Najzastupljeniji spojevi pripadaju skupini metoksifenola s monosupstituiranim derivatom metoksifenola spojem *trans*-anetolom (36,10 %) te monoterpenskim ketonima  $\alpha$ -tujonom (11,96 %) i  $\beta$ -tujonom (11,01 %). Značajni udio čine i esteri s monoterpenskim esterom sabinil-acetatom (8,33 %) (slika 18). Kvantitativno značajni spojevi identificirani u ovom uzorku su još monosupstituirani derivat metoksifenola estragol (3,82 %), ciklički monoterpenski eter 1,8-cineol (3,54 %), biciklički monoterpenski ugljikovodik drvenastog i smolastog okusa kamfen (2,12 %), monoterpenski ugljikovodik limonen (1,38 %), zatim monoterpenski alkohol  $\alpha$ -terpineol (1,34 %) te monoterpenski keton kamfor (1,31 %) koji je prodornog mirisa.



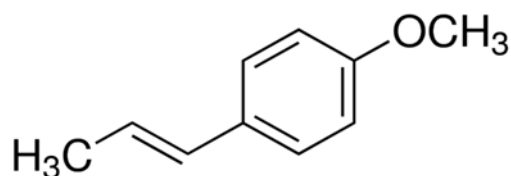
Slika 18. Sabinil-acetat<sup>75</sup>

### Uzorak B



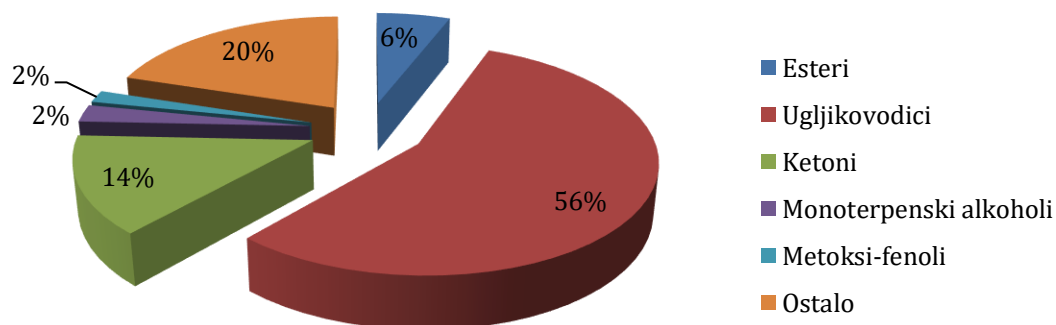
Slika 19. Zastupljenost hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca B

U uzorku B ukupno su identificirana 34 spoja koja čine 88,97 % od ukupne površine kromatograma. (slika 19). Spoj s najvećim udjelom je monosupstituirani derivat metoksifenola *trans*-anetol (43,21 %) (slika 20), koji je zaslužan za izrazito jak i aromatičan miris i okus samog likera. Potom slijede monoterpenški ugljikovodik limonen (8,13 %) te monoterpenški ketoni  $\alpha$ -tujon (7,55 %) i  $\beta$ -tujon (5,75 %). Znanan je udio monoterpenškog estera sabinil-acetata (5,81 %). Kvantitativno značajni spojevi su i keton fenhon (1,85 %), biciklički seskviterpenški ugljikovodik  $\beta$ -selinen koji je biljnog mirisa (1,71 %), biciklički monoterpenški ugljikovodik kamfen (1,37 %), ciklički monoterpenški ugljikovodik *p*-cimen (1,02 %) i ciklički seskviterpenški ugljikovodik  $\alpha$ -humulen (1,01 %) koji daje aromu drvenastog, svježeg, prozračnog i začinjelog.<sup>60</sup>



