

# Karakterizacija aromatičnih spojeva rakije biske

---

**Kovačić, Dora**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:139216>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-04**

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



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

**KARAKTERIZACIJA AROMATIČNIH SPOJEVA RAKIJE**  
**BISKE**

**DIPLOMSKI RAD**

**DORA KOVAČIĆ**

**Matični broj: 14**

**Split, listopad 2021.**



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

**KARAKTERIZACIJA AROMATIČNIH SPOJEVA RAKIJE BISKE**

**DIPLOMSKI RAD**

**DORA KOVAČIĆ**

**Matični broj: 14**

**Split, listopad 2021.**

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

**CHARACTERIZATION OF AROMATIC COMPOUNDS OF  
BRANDY *BISKA***

**DIPLOMA THESIS**

**DORA KOVAČIĆ**

**Parent number: 14**

**Split, October 2021.**

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada** je prihvaćena na 6., elektroničkoj, sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### KARAKTERIZACIJA AROMATIČNIH SPOJEVA RAKIJE BISKE

Dora Kovačić, 14

#### Sažetak:

Biska je tradicionalna istarska rakija koja se proizvodi aromatiziranjem rakije lozovače ili komovice prirodnim ekstraktom žute imele (*Loranthus europaeus*) ili bijele imele (*Viscum album*). Tijekom njene proizvodnje nastaju brojne aromatične hlapljive tvari čiji udjel i sastav određuje kvalitetu gotovog proizvoda. Cilj ovog rada je utvrditi i usporediti profil hlapljivih sastojaka 6 uzoraka rakije biske. Hlapljivi spojevi izolirani su korištenjem dvije tehnike izolacije: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. headspace-solid phase microextraction, HS-SPME) i ekstrakcija tekuće-tekuće. Analiza izoliranih spojeva provedena je primjenom spregnute tehnike plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. gas chromatography – mass spectrometry, GC-MS). Identificirano je ukupno 46 hlapljivih spojeva koji pripadaju sljedećim kemijskim skupinama: alkoholi, esteri, masne kiseline, aldehidi, alkani i terpeni. Najzastupljenije komponente su viši alkoholi 3-metil-butan-1-ol i 2-metil-propan-1-ol te etilni esteri srednjelančanih masnih kiselina etil-dekanoat i etil-oktanoat. Uočene su značajne razlike u aromatičnom profilu ovisno o korištenoj metodi izolacije, a samo je 8 istih spojeva identificirano korištenjem obje metode.

**Ključne riječi:** biska, aroma, hlapljivi spojevi, ekstrakcija tekuće-tekuće, HS-SPME, GC-MS

**Rad sadrži:** 36 stranica, 14 slika, 3 tablice, 48 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević	predsjednik
2. doc. dr. sc. Danijela Skroza	član
3. doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član - mentor

**Datum obrane:** 15. listopada 2021.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate study of food technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, electronic session No. 6.

**Mentor:** Assistant professor Zvonimir Marijanović, PhD

### CHARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS OF BRANDY *BISKA*

Dora Kovačić, 14

**Abstract:**

*Biska* is a traditional Istrian brandy produced by flavoring *lozovača* brandy or *komovica* brandy with a natural extract of yellow mistletoe (*Loranthus europaeus*) or white mistletoe (*Viscum album*). During the production of *Biska* brandy, many aromatic volatile substances are generated, and their content and composition determine the quality of the finished product. The aim of this paper is to determine and compare the volatile components' profile of 6 samples of *Biska* brandy. Volatile compounds are isolated using two isolation methods: headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and liquid-liquid extraction. The analysis of isolated compounds was performed using gas chromatography– mass spectrometry (GC-MS). A total of 46 volatile compounds belonging to the following chemical groups have been identified: alcohols, esters, fatty acids, aldehydes, alkanes and terpenes. The prevailing amount of higher alcohols 3-methyl-butan-1-ol and 2-methyl-propan-1-ol as well as the ethyl esters of medium-chain fatty acids ethyl-decanoate and ethyl-octanoate were found. Significant differences in aromatic profile were detected depending on the isolation method used, and only 8 of the same compounds were identified using both methods.

**Keywords:** *Biska*, aroma, volatile compounds, liquid-liquid extraction, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 36 pages, 14 figures, 3 tables, 48 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

Associate Professor Ivica Blažević, PhD  
Assistant Professor Danijela Skroza, PhD  
Assistant Professor Zvonimir Marijanović, PhD

chair person  
member  
supervisor

**Defence date:** October 15, 2021.

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od veljače do rujna 2021. godine*



## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na ukazanom povjerenju, vodstvu i pomoći pri izradi ovoga rada.*

*Hvala i svim proizvođačima koji su nesebično donirali uzorke u svrhu izrade ovog diplomskog rada.*

*Također, jedno veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na nesebičnoj podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studija.*

## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

- Odrediti aromatični profil šest različitih uzoraka rakije biske koristeći dvije metode izolacije i to mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i ekstrakciju tekuće-tekuće.
- Izolirane aromatične hlapljive spojeve identificirati primjenom vezanog sustava plinske kromatografije - spektrometrije masa (GC-MS).
- Analizirati i usporediti dobivene rezultate ispitivanih uzoraka te utvrditi razlike i sličnosti u analizi uzoraka korištenjem dviju različitih metoda izolacije.

## SAŽETAK

Biska je tradicionalna istarska rakija koja se proizvodi aromatiziranjem rakije lozovače ili komovice prirodnim ekstraktom žute imele (*Loranthus europaeus*) ili bijele imele (*Viscum album*). Tijekom njene proizvodnje nastaju brojne aromatične hlapljive tvari čiji udjel i sastav određuje kvalitetu gotovog proizvoda. Cilj ovog rada je utvrditi i usporediti profil hlapljivih sastojaka 6 uzoraka rakije biske. Hlapljivi spojevi izolirani su korištenjem dvije tehnike izolacije: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. headspace-solid phase microextraction, HS-SPME) i ekstrakcija tekuće-tekuće. Analiza izoliranih spojeva provedena je primjenom spregnute tehnike plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. gas chromatography – mass spectrometry, GC-MS). Identificirano je ukupno 46 hlapljivih spojeva koji pripadaju sljedećim kemijskim skupinama: alkoholi, esteri, masne kiseline, aldehidi, alkani i terpeni. Najzastupljenije komponente su viši alkoholi 3-metil-butan-1-ol i 2-metil-propan-1-ol te etilni esteri srednjelančanih masnih kiselina etil-dekanoat i etil-oktanoat. Uočene su značajne razlike u aromatičnom profilu ovisno o korištenoj metodi izolacije, a samo je 8 istih spojeva identificirano korištenjem obe metode.

**Ključne riječi:** biska, aroma, hlapljivi spojevi, ekstrakcija tekuće-tekuće, HS-SPME, GC-MS

## SUMMARY

*Biska* is a traditional Istrian brandy produced by flavoring *lozovača* brandy or *komovica* brandy with a natural extract of yellow mistletoe (*Loranthus europaeus*) or white mistletoe (*Viscum album*). During the production of *Biska* brandy, many aromatic volatile substances are generated, and their content and composition determine the quality of the finished product. The aim of this paper is to determine and compare the volatile components' profile of 6 samples of *Biska* brandy. Volatile compounds are isolated using two isolation methods: headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and liquid-liquid extraction. The analysis of isolated compounds was performed using gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). A total of 46 volatile compounds belonging to the following chemical groups have been identified: alcohols, esters, fatty acids, aldehydes, alkanes and terpenes. The prevailing amount of higher alcohols 3-methyl-butan-1-ol and 2-methyl-propan-1-ol as well as the ethyl esters of medium-chain fatty acids ethyl-decanoate and ethyl-octanoate were found. Significant differences in aromatic profile were detected depending on the isolation method used, and only 8 of the same compounds were identified using both methods.

**Keywords:** *Biska*, aroma, volatile compounds, liquid-liquid extraction, HS-SPME, GC-MS

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1.OPĆI DIO</b> .....	2
1.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA .....	2
1.1.1. SPECIJALNE RAKIJE .....	4
1.2. BISKA.....	4
1.2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE BISKE.....	5
1.3. IMELA .....	6
1.3.1. BIJELA IMELA .....	7
1.3.2. ŽUTA IMELA.....	8
1.3.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI IMELE.....	8
1.4. AROMA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA.....	9
1.5. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	13
1.5.1. EKSTRAKCIJA OTAPALOM.....	13
1.5.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	14
1.6. INSTRUMENTALNA ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	16
1.6.1. PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA.....	16
1.6.2. SPEKTROMetriJA MASA.....	17
1.6.3. SPREGNUTA TEHNIKA PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA – SPEKTROMetriJA MASA.....	18
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	20
2.1. APARATURA I KEMIKALIJE .....	20
2.2. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	21
2.1.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	21
2.4.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE .....	22
2.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	23
<b>3.REZULTATI</b> .....	25
<b>4. RASPRAVA</b> .....	30
4.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI.....	30
4.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE.....	33
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	36
<b>6. LITERATURA</b> .....	37

## UVOD

Tradicija proizvodnje i konzumacije alkoholnih pića vrlo je duga. Od davnih vremena alkoholna pića koristila su se kao opojna sredstva za uživanje, u religijsko-magijske svrhe te u narodnoj medicini. Destilacija je kao proces u proizvodnji alkohola prvi puta opisana u knjizi „*Liber de arte distillandi*“ 1500 godina prije Krista, međutim ona u Europi ostaje nepoznata sve do 11. stoljeća, kada se spominje prva destilacija viskija u Irskoj. Do naglog razvitka i poboljšanja procesa destilacije dolazi nakon Prvog svjetskog rata (1).