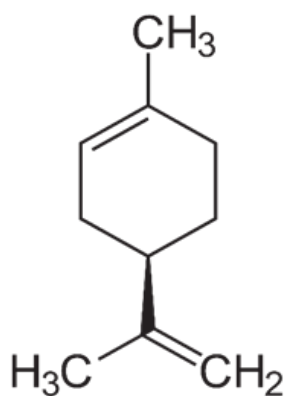
Slika 20. *trans*-Anetol<sup>76</sup>

### Uzorak C



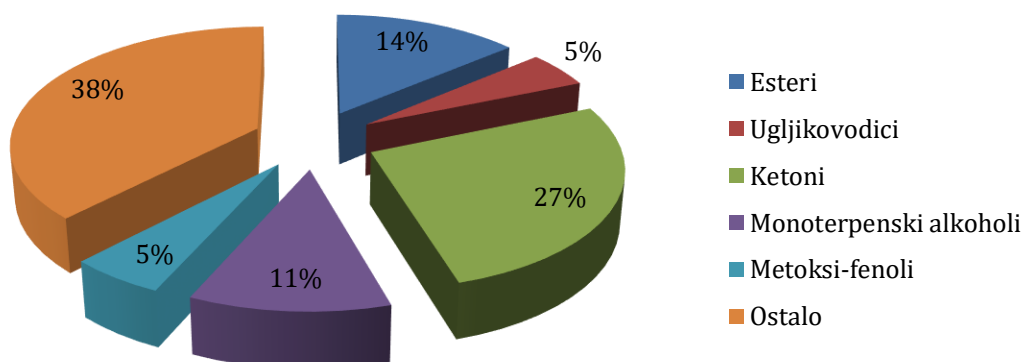
Slika 21. Zastupljenost hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca C

U uzorku C ukupno je identificirano 35 spojeva koji čine 88,98 % od ukupne površine kromatograma što ga čini najkompleksnijim uzorkom (slika 21). Karakterizira ga najveći udio cikličkog monoterpenkog ugljikovodika limonena (52,82 %) zbog čega ovaj biljni liker ima najviše izraženu citrusnu notu (slika 22). Od ostalih spojeva nalaze se monoterpenki ketoni  $\alpha$ -tujon (11,26 %) i  $\beta$ -tujon (2,78 %) te monoterpenki ester sabinil-acetat (7,75 %) i ester fenil-benzoat (3,68 %). Kvantitativno značajni spojevi identificirani u uzorku C su još i ciklički monoterpenki alkohol *p*-menton (2,11 %), monoterpenki fenol mentol (1,56 %) te monosupstituirani derivat metoksifenola *trans*-anetol (1,66 %).



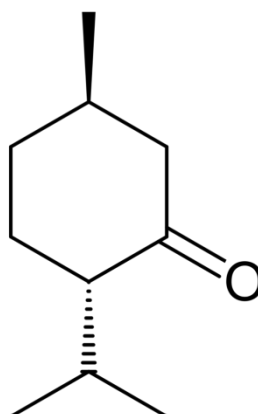
Slika 22. Limonen<sup>77</sup>

### Uzorak D



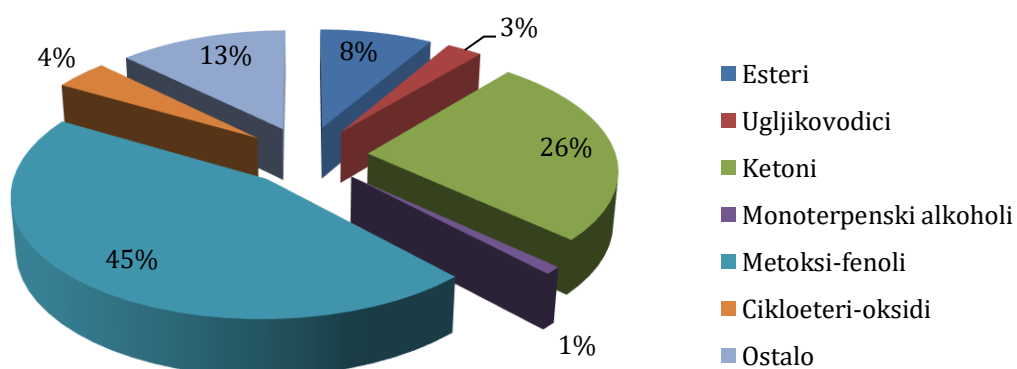
Slika 23. Zastupljenost hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca D

U uzorku D ukupno su identificirana 22 spoja koja čine 65,82 % od ukupne površine kromatograma što ga čini najslabije identificiranim uzorkom (slika 23). Odlikuje ga velika prisutnost cikličkog monoterpenškog alkohola *p*-mentona (slika 24) osvježavajuće arome (25,76 %), estera fenil-benzoata (12,73 %) te monoterpenškog fenola mentola (11,10 %). U uzorku su identificirani i monoterpenški ester sabinil-acetat (7,85 %), monosupstituirani derivat metoksifenola *trans*-anetol (4,60 %) i monoterpenški ugljikovodik limonen (3,61 %).