Jaka alkoholna pića popularna su u cijelom svijetu i proizvode se u mnogim zemljama. Svaka država ima svoje prepoznatljivo alkoholno piće koje se od drugih razlikuje prvenstveno zbog različitih sastojaka korištenih prilikom njihove proizvodnje. Najpoznatije tradicionalne hrvatske rakije su šljivovica, loza i travarica. Jedna manje poznata rakija, koja ima dugu tradiciju proizvodnje na istarskom poluotoku, je rakija biska. Biska je aromatizirana rakija koja se proizvodi maceracijom lišća i mladih grančica žute ili bijele imele u komovici ili lozovači.

Specifična senzorska svojstva rakije biske ovise o upotrebljenim sirovinama i njihovoj kvaliteti, načinu prerade i primijenjenoj tehnologiji, načinu provedbe procesa fermentacije, destilacije i maceracije te dozrijevanju i njegovanju destilata. Svi navedeni parametri utječu na nastanak brojnih hlapljivih tvari čiji sastav i udio određuje kvalitetu finalnog proizvoda. Upravo zbog toga njihova je identifikacija jedan od najvažnijih koraka u ocjeni kvalitete jakih alkoholnih pića.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA

Jaka alkoholna pića, prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima, definirana su kao pića namijenjena za ljudsku potrošnju koja sadrže minimalno 15% vol. alkohola i posebna senzorska svojstva (2). Osnova za proizvodnju jakih alkoholnih pića je alkoholna fermentacija šećera, iz svih biljnih sirovina koje sadrže visok udio šećera i škroba. Kao sirovina za fermentaciju najčešće se koristi voće (grožđe, šljive, marelice, breskve, jabuke, kruške, višnje trešnje i dr.), žitarice, krumpir, šećerna repa ili šećerna trska (1). Jaka alkoholna pića mogu se proizvesti:

1. Izravnim postupkom i to:

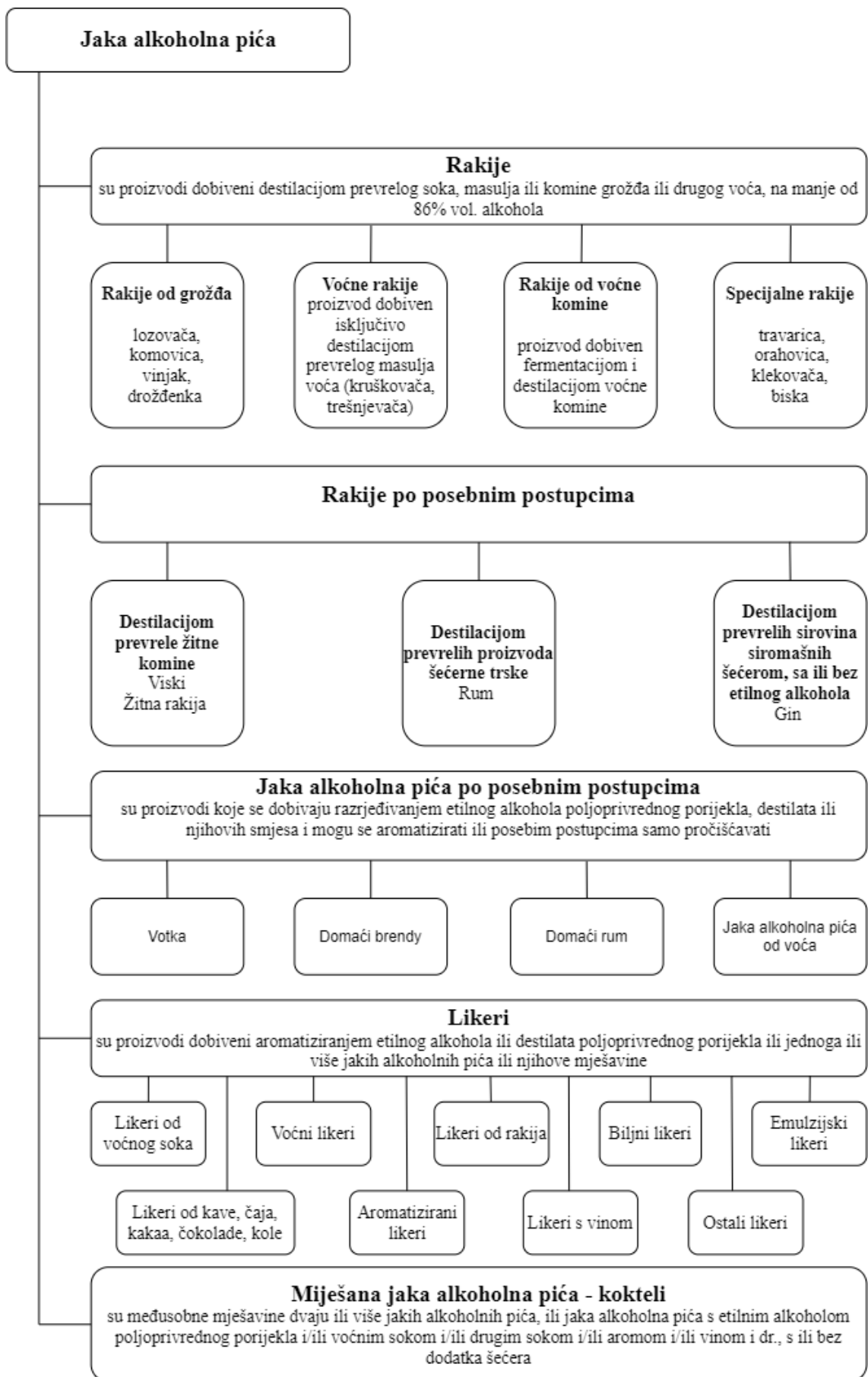
- destilacijom, s ili bez dodavanja aroma, prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla, i/ili
- maceracijom ili sličnom preradom bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili u destilatima poljoprivrednog podrijetla, i/ili u jakim alkoholnim pićima, i/ili;
- dodavanjem aroma, šećera ili drugih sladila i/ili drugih poljoprivrednih proizvoda i/ili prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili jakim alkoholnim pićima

2. Miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više:

- drugih jakih alkoholnih pića i/ili
- etilnim alkoholom ili destilatima poljoprivrednog podrijetla
- drugih alkoholnih pića i/ili
- pića

Etilni alkohol koji se koristi tijekom proizvodnje jakih alkoholnih pića mora biti poljoprivrednog podrijetla i ne smije imati miris i okus drugačiji od onoga koji je karakterističan za upotrijebljenu sirovinu. Minimalna alkoholna jakost etilnog alkohola mora biti 96,0% vol (2).

Podjela jakih alkoholnih pića ovisno o tehnologiji i uvjetima proizvodnje te podrijetlu sirovine prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Podjela jakih alkoholnih pića (1)



### **1.1.1. SPECIJALNE RAKIJE**

Aromatiziranjem rakija i vinskog destilata raznim plodovima, voćem, aromatskim biljem, njihovim maceratima i eteričnim uljima proizvode se specijalne rakije. One se mogu proizvoditi i tako da se voćnom ili grožđanom masulju ili soku prije fermentacije dodaje mljeveno aromatično bilje ili izgnječeni svježi plodovi. Konačni proizvodi mogu sadržavati biljne dijelove od kojih su napravljeni, a alkoholna jakost specijalne rakije mora biti najmanje 37,5% vol (2). Najpoznatiji predstavnik ove skupine rakija je travarica, a u specijalne rakije svrstavaju se još i biska, klekovača, mastika, pastis, ruda i dr.

Priprava specijalnih, aromatičnih rakija ima dugu tradiciju koja potječe iz primorskih krajeva u kojima ima najviše aromatičnog bilja. Za njihovu proizvodnju najčešće se koriste rakije od grožđa uz dodatak aromatičnog bilja koje oplemenjuje njezin okus. Svaka biljka koja se koristi u tu svrhu sadrži svoje specifične aromatične ili nearomatične tvari. Biljni dijelovi koji se upotrebljavaju za pripremanje aromatičnih rakija potječu iz:

- ploda (klek, kardamom, muškadni orah, anis, komorač, korijandar, kopar...)
- korijena (anđelika, perunika, lincura, srčenjak...)
- cvjetova (lavanda, majčina dušica, kamilica, stolisnik, ruža, bazga, breza...)
- listova (kadulja, matičnjak, paprena metvica, pelin, majčina dušica, imela...)
- balzama i smola (balzam striks, benzoeve smole, mastiks...).

Alkohol iz biljnih dijelova ekstrahira velik broj farmakološki djelotvornih tvari koje, osim što rakiji daju boju, okus i aromu, pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje ukoliko se takvo piće konzumira u razumnim količinama (1).

### **1.2. BISKA**

Biska je tradicionalna istarska aromatizirana rakija koja se proizvodi maceracijom lišća i mladih grančica žute ili bijele imele u alkoholnoj bazi, najčešće komovici ili lozovači (slika 2). Ukoliko je alkoholna jakost biske manja od 37,5% vol ona se na tržište plasira kao liker, sukladno Pravilniku o jakim alkoholnim pićima. Biska ima boju kestenova meda sa zelenkastim odsjajem, a njezina nijansa ovisi o količini biljaka koje se koriste te dužini maceracije. Tijekom proizvodnje biske može se

koristiti med ili šećer kao dodatak (1). Prema originalnoj recepturi u bisku se dodaje još i četiri vrste trava čiji identitet proizvođači vješto kriju.

Iz svega navedenog vrlo lako je zaključiti da jedinstveni recept za proizvodnju biske ne postoji već on ovisi o količini i vrsti alkoholne baze za maceraciju, količini i vrsti biljaka koje se koriste, dugotrajnosti maceracije, dodatku meda ili šećera, a navedeni parametri variraju od proizvođača do proizvođača.



**Slika 2.** Biska (3)

### **1.2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE BISKE**

Proizvodnja biske započinje pripremom bazne rakije, najčešće komovice. Komovica se dobiva destilacijom fermentirane komine od grožđa. U praksi se često za pripremu komovice upotrebljava neprevrela (slatka) komina, koja je zaostala nakon cijedenja izmuljanog groždanog masulja. Tako dobivenoj komovici dodaje se destilirana voda kako bi se postigao željeni sadržaj alkohola (najčešće oko 40% vol.). Manji dio rakije se izdvoji i u nju se umiješaju svježi ili sušeni listovi imele u količini do 30 g za litru gotovog proizvoda. Maceracija traje 20 do 45 dana uz obavezno svakodnevno miješanje. Količina dodanih biljnih dijelova i dužina maceracije utječe na količinu sastojaka koji ekstrahiraju u rakiju. To je posebno izraženo kod pigmenta, pa se tako duljom maceracijom dobiju tamniji tonovi smeđe boje biske. Nakon završetka

maceracije macerat se procijedi i pomiješa se s ostatkom bazne rakije. U ovoj fazi može se dodati med ili šećer. Homogenizacija sastojaka traje 30 do 60 dana, nakon čega slijedi filtriranje i punjenje u boce (1).

### 1.3. IMELA

Imela je poluparazitska biljna vrsta koja se, ovisno o rodu, svrstava u porodicu Viscaceae ili Loranthaceae koje su taksonomski povezane, a pripadaju redu Santalales. Porodica Viscaceae dugo vremena se smatrala podporodicom porodice Loranthaceae zbog mnogih sličnosti u obilježjima. Međutim 1960-tih godina došlo je do prihvaćanja značajnih razlika u embriologiji i osnovnom broju kromosoma te su one sada zasebne porodicama unutar istog reda (4).

Imela raste uglavnom kao grm na granama mnogobrojnih crnogoričnih i listopadnih stabala. Razmnožavanje se vrši putem ptica kao prenositelja. Ptice jedu zrele plodove u jesen i zimi, a sjemenke ispuštaju putem izmeta na grane stabala (5). Potom dolazi do razvijanja posebno građenih organa, kojim se biljčica pričvrsti za budućeg domaćina. Iz tog se organa razvija sisaljka, koja uz pomoć enzima probuši koru te dolazi do stvaranja čitavog sistema crpki (haustorija). Pomoću haustorija imela crpi od biljke domadara vodu s mineralnim tvarima, a iz njih, uz ugljikov dioksid i sunčevu energiju, sintetizira organsku tvar u zelenim listovima (6). Različitim istraživanjima utvrđeno je da biološki aktivne tvari mogu prijeći iz stabla domaćina u parazitsku biljku što za posljedicu ima razlike u kemijskom sastavu imele koje ovise o vrsti stabla na kojem imela parazitira.

Imela je široko rasprostranjena te se može pronaći u Europi, Americi, Africi, Aziji i Australiji, u različitim klimatskim uvjetima, a nema ih samo na izrazito suhim ili hladnim područjima. U našoj flori zastupljena su tri vrste: bijela imela (*Viscum Album*), ljepak (*Loranthus europaeus*) i imelica (*Arceuthobium oxycedri*) (7; 8).

Keltski druidi smatrali su imelu svetom biljkom, jer usred zime, kada su grane stabla hrasta bile gole, imela je još uvijek bila zelena i cvjetala je bez korijena u zemlji. I danas je zimzelena imela simbol plodnosti i sreće, i ljubljenje pod njenim granama u vrijeme božićnog perioda popularno je kod mnogih europskih naroda i u Sjevernoj Americi (9).

### 1.3.1. BIJELA IMELA

Bijela imela (*Viscum album*) pripada rodu *Viscum* zajedno s još stotinjak poluparazitskih vrsta iz porodice Viscaceae (5). Lako se može uočiti na listopadnom drveću gdje raste kao poluparazit na granama stabala, najčešće, topole, vrbe, lipe, bagrema, jabuke. Zimzelena je biljka, a raste kao grm, kuglastog oblika s promjerom do jednog metra (slika 3).



**Slika 3.** Bijela imela (*Viscum album*) (10; 11)

Grančice su višestruko rašljasto razgranjene, zelenosmeđe i krhke. Listovi su nasuprotni, jednostavni, duguljasti, 3-6 cm široki, zelenkasto žute boje. Cvjetovi su sitni, jednospolni i dvodomni, žućkasto zeleni. Bijela imela cvjeta u rano proljeće, a oprašivanje vrše insekti, ptice i vjetar. Plod je okrugla bobica, veličine graška, najprije zelena, zatim gotovo bijela i poluprozirna ispunjena žilavim sluzavim mesom (slika 3) (12). U mezokarpu bobice sadržana je ljepljiva tvar viscin, s pomoću koje se plodovi lako zalijepe na koru drveća gdje kliju. Od ljepljiva soka plodova radi se lijepak za hvatanje ptica.

Osim što se upotrebljava kao sastojak u proizvodnji rakije biske bijela imela koristi se u farmakologiji i narodnoj medicini za spravljanje pripravaka protiv glavobolje, padavice i sličnih tegoba (1). Ona ima i izražena imunološka svojstva te jača imunitet i pomaže kod alergija. Neki su autori (dr. Karl Anton Kass) u novije vrijeme i klinički utvrdili izričito ljekovitu moć bijele imele u citostatičkom djelovanju protiv karcinoma (13).

### 1.3.2. ŽUTA IMELA

Žuta imela (*Loranthus europaeus*), poznata još i pod nazivom ljepak, raste kao poluparazit na raznom drveću, najčešće na hrastu i kestenu (slika 4). Spada u porodicu Loranthaceae, a jedina je europska vrsta roda Loranthus (14). Za razliku od bijele imele ova vrsta je listopadna (15). Pojavljuje se na nadmorskoj visini do 800 metara. Grane su okrugle, rašljasto razgranate, krhke i tamnosmeđe. Listovi su dugi 4-6 cm, nasuprotni, jednostavni, tamnozeleno boje, s kratkim peteljka. Cvjetovi su dvospolni ili jednospolni, žutozeleni u vršnim cvatovima. Žuta imela cvate u svibnju i lipnju. Plod je bobica žute boje, promjera do jednog centimetra (1). Plodovi sazrijevaju u kasnu jesen, a postupno opadaju krajem zime.



**Slika 4.** Žuta imela (*Loranthus europaeus*) (16; 17)

Kao i ostale vrste imele, žuta imela intenzivno se koristila u narodnoj medicini za razne terapijske svrhe, a neke od njih su liječenje čireva, apscesa i kožnih bolesti. Dokazano je i antitumorsko, protuupalno, antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje žute imele (18).

### 1.3.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI IMELE

Imela sadrži veliki broj različitih biološki aktivnih tvari poput viskotoksina, lektina, polifenolnih spojeva, alkaloida, amina, ketona, terpena (monoterpena i triterpena).

Viskotoksini i lektini jedni su od najvažnijih, a ujedno i najpoznatiji biološki aktivni spojevi imele. Oni se koriste u liječenju karcinoma zbog apoptotičnog i citotoksičnog utjecaja na stanice. Visoke koncentracije lektina toksične su za sisavce, ali niske koncentracije djeluju povoljno na organizam.

Od polifenolnih spojeva u imeli su identificirani flavonoidi, fenilpropanoidi i fenolne kiseline (19). Oni se ubrajaju u skupinu sekundarnih biljnih metabolita, a doprinose boji, mirisu, okusu i nutritivnoj vrijednost biljaka. Polifenoli imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost zbog sposobnosti prelaska u fenoksil – radikale pri čemu otpuštaju vodikov atom, koji se veže na slobodne radikale. Također imaju sposobnost vezanja iona prijelaznih metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), inhibiranja oksidaza i aktiviranja antioksidacijskih enzima (20). Neke od fenolnih kiselina identificiranih u bijeloj imeli su: salicilna, *p*-hidroksibenzojeva, ferulinska, *p*-kumarinska, sinapinska i kava kiselina. Flavonoidi izolirani iz alkoholnih ekstrakata imele su naringenin, kvercetin i kampferol (8). Važno je naglasiti da količina i sastav polifenolnih spojeva u imeli uvelike ovisi o stablu na kojem biljka parazitira.