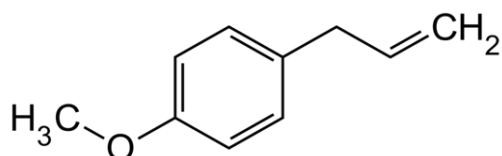
Slika 24. *p*-Menton<sup>78</sup>

### Uzorak E



Slika 25. Zastupljenost hlapljivih spojeva u uzorku pelinkovca E

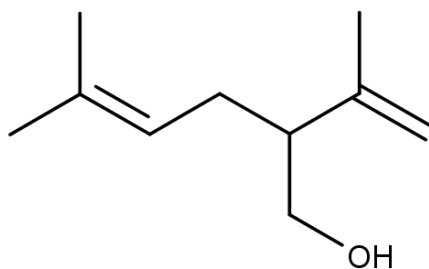
U uzorku E ukupno je identificirano 19 spojeva koji čine 85,04% od ukupne površine kromatograma (slika 25). U ovom uzorku je kvantitativno najmanji broj identificiranih aromatičnih komponenti. Najzastupljeniji spoj je monosupstituirani derivat metoksifenola *trans*-anetol (39,20 %), potom monoterpenški ketoni  $\alpha$ -tujon (11,71 %) i  $\beta$ -tujon (11,11 %). Kvantitativno značajni spojevi su i monosupstituirani derivat metoksifenola estragol (6,20 %) (slika 26), zatim ester fenil-benzoat (4,99 %), ciklički monoterpenški eter 1,8-cineol (4,04 %) i monoterpenški ester sabinil-acetat (2,85 %).



**Slika 26.** Estragol<sup>79</sup>

Od sveukupno 56 identificiranih hlapljivih spojeva, daleko najzastupljeniji kemijski spoj u svim uzorcima je *trans*-anetol. Karakterizira ga specifična pikantost s dugotrajnim slatkim okusom. Uzorak B predvodi s uvjerljivim udjelom od 43,21 % dok uzorci C i D imaju dosta manji udio *trans*-anetola od 1,66 % te 4,60 %. *Trans*-anetol je glavni sastojak nekoliko eteričnih ulja, uključujući zvjezdani anis, ulje sjemenki anisa i slatki komorač. Česta je komercijalna aroma u pecivima, slatkišima, sladoledu, žvakaćim gumama i alkoholnim pićima.<sup>76</sup>

Iznimna topljivost *trans*-anetola i česta upotreba spominjanih aromatičnih biljaka objašnjava toliku prisutnost *trans*-anetola. Monoterpenški alkohol lavandulol (slika 27) je jedino prisutan u uzorku C (0,06 %) što ukazuje na upotrebu lavande. Također, samo u tom uzorku identificirana su tri monoterpenška aldehida (citril, dekanal i neral) u zanemarivim koncentracijama. Stoga, može se pretpostaviti da je limunska trava (*Cymbopogon flexuosus*) sastavni dio ovog likera.<sup>80</sup>



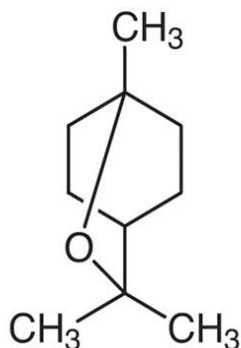
**Slika 27.** Lavandulol<sup>81</sup>

Identificirani su osnovni sastojci eteričnog ulja kadulje (*Salvia officinalis* L.), monoterpenški ketoni  $\alpha$  i  $\beta$ -tujon, ciklički monoterpenški eter 1,8-cineol (eukaliptol) i ciklički monoterpenški ugljikovodik limonen. Problematični spojevi  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujon (dugotrajna konzumacija izaziva psihičke poteškoće) su prisutni u svim uzorcima osim

kod uzorka D gdje se nalazi samo  $\beta$ -tujon u maloj koncentraciji od 0,64 %. Oba tujona su najzastupljenija u uzorcima A i E s udjelima oko 11 %.