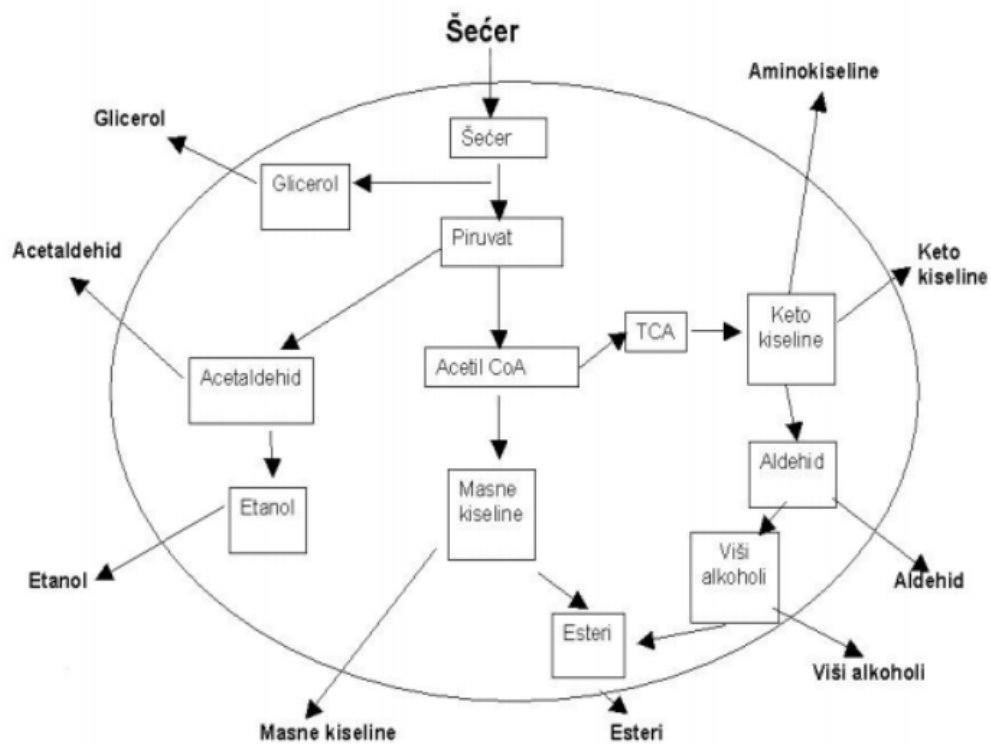
Terpeni su hlapljive tvari koje daju biljkama karakterističan miris, a njihovu osnovnu strukturu izgrađuje 2-metil-1,3-dienska jedinica koja se često naziva izoprenska jedinica. Triterpeni identificirani u imeli su oleanolična kiselina,  $\beta$ -amirin acetat, betulinska kiselina (19). Betulinska kiselina pokazuje antitumorsko i citotoksično djelovanje, dok oleanolična kiselina smanjuje krvni tlak i ima protuupalno djelovanje.

Ekstrakcijom navedenih spojeva u vodeno-alkoholnoj bazi, biska se obogaćuje biološki aktivnim tvarima čime njena konzumacija u umjerenim količinama može pozitivno djelovati na poboljšanje imunološkog sustava i metabolizma.

#### **1.4. AROMA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA**

Aroma je važan organoleptički pokazatelj kvalitete proizvoda. Također je i značajan čimbenik koji utječe na odluku potrošača prilikom kupnje hrane te na njihovu percepciju kvalitete hrane. Ona se definira kao kombinirana impresija mirisnih i okusnih komponenti proizvoda, a očituje se prilikom konzumacije olfaktornim epitelom u nosu te okusnim pupoljcima na jeziku (21). Aroma jakih alkoholnih pića posljedica je sinergije velikog broja hlapljivih i nehlapljivih spojeva, a njihova identifikacija jedan je od najvažnijih koraka u ocjeni kvalitete i autentičnosti jakih alkoholnih pića (22).

Aromatični profil bazne rakije (komovice ili lozovače) ovisan je o kvaliteti polazne sirovine te parametrima unutar proizvodnog procesa (fermentacija, destilacija i sazrijevanje alkoholne baze) (23). U destilat prelaze primarni aromatični spojevi karakteristični za polaznu sirovinu (grožđe). Spojevi primarne arome nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka djelovanjem enzima tijekom dozrijevanja biljnog tkiva iz prekursora arome. U procesu alkoholne fermentacije nastaju sekundarni aromatični spojevi poput aldehida, ketona, viših alkohola, organskih kiselina i estera, koji su vrlo važni za formiranje arome. Oni nastaju djelovanjem kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) i drugih mikroorganizama koji metaboliziraju ugljikohidrate, aminokiseline, masne kiseline i druge organske spojeve. Slika 5 prikazuje osnovnu shemu prekursora, međuprodukata i metabolita glavnih skupina aromatskih spojeva koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije u stanicama kvasca (22).



**Slika 5.** Metabolizam kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (22)

Neke hlapljive tvari koje nastaju tijekom fermentacije, poput akroleina, diacetila, butan-2-ola, alil-alkohola ili octene kiseline, posljedica su pojačane mikrobiološke aktivnosti i mogu uzrokovati neugodan okus i miris, stoga povišene koncentracije

takvih spojeva mogu ukazivati na: kvarenje sirovine, negativne mikrobiološke utjecaje tijekom ili nakon procesa fermentacije ili lošu tehniku destilacije.

Aldehidi i ketoni uglavnom nastaju kao nusproizvodi alkoholne fermentacije. Aldehidi imaju nizak prag „mirisne detekcije“ zbog čega značajno utječu na aromu jakih alkoholnih pića. Acetaldehid je najzastupljeniji karbonilni spoj i nastaje kao međuprodukt tijekom razgradnje piruvata. Ukoliko se u destilatima nalazi u visokoj koncentraciji ima iritirajući i odbojan miris te negativno utječe na aromu. Male koncentracije acetaldehida destilatima daju slatku, voćnu aromu. Prilikom destilacije najveća količina acetaldehida nalazi se u prvom toku jer on ima niže vrelište od alkohola i stoga se može lako odvojiti od glavnog toka. Akrolein (prop-2-enal) ima papreni miris sličan hrenu, a nastaje ili dehidracijom glicerola tijekom destilacije u prisutnosti kiselina na vrućim metalnim površinama ili aktivnošću bakterija tijekom fermentacije pokvarenih sirovina. Acetaldehid, kao i akrolein, reagiraju s etanolom i tvore acetale 1,1-dietoksietan i 1,1,3-trietoksipropan, koji umanjuju oštar mirisa aldehyda i poboljšavaju aromu destilata. Viši aldehidi i njihovi acetali u destilatima su prisutni u niskim koncentracijama, a doprinose ugodnijoj aromi (22; 24).

Viši alkoholi, poznati i pod nazivom patočni alkoholi, kvantitativno su najveća skupina hlapljivih spojeva, a nastaju kao sekundarni produkti fermentacije razgradnjom aminokiselina. Najvažniji alkoholi koji utječu na aromu alkoholnih pića su propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol i aromatski alkohol 2-feniletanol. Viši alkoholi imaju slatku i zagorenu aromu, s izuzetkom 2-feniletanola, koji ima miris sličan ruži. Koncentracija viših alkohola nastala u procesu fermentacije ovisi o više faktora, a neki od njih su: upotrebljeni sojevi kvasaca, pH, temperatura, aeracija. Njihova količina u destilatima može jako varirati a ovisi uglavnom o načinu destilacije, odvajanja i frakcioniranja. Prekomjerne koncentracije viših alkohola mogu rezultirati snažnim trpkim mirisom i okusom, dok optimalne razine daju voćni karakter. Izoamilni alkohol (smjesa 2-metilbutan-1-ola i 3-metilbutan-1-ola) je glavni aromatični spoj u rakijama, sintetiziraju ga kvasci, a nositelj je alkoholnog mirisa i mirisa otapala (24; 25).

U destiliranim alkoholnim pićima koncentracija slobodnih masnih kiselina vrlo je niska zbog njihove esterifikacije i odvajanja tijekom destilacije. Najzastupljenija je octena kiselina koja ima tipičnu octenu aromu, a može nastati tijekom i/ili nakon fermentacije oksidacijom etanola u aerobnim uvjetima djelovanjem bakterijama octene



kiseline. Povišena koncentracija octene kiseline indikator je mikrobiološkog kvarenja i negativno utječe na aromu.

Esteri su vrlo bitni spojevi koji sudjeluju u formiranju arome jer su njihove koncentracije općenito iznad osjetnih graničnih vrijednosti. Najznačajniji esteri koji utječu na aromu rakija su etilni esteri niskog vrelišta, poput etil-2-metilbutanoata, etilheksanoata i etil-oktanoata, te acetati poput etil-acetata, izoamilacetata, izobutil-acetata, heksil-acetata i 2-fenetil-acetata. Etil-acetat, uglavnom nastaje esterifikacijom octene kiseline i glavni je ester koji se javlja u fermentiranim pićima i njihovim destilatima. Esteri kratkolančanih kiselina nositelji su voćnih aroma, dok oni nastali iz dugolančanih kiselina imaju blagi masni miris (22).

Destilacija je glavni tehnološki korak u proizvodnji jakog alkoholnog pića kojim se etanol i spojevi arome odvajaju i prenose u destilat. Etanol se destilira kao azeotropna smjesa voda-etanol pri temperaturi od 78,15 °C, zajedno s drugim više ili manje hlapljivim spojevima. Prvi tok sadrži najhlapljivije spojeve poput acetaldehida, dok treći tok karakteriziraju spojevi visokog vrelišta, poput etilnih estera dugolančanih masnih kiselina. Obje frakcije sadrže nepoželjne aromatske spojeve te se odvajaju od glavnog toka. U procesu destilacije osim fizičkih procesa odvijaju se i razni kemijski procesi tijekom kojih neki proizvodi nastaju, drugi nestaju, a neki se mijenjaju u odnosu na svoj prvotni sastav. Destilacijom komina koje sadrže pentoze i pentozane nastaje furfural. Furfural je nosioc mirisa gorkih badema, a u povišenoj koncentraciji pojačava osjećaj peckanja i vrućine (26). Destilacije rezultira i nastankom estera, a najzastupljeniji ester koji nastaje u ovoj fazi je etil-ester octene kiseline. Zagrijavanje tijekom destilacije odvodi do oksidacije alkohola, razlaganja acetata i drugih organskih spojeva pri čemu nastaju aldehidi. Acetati su još jedna skupina spojeva koja nastaje u procesu destilacije od alkohola i acetaldehida, a značajni su za aromu svježeg destilata. Na količinu i sastav aromatičnih spojeva u destilatu utječe i brzina destilacije. Kod spore destilacije nastaje više aldehida, estera i furfurala, a u destilat prelazi manje hlapljivih kiselina nego kod brže destilacije (1).

Konačna specifična aroma postiže se maceracijom imele u alkoholnoj bazi pri čemu dolazi do ekstrakcije aromatičnih spojeva i eteričnih ulja imele. Maceracijom u rakiju prelaze i biološki aktivne tvari sadržane u imeli poput: lektina, polisaharida, alkaloida, terpenoida, proteina, amina, peptida, polifenola, flavonoida, fitosterola i aminokiselina.

## **1.5. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Koncentracija aromatskih spojeva u hrani općenito je niska (ppb do ppm). Da bi se prevladale analitičke granice njihove detekcije potrebno je koncentrirati hlapive tvari iz hrane prije njihove analize. Postoje mnoge metode za ekstrahiranje i/ili koncentriranje aromatskih spojeva. Različite metode odlikuju se određenim prednostima, ali također imaju i specifična ograničenja. Zajednički problem svih metoda izolacije je potencijalno uništavanje aromatskih komponenti i/ili proizvodnja aromatskih artefakata. Optimalna metoda mora osigurati izolaciju izvorne arome tako da primijenjeni uvjeti izolacije budu što blaži kako bi se izbjegla oksidacija, redukcija, toplinska razgradnja i druge kemijske i biokemijske promjene u uzorku (27). Za to je neophodno poznavanje uzorka i aromatičnih spojeva koji se mogu očekivati, posebice onih koji imaju najznačajniji utjecaj na aromu. Oni su obično prisutni u vrlo niskim koncentracijama stoga se često za dobivanje potpunog profila arome upotrebljava više izolacijskih tehnika.

Dostupne laboratorijske metode izolacije aromatičnih spojeva mogu se podijeliti na metode ekstrakcije otapalima, destilacijske metode, sorpcijske tehnike i tehnike "vršnih para" (28).

### **1.5.1. EKSTRAKCIJA OTAPALOM**

Ekstrakcija otapalom metoda je koja ima široku primjenu kako u laboratorijima tako i u industriji, a upotrebljava se za pročišćavanje i izolaciju željenih tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese. Ovo je jedna od najjednostavnijih i najučinkovitijih metoda izolacije aromatskih spojeva. Međutim, ima ograničenje plikom izolacije aromatskih spojeva iz prehrambenih matriksa koje sadrže lipide jer se lipidne komponente ekstrahiraju zajedno s aromatskim spojevima te ih je potrebno izdvojiti iz ekstrakta prije daljnje analize što dodatno komplicira postupak izolacije i utječe na kvalitetu izolata (29).

Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće ili iz čvrste faze važan je pravilan odabir otapala. Otapalo koje se koristi ne smije imati previsoku temperaturu vrenja kako bi se moglo lako ukloniti bez značajnijeg gubitka isparljivih spojeva i mora biti kemijski inertno prema tvarima prisutnim u uzorku. Važno je i da odabrano otapalo ima mogućnost ekstrakcije polarnih i nepolarnih spojeva iz uzorka. Stupanj miješanja dviju

faza, njihove relativne specifične gustoće, viskoznost i sklonost stvaranju emulzija također bi se trebali uzeti u obzir pri odabiru otapala. Najčešće se kao otapala koriste diklormetan, smjese pentana i dietil-etera, heksan, petroleter, kloroform, aceton i etanol (28; 30).

#### **1.5.1.1. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE**

Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. liquid–liquid extraction) temelji se na različitoj topljivosti tvari koja se želi izolirati iz otopine i primjesa koje prate tu tvar, u dva otapala koja se ne miješaju. Obično su to vodena otopina tvari i organsko otapalo koje se ne miješa s vodom (28). Prijenos tvari odvija se difuzijom otopljene tvari kroz faznu granicu fino raspršenih kapljica pri čemu dolazi do razdjeljenja tvari između otapala. Raspodjela tvari među fazama ovisi o topljivosti tvari u organskom otapalu (31).

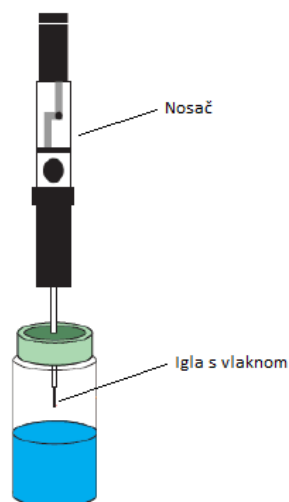
Za najjednostavnije ekstrakcije najčešće se upotrebljava lijevak za odjeljivanje u kojem se otopina i organsko otapalo izmučkavaju. Pritom se stvara velika dodirna površina između dvije faze čime se povećava uspješnost ekstrakcije. Učinak je bolji ako se ekstrakcija ponovi više puta korištenjem manje količine otapala, nego jednom upotrebom cijele količine otapala.

Brojni su nedostaci ove metode pa tako kod uklanjanja otapala može doći do gubitka najisparljivijih spojeva, a za vrijeme ekstrakcije može doći i do pojave emulzije. Često je potrebna i velika količina uzorka za dobivanje koncentriranog ekstrakta. Problem kod daljnje analize mogu uzrokovati neisparljive tvari i obojene tvari koje se mogu naći u ekstraktu (28). Zbog navedenih nedostataka ekstrakcija tekuće-tekuće se sve više zamjenjuje drugim suvremenijim tehnikama izolacije poput destilacije potpomognute mikrovalovima, mikrovalne ekstrakcije, ultrazvučne ekstrakcije i mikroekstrakcije na krutoj fazi.

#### **1.5.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI**

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. headspace solid phase microextraction, HS-SPME) je jednostavna, osjetljiva i brza metoda za ekstrakciju analita iz plinovitih, tekućih i krutih uzoraka te se uspješno primjenjuje na veliki broj hlapljivih spojeva. Postupak HS-SPME sastoji se od dva osnovna koraka. Prvi korak je

raspodjela organskih spojeva između faze ekstrakcije i matrice uzorka, dok je drugi korak desorpcija koncentriranih ekstrakata u analitički instrument (32). Obično se HS-SPME koristi u kombinaciji sa spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS). Za razliku od uobičajene ekstrakcije tekuće-tekuće koja se sastoji od više koraka, kao što su ekstrakcija, koncentriranje i prijenos do plinskog kromatografa, kod HS-SPME metode sve je integrirano u jedan korak, što uvelike pojednostavljuje postupak izolacije (33). Aparatura za HS-SPME vrlo je jednostavna, a izgleda kao modificirana šprica. Sastoji se od nosača, igle i HS-SPME vlakna (slika 6). HS-SPME vlakno je tanko optičko vlakno, obavijeno tankim polimernim filmom koji apsorbira i koncentrira organske spojeve. Različiti polimeri koji se koriste za oblaganje izrađeni su od istih materijala kao i oni koji se koriste za kromatografske kolone (polidimetilsiloksan, divinilbenzen, karbovaks itd.). Svojstva vlakna ovise o polimeru, njegovoj debljini, polarnosti i poroznosti. Pri odabiru tipa vlakna potrebno je razmotriti prirodu uzorka koji se analizira. Vlakno koje ima sličan polaritet kao i analit pogoduje adsorpciji čime se utječe na selektivnost ekstrakcije (34; 35). Prije upotrebe vlakno je potrebno kondicionirati, stavljajući ga 0,5-4 h na visoku temperaturu.