Razine tujona u aromama su ograničene u Europskoj Uniji (Direktiva Vijeća 88/388/EEZ) i Velikoj Britaniji (SI 1992, br. 1971), s maksimalnim razinama ( $\alpha$ - i  $\beta$ -tujoni) u hrani i pićima s koncentracijom 0,5 mg/kg, uz neke iznimke (35 mg/kg u gorkim pićima). Zbog jakog mirisa pelin se može koristiti se za tjeranje ličinki insekata, moljaca i buha.<sup>74</sup>

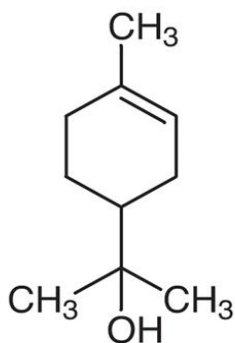
Zanimljiva je velika količina limonena identificirana u uzorku C u iznosu od čak 52,82 %. Limonen se koristi kao komercijalni pojačivač okusa i mirisa koji se lako sintetizira. Prisutan je u svim uzorcima, a najmanji udio od 0,64% je zabilježen u liker u E. Aromatsko bilje eukaliptusa, anisa, ružmarina i komorača bogato je cikloeterom 1,8-cineolom (slika 28) koji ima antivirusno i antioksidativno djelovanje. 1,8-Cineol je molekula koja se nalazi u mnogim eteričnim uljima sa jakim, osvježavajućim, eukaliptičnim, kamforim, mentnim mirisom i okusom hlađenja, a koristi se u kolačima, zubnim pastama i žvakaćim gumama.<sup>60</sup> Identificiran je samo u uzorcima A i E u vrijednostima od 3,54% do 4,04%.



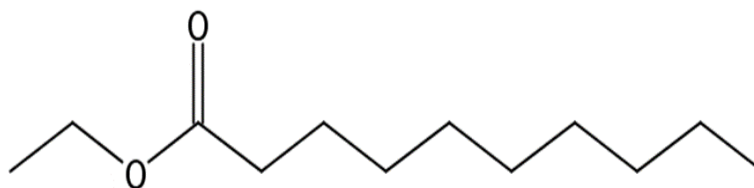
**Slika 28.** 1,8-Cineol<sup>82</sup>

Ester fenil-benzoat je značajno zastupljen u uzorku D (12,73 %), a identificiran je i u uzorcima C (3,68 %) i E (4,99 %). Ima miris poput geranija (cvjetni, voćni i zeleni). Biciklički monoterpenski ester sabinil-acetat, kao jedan od glavnih sastojaka biljke pelin, je prisutan u svim ispitanim uzorcima te mu je prosječan udio 6,52 % dok ga se najviše nalazi u uzorku A (8,33 %). Hlapljivi spojevi identificirani u svim uzorcima su *trans*-anetol,  $\beta$ -tujon,  $\alpha$ -terpineol (slika 29), limonen, etil-kaprat (slika 30), estragol i sabinil-acetat.





Slika 29.  $\alpha$ -Terpineol<sup>83</sup>



Slika 30. Etil-kaprat (etil-dekanoat)<sup>84</sup>

Estragol je bezbojna tekućina s mirisom anisa. Netopljiv je u vodi. Lako se dobiva izoliranjem iz kore **avokada** (*Persea Gratissima*) i iz eteričnog ulja estragona. Nalazi se u eteričnim uljima **anisa** (*Pimpinella anisum* L.), **bosiljka** (*Ocimum basilicum* L.) i **običnog komorača** (*Foeniculum vulgare* L.).<sup>85</sup>

Najviši relativni udio je utvrđen u uzorku E (6,20 %), dok je u pelinkovcu C najmanji (0,07%). Jedino u uzorku D je utvrđen kurkumen (0,17 %) što ukazuje na možebitno korištenje **kurkume** (*Curcuma longa* L.). Miris podanka kurkume je aromatičan, a okus nagorak. **Javanski žuti korijen** sadrži 3-12 % eteričnog ulja s monocikličkim seskviterpenima ar-kurkumenom i ksantorizolom kao glavnim sastavnicama.<sup>86</sup>