**Slika 6.** Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (36)

## **1.6. INSTRUMENTALNA ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

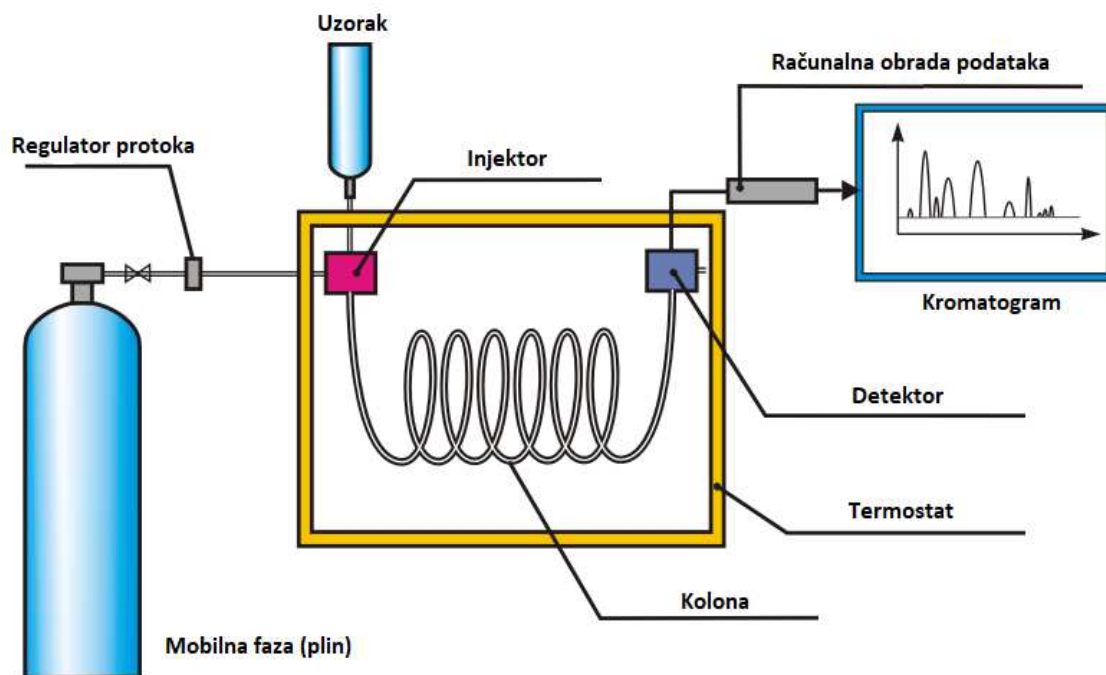
Za analizu i identifikaciju hlapljivih spojeva koriste se kromatografske (plinska i tekućinska kromatografija) i spektrometrijske tehnike. Najčešća je upotreba kromatografije i to individualno ili u sprezi sa spektrometrijom masa.

### **1.6.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA**

Kromatografija je fizikalna metoda razdvajanja smjese koja se zasniva na različitoj raspodjeli tvari između stacionarne i mobilne faze. Ovisno o vrsti korištene mobilne faze razlikuju se tekućinska i plinska kromatografija. Plinska kromatografija (engl. Gas Chromatography, GC) ne zahtijeva prethodne operacije stoga predstavlja vrlo brzu tehniku odjeljivanja. Plinski kromatograf sastoji se od injekcijskog bloka, kromatografske kolone sa stacionarnom fazom, termostata, detektora i računala (slika 7) (35,36).

Uzorci koji se analiziraju moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja. Stacionarna faza najčešće je tekućina vezana za stijenke kapilare ili nanosena na kruti adsorbens. Mobilna faza je inertni plin ( $N_2$ , Ar, He) koji ne stupa u reakciju sa sastojcima smjese (37).

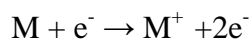
Mala količina uzorka unosi se u injektor smješten na vrhu kolone. Injektor je zagrijani dio uređaja u kojemu temperatura mora biti iznad temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente. Iz tog razloga uzorak tijekom unošenja u kolonu brzo i potpuno ispari. Inertni plin potom prenosi pare uzorka kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom na kojoj se vrši odjeljivanje sastojaka smjese. Detektor utvrđuje prisutnost odijeljenih komponenata smjese u plinu nositelju po izlasku iz kolone. U plinskoj kromatografiji najčešća je upotreba plameno-ionizacijskih detektora, detektora toplinske vodljivosti i detektora apsorpcije elektrona (38).



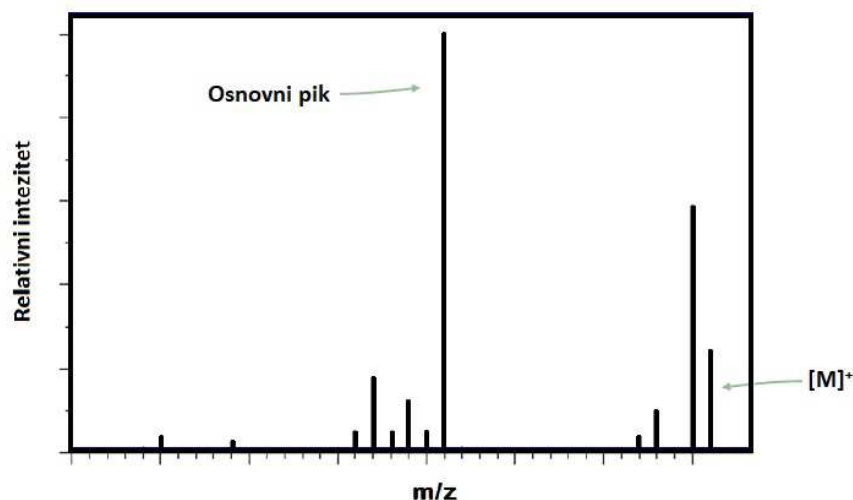
**Slika 7.** Shematski prikaz plinskog kromatografa (39)

### 1.6.2. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (engl. Mass spectrometry, MS) je metoda koja se zasniva na ionizaciji plinovitog uzorka, njegovoj fragmentaciji, razdvajanju fragmenata s obzirom na omjer njihove mase i naboja te obradi podataka dobivenih u obliku masenih spektara. Glavni dijelovi svakog masenog spektrometra su ionizator, analizator i detektor. U ionizator se unosi mala količina uzorka u plinovitom stanju koji se tijekom elektronske ionizacije bombardira elektronima energije (50-70eV) pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivan ion  $M^+$  (molekulski ion) koji se fragmentira:



Na taj način nastaju razni fragmenti, a analizom je moguće utvrditi kemijsku strukturu spoja i molekulsku masu. Dobiveni ioni okarakterizirani su veličinom  $m/z$  (omjer mase i naboja fragmenta) i intenzitetom. Osjetljivi dio analizatora ione registrira kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala. Kao rezultat analize dobije se spektar masa koji prikazuje odnos intenziteta i omjera mase te naboja ( $m/z$ ) nastalih fragmenata (slika 8) (36,39).

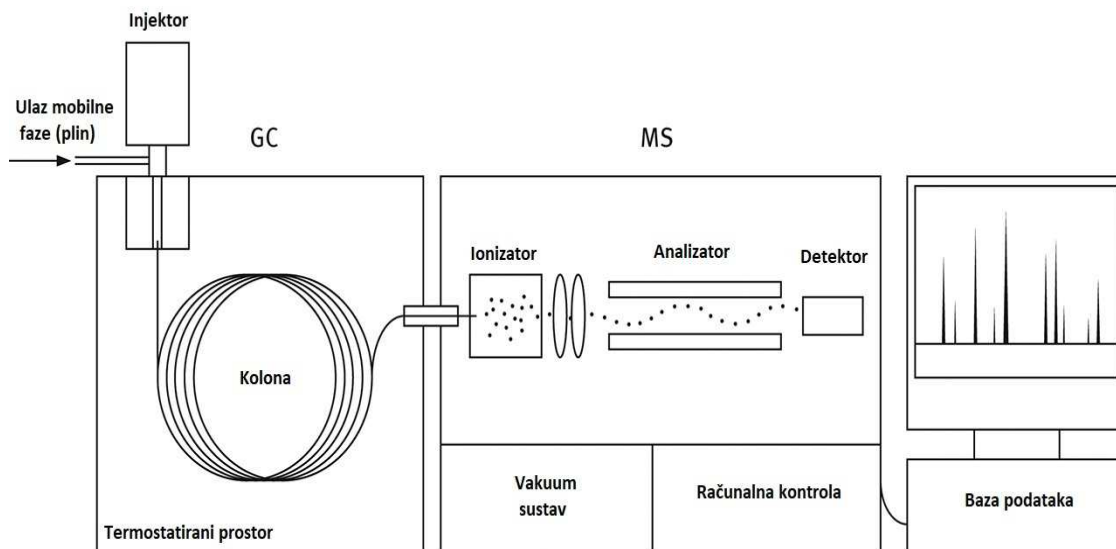


**Slika 8.** Spektar masa (40)

### 1.6.3. SPREGNUTA TEHNIKA PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA

Kombinacija tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine materijala. Plinska kromatografija je izvrsna tehnika za separaciju i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje te se zato koristi u kombinaciji s masenom spektrometrijom koja anulira taj nedostatak. Kombinacijom dviju metoda postiže se visoka osjetljivost (reda veličine  $10^{-12}$  -  $10^{-15}$  g) te omogućava analiza smjese s velikim brojem komponenata relativno velikom brzinom. Četveropolni analizator masa omogućava snimanje spektra u nekoliko milisekundi. Iako je GC-MS tehnika vrlo osjetljiva poteškoće u analizi može izazvati slaba hlapljivost nekih spojeva ili njihova nestabilnost pri povišenim temperaturama (37).

Komponente smjese odjeljuju se u termostatoranoj koloni plinskog kromatografa i kao takve odlaze plinom nositeljem u detektor (spektrometar masa). Dobiveni spektar masa uspoređuje se s računalnom bazom spektra masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega se može identificirati spoj (slika 9). Međutim, GC-MS metoda daje još jedan važan podatak za identifikaciju spoja, a to je vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni odnosno retencijsko vrijeme.



**Slika 9.** Shematski prikaz spregnute tehnike GC-MS (41)



## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu izolirani su i identificirani hlapljivi spojevi šest različitih uzoraka biske s područja Istre i Kvarnera prikupljeni u veljači 2021. godine. Hlapljivi spojevi iz uzoraka izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pomoću dva vlakna različite polarnosti (plavo vlakno, sivo vlakno). Uzorci su do idućeg uzorkovanja skladišteni u zamrzivaču. Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom tekuće-tekuće napravljena je u svibnju 2021. godine.

### 2.1. APARATURA I KEMIKALIJE

Prilikom provođenja eksperimentalnog dijela rada korištena je sljedeća aparatura:

- tehnička vaga, Kern&Sohn, Njemačka,
- magnetska miješalica i vodena kupelj s termostatom, Heidolph EKT 3001, Njemačka,
- držač za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi, Supelco Co., SAD,
- vlakna različite polarnosti:
  - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/Carboxen) dužine 5 cm (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):
  - GC 7820A, Agilent Technologies, SAD
  - MSD 5977E, Agilent Technologies, SAD
  - GC kapilarna kolona HP-5MS, J&W, SAD

Stacionarna faza: 5% difenil-95% dimetilpolisilksan

Od kemikalija je upotrebljeno sljedeće:

- destilirana vodu
- NaCl (kuhinjska sol), Solana Pag, Hrvatska
- pentan, Kemika, Zagreb, Hrvatska,
- dietil-eter, Panreac, Španjolska
- bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska,

## **2.2. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Hlapljivi spojevi izolirani su dvjema različitim metodama izolacije i to: mikroekstakcijom vršnih para na krutoj fazi i ekstrakcijom tekuće-tekuće.

### **2.1.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI**

Izolacija hlapljivih spojeva iz uzoraka biske HS-SPME metodom provedena je upotrebom je plavog i sivog vlakna.

Vlakna je, prije upotrebe, bilo potrebno aktivirati kondicioniranjem. U skladu s uputama proizvođača, SPME igla je postavljena u injektor plinskog kromatografa 60 min na 300 °C. Po završetku kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Volumen od 5 mL uzorka prelije se u staklenu posudu od 15 mL te se doda žličica soli. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj zagrijanu na 40 °C. Sadržaj je miješan magnetskom miješalicom, a broj okretaja je podešen na 250 okr/min. Na slici 10 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

Uzorak je kondicioniran 15 minuta, a potom je HS-SPME igla postavljena u posudu. Provedena je ekstrakcija vršnih para pomoću vlakna u trajanju od 40 min. Nakon uzorkovanja, vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu. Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS- SPME.



**Slika 10.** Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

#### **2.4.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE**

Ekstrakcija hlapljivih spojeva iz uzoraka provedena je diskontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće koristeći smjesu dva organska otapala (pentan:dietil-eter, 1:1 v/v).

U Erlenmeyerovu tikvicu stavljeno je 40 mL uzorka, 20 mL destilirane vode, 30 mL smjese otapala pentan:dietil-eter, dvije žličice kuhinjske soli (NaCl) i magnetić. Erlenmeyerova tikvica postavljena je na magnetsku miješalicu, a broj okretaja podešen je na 750 okr/min. Postupak ekstrakcije trajao je 45 minuta, a proveden je pri sobnoj temperaturi.

Po završetku ekstrakcije smjesa je ostavljena nekoliko minuta kako bi se slojevi odijelili. U gornjem dijelu smjese izdvojio se organski sloj, odnosno ekstrakt pentana i dietil etera, dok se u donjem dijelu izdvojio vodeni sloj. Organski sloj je kapaljkom odijeljen od vodenog sloja te filtriran preko vate na koju je stavljen sloj sredstva za

sušenje (bezvodni natrijev sulfat). Time je organski sloj osušen, odnosno uklonjeni su ostatci vode u organskom sloju.

## 2.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Kvalitativna i kvantitativna analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa. Pritom je korišten plinski kromatograf u kombinaciji s masenim detektorom spojenim na računalo (slika 11).

Separacija sastojaka izvršena je na nepolarnoj kapilarnoj koloni HP-5MS, duljine 30 m i širine 0,25 mm, sa slojem stacionarne faze (5% difenil-95% dimetilpolisilksan) debljine 0,20  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj je helij čiji je protok podešen na 1 mL/min. Temperatura injektora je 250 °C, a volumen injektiranog uzorka iznosi 1  $\mu\text{L}$ . Temperatura kolone programirana je na sljedeći način: 2 minute na 70 °C, a zatim se zagrijava do 200 °C brzinom od 3 °C po minuti.



**Slika 11.** Spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Kao detektor korišten je spektrometar masa. Energija ionizacije uzorka u spektrometru masa je 70 eV, temperatura detektora iona je postavljena na 280 °C, dok interval snimanja obuhvaća 30-300 masenih jedinica. Uzorak je dodan odjednom, a zbog povišene temperature trenutno ispari. Reproducibilnost je osigurana kada su uspostavljeni stacionarni uvjeti, stabilizirani protoci i temperatura.

Za svaki analizirani uzorak kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente koja je na kromatogramu predstavljena pikom,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima (udio površine pika u ukupnoj površini),
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postocima).

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> *n*-alkane za HP-5MS kolonu) s onima iz literature, kao i uspoređujući njihove spektre masa sa spektrima iz biblioteka masenih spektara *Wiley 09* i *NIST14* (eng. National Institute of Standards and Technology). Postoci identificiranih komponenti iz uzoraka biske izračunati su iz površine GC pikova.

### 3.REZULTATI

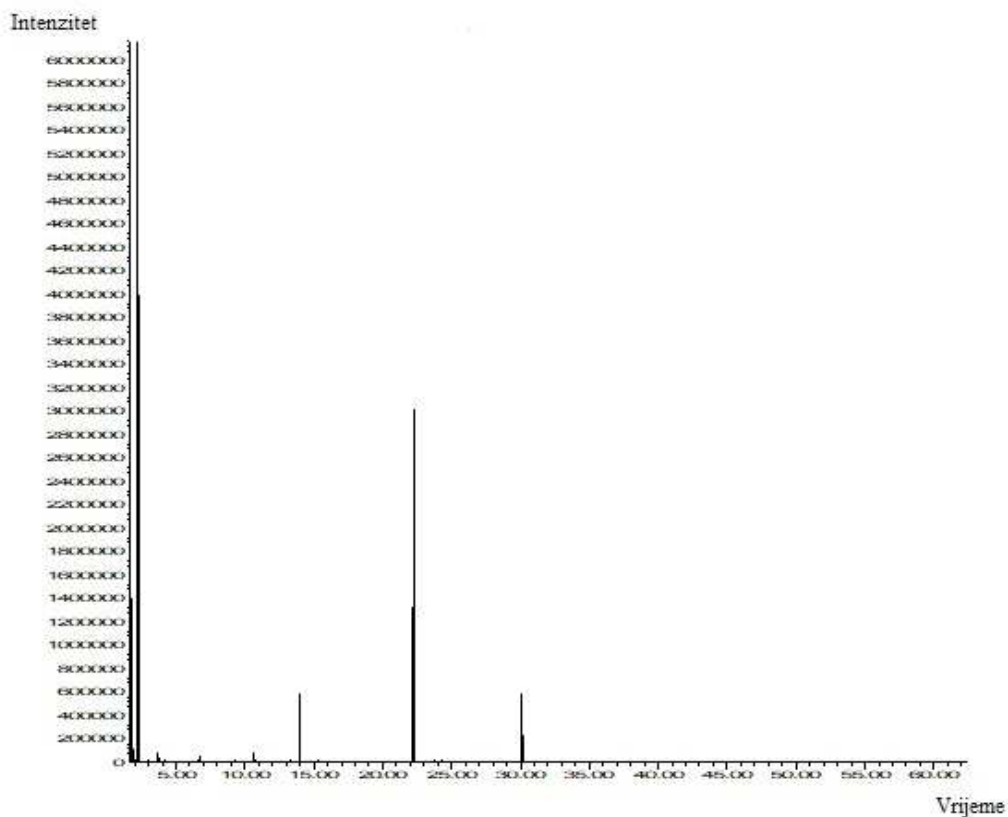
Hlapljivi aromatični spojevi uzoraka biske analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na koloni HP-5MS. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 1, 2 i 3, a spojevi su razvrstani prema kemijskim skupinama. Za svaku metodu dan je primjer izgleda kromatograma jednog odabranog uzorka (slika 12,13 i 14).