Veliko je podudaranje u sastavima hlapljivih spojeva uzoraka A i E, prvenstveno u udjelima  $\alpha$ -tujona (biljna i svježja aroma) i  $\beta$ -tujona (drvenasta i topla biljna aroma) koji imaju gotovo jednake vrijednosti u rasponu 11,01% do 11,96%. Potom slijede slični udjeli *trans*-anetola i 1,8-cineola, koji je prisutan samo u ova dva uzorka, te niski udjeli limonena (jaka citrusna aroma) u oba proizvoda. Glavna razlika je bogatija esterska struktura likera A sa značajnim udjelom sabinil-acetata (8,33%). Generalno je pelinkovac A strukturno bogatiji s kompleksnijom aromom zbog prisustva većeg broja spojeva manjih koncentracija. Takav rezultat je i očekivan jer su oba uzorka napravljena od strane istog proizvođača.

Neke studije ukazuju kako su u eteričnim uljima izoliranim iz biljnog materijala nakon jedne godine skladištenja veći udjeli pojedinih komponenti: *cis*- i *trans*-

linalooloksida (furanoid), 1,8-cineola, neril-2-metilpropanoata, i geranil-3-metilbutanoata (isovalerijat). Ovo povećanje moglo bi biti rezultat kemijskih transformacija prvobitno postojećih spojeva. Sve ove transformacije mogu biti povezane s određenim metaboličkim putovima i s djelovanjem enzima ili mogu biti samo potaknute temperaturom, vlagom i svjetlom. Najvjerojatnije su na početku procesa sušenja i enzimске i neenzimске reakcije imale ulogu u transformaciji terpenoida. Međutim, moglo se očekivati da su, kao posljedica potpune dehidracije biljaka, enzimске transformacije zaustavljene (inaktivacija enzima u suhom biljnom materijalu je vrlo vjerojatna).<sup>87</sup>

Zanimljiva je činjenica kako prema istraživanjima kemijskog sastava biljke pelin u Litvaniji, Iranu te Srbiji rezultati uvelike variraju, pogotovo sastavi različitih dijelova same biljke (korijen, stabljika, list itd.).<sup>26,74,87</sup>

Istraživanje u Srbiji je pokazalo da u eteričnom ulju *A. absinthium* dominiraju monoterpeni (84,6 %) od kojih najzastupljeniji pripadaju tujonskom tipu (40,6 %). Najzastupljeniji spojevi su  $\alpha$ -tujon (63,4 %), sabinen (10,8 %) i *p*-cimen (6,8 %). Ulje izolirano iz nadzemnih dijelova *Artemisia vulgaris* je karakterizirano visokom količinom 1,8-cineola (28,9 %), sabinena (13,7 %),  $\alpha$ -tujona (13,5 %) i  $\alpha$ -kariofilen oksida (6,5 %).<sup>87</sup>

U uzorku C utvrđen je znatan udio limonena (52,82 %), dok se liker B i C odlikuju najbogatijom strukturom. Kod uzorka D spojevi *p*-menton (25,76 %) i mentol (11,10 %) ukazuju na velik udio mente u maceratu ili njenu intezivniju maceraciju. Dotična dva karakteristična spoja mente se nalaze još samo u uzorku C s udjelima 2,11 % te 1,56 %. Nepoželjni monoterpenski keton  $\alpha$ -tujon nije identificiran u uzorku D, a  $\beta$ -tujon je prisutan u vrlo malom udjelu (0,64 %). Pelinkovac E ima najveći udio estragola (6,20 %) u usporedbi s ostalim likerima. Izostanak eugenola i izoeugenola (derivati fenilpropana) ukazuje da nijedan proizvođač vjerojatno ne koristi klinčić u svojoj recepturi. Među svim identificiranim spojevima kvantitativno najviše ima terpenskih ugljikovodika, ali njihova koncentracija je niska, izuzev limonena.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja provedenih u ovom radu mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Cilj ovog rada (izolacija i identifikacija hlapljivih spojeva različitih uzoraka likera pelinkovca te usporedba dobivenih rezultata) je ostvaren.
- Korištene metode ekstrakcije i identifikacije sumarno su utvrdile prisustvo 56 hlapljivih spojeva u svim uzorcima.
- Od identificiranih hlapljivih spojeva najzastupljeniji su spojevi primarne arome iz skupine terpena. Među njima su terpeniski ugljikovodici najbrojniji.
- Hlapljivi spojevi prisutni u svim uzorcima su *trans*-anetol,  $\beta$ -tujon,  $\alpha$ -terpineol, limonen, etil-kaprat, estragol i sabinil-acetat.
- U vršnim parama uzoraka A, B i E dominira *trans*-anetol (36,10 %, 43,21 % i 39,20 %), u uzorku C limonen (52,82 %) te u uzorku D *p*-menton (25,76 %).
- Od svih identificiranih hlapljivih spojeva *trans*-anetol je najzastupljeniji. Glavni je sastojak eteričnog ulja anisa i koromača, a odlikuje se ugodnim slatkastim mirisom i okusom iz čega se zaključuje da se dotične biljke najvećim udjelom koriste u proizvodnji likera pelinkovca.
- Utvrđene razlike u aromatičnim profilima ispitivanih likera ukazuju na specifičnosti procesa proizvodnje, podrijetla te izbora aromatičnog bilja koje se koristilo u izradi likera kod pojedinih proizvođača.
- Za detaljniji aromatični profil ovih likera potrebna su daljnja ispitivanja uz primjenu različitih metoda ekstrakcije.

## 6. LITERATURA

1. [https://wikiz.com/wiki/History\\_of\\_alcoholic\\_drinks](https://wikiz.com/wiki/History_of_alcoholic_drinks) Pristupljeno 7. rujna, 2022.
2. Pravilnik o jakim alkoholnim pićima, Narodne novine, broj 61/09
3. S. Grba, V. Stehlik Thomas, *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*, 1. izdanje, Plejada, 173-175, 2010.
4. K. Poljanec, *Proizvodnja biljnih ekstrakata*, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2017.
5. V. Botić, *Utjecaj različitih metoda i parametara ekstrakcije na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost borovice (Juniperus communis L.)*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnoški fakultet, 2020.
6. V. Dragović-Uzelac, Nastavni materijal iz modula *Začinsko i aromatsko bilje*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016.
7. Lj. Savić, *Metode ekstrakcije biljnih materijala: usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida*, Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd, 2014.
8. <https://theherbarium.wordpress.com/2009/07/08/infusions-decoctions> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
9. <https://www.britannica.com/topic/liqueur> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
10. I. Mujić, *Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića*, Veleučilišni udžbenik, Rijeka, 2010.
11. M. Banić, *Rakije, whisky i likeri*, Gospodarski list d.o.o., Zagreb, 2006.
12. E. Keršek, D. Savković, *Domaće rakije i likeri*, Begen, Zagreb, 2012.
13. <https://www.jagermeister.com/en/jaegermeister-ales/dosage-and-filtration-production-step-4-4> 7. rujna, 2022.
14. <https://www.mentalfloss.com/article/59020/how-liqueur-made-and-how-make-drink-liqueur> Pristupljeno 7. rujna, 2022.

15. <https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute-teme/hrana-111/oznake-kvalitete/oznake-zemljopisnog-podrijetla-jakih-alkoholnih-pica/230> Pristup: 7. rujna, 2022.
16. <https://alcohol-degenija.com/hrvatski-pelinkovac> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
17. I. Tonutti, P. Liddle, *Aromatic plants in alcoholic beverages*, A review, *Flavour Fragr J*, 25, 341–350, 2010.
18. C. W. Wright, *Artemisia*, Taylor and Francis Inc., New York, 2002.
19. S. Marković, *Fitoaromaterapija*, Centar Cedrus, Zagreb, 2005.
20. G. Alaerts, S. Pieters, H. Logie, J. Van Erps, M. Merino-Arevalo, B. Dejaegher, J. Smeyers-Verbeke, Y. Vander Heyden, *Exploration and classification of chromatographic fingerprints as additional tool for identification and quality control of several Artemisia species*, *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, 95, 34-46, 2014.
21. V. Grdinić, D. Kremer, *Ljekovito bilje i ljekovite droge*, farmakopejski, botanički i farmaceutski podaci, 231, Zagreb, 2009.
22. <https://prirodno-lijecenje.blogspot.com/2019/10/pelin-vrtni-artemisia-absinthium-1.html> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
23. D. Kuštrak, *Farmakognozija, Fitofarmacija*, Golden marketing, Tehnička knjiga, 343-345, Zagreb, 2005.
24. V. K. Kaul, S. S. Nigam, A. K. Banerjee, *Insecticidal activity of some essential oils*, *Indian J. Pharm.*, 40 (1), 22-26, 1978.
25. F. Tateo, G. Riva, *Influence of the drying process on the quality of essential oils in Artemisia absinthium*, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 82, 607-614, 1991.
26. B. Miličević, J. Babić, D. Šubarić, Đ. Ačkar, R. Miličević, E. Petošić, A. Jozinović, *Kemijski sastav eteričnih ulja biljke Artemisia vulgaris dobivenih različitim tehnikama ekstrakcije*, recenzirani znanstveni članak, *Glasnik zaštite bilja*, 35, 3; 58-64, 2012.
27. <https://en.wikipedia.org/wiki/Thujone> Pristupljeno 7. rujna, 2022.

28. R. W. Olsen, *Absinthe and  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97 (9), 4417–4418, 2000.
29. J. Williams, J. Yazarians, C. Almeyda, K. Anderson, G. Boyce, *Detection of the Previously Unobserved Stereoisomers of Thujone in the Essential Oil and Consumable Products of Sage (Salvia officinalis L.) Using Headspace Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, J Agric Food Chem, 64 (21), 4319-4326, 2016.
30. E. Keršek, *Ljekovito bilje u vinu i rakiji: kako možete sami pripremiti ljekovite eliksire i travarice*, VBZ, Zagreb, 2004.
31. D. Kuštrak, *Farmakognozija, fitofarmacija*, Golden marketing, Tehnička knjiga, 226-264, Zagreb, 2005.
32. <https://www.plantea.com.hr/anis/> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
33. P. Orlić, *Tradicionalna primjena samoniklog ljekovitog i jestivog bilja otoka Krka*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
34. [https://hr.wikipedia.org/wiki/Obi%C4%8Dni\\_komora%C4%8D](https://hr.wikipedia.org/wiki/Obi%C4%8Dni_komora%C4%8D) Pristupljeno 8. rujna 2022.
35. <https://kadulja.com/proizvod/etericno-ulje-ljekovite-kadulje> 7. rujna, 2022.
36. <https://dobarsavjet.info/wp-content/uploads/2019/10/kadulja-800-WIKI-CC0.jpg> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
37. <https://www.soluna.com.hr/images/zdravlje/ljekovito-bilje/paprena-metvica.jpg> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
38. N. Banović, *Kvaliteta rakije loze proizvedene pri različitim uvjetima fermentacije od sorte grožđa Izabela*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, 2016.
39. A. G. H. Lea, J. R. Piggott, *Fermented Beverage Production*, second edition, Kluwer Academic/Plenum Publisher, USA, 2003.

40. M. Prce, *Utjecaj sistema za destilaciju na kakvoću destilata od jabuke*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2012.
41. D. Jurić, *Primjena plinske kromatografije za određivanje sastava i udjela hlapivih komponenti različitih vrsta rakija s područja Hercegovine*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2018.
42. K. Magdalenić, *Analiza hlapljivih spojeva iz uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2020.
43. A. Ančić, *Aromatični profil vina sorte Kujundžuša*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2017.
44. <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/ugljikovodici> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
45. A. Maralhas, A. Monteiro, C. Martins, M. Kranendonk, A. Laires, J. Ruef, *Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol*, *Mutagenesis*, 199–204, 2006.
46. <http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/esteri-2/> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
47. <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/aldehidi> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
48. <http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/ketoni-2> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
49. <http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/metoksifenoli-2> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
50. <http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/cikloeteri-oksidi-2> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
51. V. Tuntar, *Karakterizacija likera Teranino na osnovi fizikalno-kemijskih parametara i senzornih svojstava*, Specijalistički diplomski stručni, Sveučilište u Rijeci, 2016.

52. P. Riberau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche, A. Lonvaud, *Handbook of Enology*, John Wiley & sons LTD, Vol. 1, 1999.
53. S. Radeka, *Kakvoća vina Malvazije od kasnog branog i prosušenog grožđa*, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 2001.
54. Ž. Pavlović, *Usporedna ispitivanja hlapljivih spojeva rakije travarice*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2020.
55. <https://amikamoda.ru/hr/dubovye-bochki-vyderzhka-distillyatov-podgotovka-dubovyh-bochek-dlya-konyaka-i.html> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
56. J. Cha, Y. Chin, J. Lee, T. Kim, H. Jang. *Analysis of Volatile Compounds in Soju, a Korean Distilled Spirit, by SPME-Arrow-GC/MS*, *Foods*, 9 (10), 1422, 2020.
57. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2009.
58. J. Pawliszyn, *Handbook of SPME*, Chemical Industry Press, Beijing, 2009.
59. B. Jiang, Z. Zhang, *Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China*, *Molecules*, 15, 9184-9196, 2010.
60. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta za internu uporabu, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011.
61. <https://www.slideserve.com/lysa/solid-phase-microextraction-spme> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
62. A. Jurišić, *Utjecaj soja kvasca na senzorska svojstva i sastav hlapljivih spojeva vina Pošip*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2021.
63. I. Surjan, *Hlapljivi organski spojevi vina Traminac*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2017.
64. I. Jerković, I. Blažević, *Eterična ulja i mirisni ekstrakti aromatičnog bilja*, nerecenzirana skripta za internu upotrebu, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2010.



65. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*, Thomson Brooks/Cole, Thomson Higher Education, USA, 2007.
66. G. Piantanida, A. R. Barron, *Principles of gas chromatography*, OpenStax-CNX, 2014.
67. <http://www.chromacademy.com> Pristupljeno 7. rujna, 2022.
68. [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti) Pristupljeno 7. rujna, 2022.
69. A. Kasum, *Profil hlapljivih spojeva monoflornog meda drače (Paliurus spinachristi)*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 4-8, 2007.
70. J. Pupačić, *Karakterizacija hlapljivih spojeva iz trajne kobasice Bosanski sudžuk*, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
71. M. LJ. Čikeš, *Profil hlapljivih spojeva začina origana prije i nakon zagrijavanja*, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
72. A. M. Lovrić, *Optimizacija i validacija HS SPME GC MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2016.
73. A. Dergez, L. Ivanjko, P. Kašner, *Razvoj i primjena metalnih monolitnih struktura za smanjenje emisija hlapljivih organskih spojeva u atmosferu*, Istraživački rad nagrađen rektorovom nagradom, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2017.
74. A. Judzentiene, F. Tomi, J. Casanova, *Analysis of Essential Oils of Artemisia absinthium L. from Lithuania by CC, GC(RI), GC-MS and 13C NMR*, Natural Product Communications, Vol. 4, No. 8, 1113-1118, Lithuania, 2009.
75. <https://www.chemfaces.com/natural/Sabinyl-acetate-CFN70404.html> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
76. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/117870> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
77. <https://www.carlroth.com/com/en/reference-substances-for-gc/d-%28%2B%29-limonene/p/5198.2> Pristupljeno 8. rujna, 2022.

78. <https://www.wikiwand.com/en/Menthone> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
79. <https://www.wikidata.org/wiki/Q419495> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
80. <https://www.fairylandhealth.com/2020/06/12/limunska-trava-etericno-ulje/> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
81. <https://www.extrasynthese.com/monoterpene/615--lavandulol.html> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
82. <https://www.tcichemicals.com/BE/en/p/C0934> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
83. <https://www.tcichemicals.com/NZ/en/p/T0984> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
84. <https://www.chemservice.com/media/product/structures/n-16526.png> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
85. <https://wikihrrh.top/wiki/Estragole> Pristupljeno 8. rujna, 2022.
86. Ž. Maleš, K. Ledić, D. Šoić, D. Skendrović, *Kriju li biljke opasnost za bjelinu zuba?*, Farmaceutski glasnik, 74 (3), 183-261, 2018.
87. P. Blagojević, N. Radulović, R. Palić, G. Stojanović, *Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing Artemisia absinthium and Artemisia vulgaris*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (13), 4780-4789, 2006.