**Tablica 1.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva rakije biske dobiven HS-SPME metodom pomoću plavog vlakna

Red. broj	Spoj	RI <sup>1</sup>	1	2	3	4	5	6
<b>Alkoholi</b>								
1.	propanol	<900	-	-	15,7	-	-	-
2.	2-metil-propan-1-ol	<900	5,8	4,7	5,3	6,3	12,4	10
3.	3-metil-butan-1-ol	<900	39,5	29,5	45,2	44,1	46,1	52,3
4.	heksanol	<900	2,1	0,3	-	1,1	-	-
5.	2-metil-butan-1-ol	<900	-	-	-	-	14,4	17,1
6.	2-feniletanol	1116	-	-	-	0,8	-	-
<b>Esteri</b>								
7.	etil-acetat	<900	6,4	5,5	4,5	1,1	4,3	8,5
8.	etil-butanoat	<900	0,3	-	0,6	-	-	-
9.	3-metil-butan-1-ol-acetat	<900	0,2	-	-	-	-	-
10.	etil-heksanoat	996	1,1	-	1,1	-	-	0,4
11.	etil-oktanoat	1198	8,6	1,8	6,2	6	6	1,6
12.	etil-dekanoat	1397	26,2	2,5	12,9	32,3	7,6	4,2
13.	etil-dodekanoat	1593	2,7	33,9	-	6,7	-	1,5
<b>Alkani</b>								
14.	pentadekan*	1500	-	0,7	-	-	-	-
15.	heksadekan*	1600	2,1	5,2	-	-	-	-
16.	heptadekan*	1700	0,6	0,8	-	-	-	-
17.	oktadekan*	1800	0,9	6,3	-	-	-	-
<b>Ukupno identificirano</b>			96,5%	91,2%	91,5%	98,4%	90,8%	96,9%

<sup>1</sup> Retencijski indeks na koloni HP-5MS

\* identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



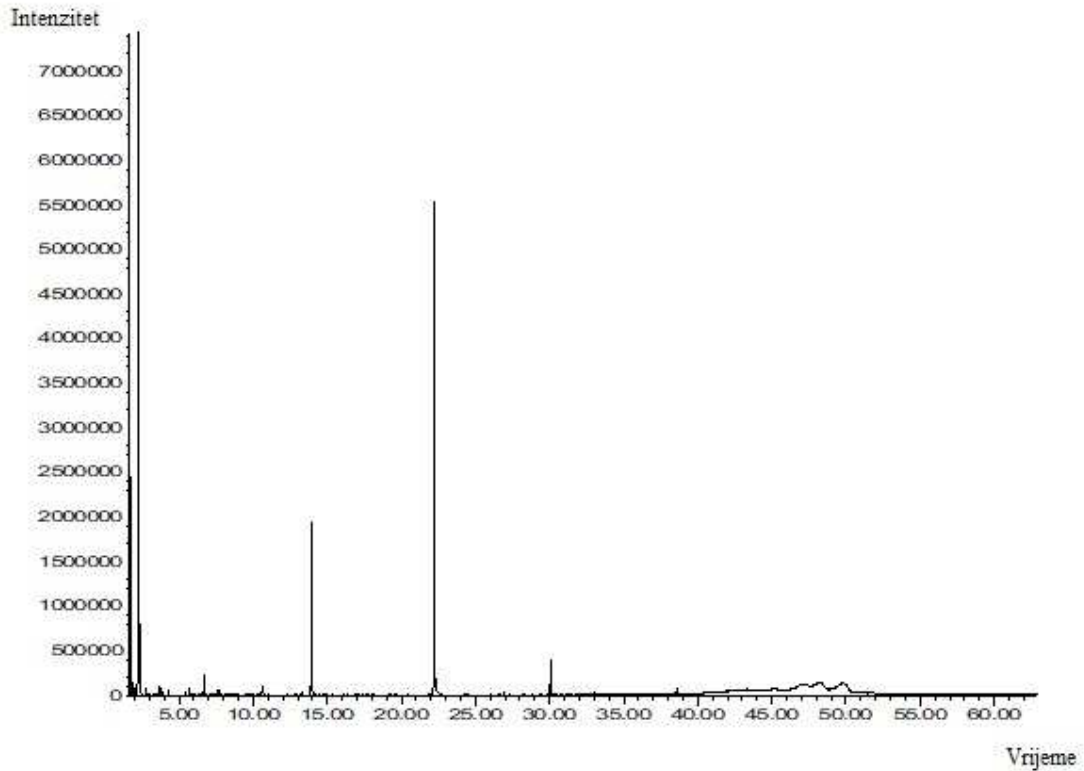
**Slika 12.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva rakije biske izoliran iz uzorka 4 HS-SPME metodom pomoću plavog vlakna

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva rakije biske dobiven HS-SPME metodom pomoću sivog vlakna

Red. broj	Spoj	RI <sup>1</sup>	1	2	3	4	5	6
<b>Alkoholi</b>								
1.	propanol	<900	12,2	-	-	-	-	-
2.	butan-2-ol	<900	4	-	-	-	-	-
3.	2-metil-propan-1-ol	<900	11,5	13,4	6,4	10,6	11,3	10,3
4.	3-metil-butan-1-ol	<900	33,5	57,8	39,5	56,7	59,1	51,8
5.	heksanol	<900	1,6	0,6	0,5	-	0,2	-
6.	butanol	<900	-	-	-	0,6	-	-
7.	2-metil-butan-1-ol	<900	-	-	-	-	-	21,3
<b>Esteri</b>								
8.	etil-acetat	<900	10,5	13,2	4,1	2,1	7,7	10,6
9.	etil-butanoat	<900	0,3	-	0,3	-	-	-
10.	3-metil-butan-1-ol-acetat	<900	0,8	-	-	-	-	-
11.	etil-heksanoat	996	1,2	1	1,1	0,8	1	-

<b>12.</b>	etil-oktanoat	1198	4,9	5,4	10,8	7,5	6,2	2,4
<b>13.</b>	etil-dekanoat	1397	11,3	6,4	33,1	18,1	10,9	2,6
<b>14.</b>	etil-dodekanoat	1593	0,8	-	2,3	2,2	2,3	-
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>92,6%</b>	<b>98,3%</b>	<b>98,1%</b>	<b>98,6%</b>	<b>98,7%</b>	<b>99,0%</b>

<sup>1</sup> Retencijski indeks na koloni HP-5MS



**Slika 13.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva rakije biske izoliran iz uzorka 3 HS-SPME metodom pomoću sivog vlakna



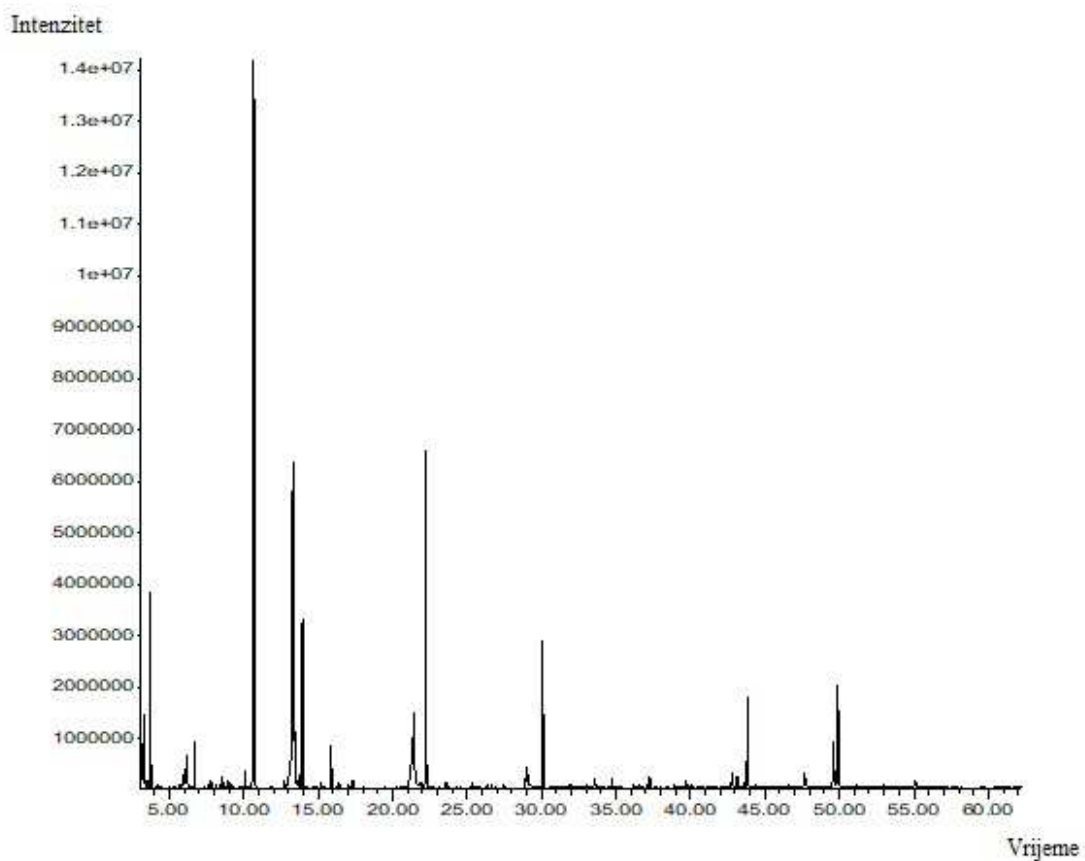
**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim ekstrakcijom tekuće-tekuće

Red. broj	Spoj	RI <sup>1</sup>	1	2	3	4	5	6
<b>Alkoholi</b>								
1.	3-metil-penten-1-ol	<900	-	-	-	-	-	1,2
2.	(Z)-heks-3-en-1-ol	<900	1,3	-	-	0,1	-	-
3.	heksanol	<900	23,4	21,2	4,1	13,3	12	2,9
4.	heptanol	969	0,9	-	-	-	-	-
5.	benzil-alkohol*	1037	0,8	1,1	-	0,8	0,6	0,3
6.	oktanol	1068	0,8	-	-	-	-	-
7.	2-feniletanol*	1106	2,4	25,3	22,3	36,1	34,9	28,9
<b>Esteri</b>								
8.	3-metil-butan-1-ol- acetat	<900	-	-	-	-	1,3	-
9.	izoamil-acetat	<900	1,9	-	-	-	-	0,3
10.	etil-acetat	<900	-	-	1,1	-	-	-
11.	etil-heksanoat	996	1,1	2,4	1,1	1,1	2,8	1
12.	dietil-sukcinat	1181	2,4	11,5	2,2	3,4	6,8	13,9
13.	etil-oktanoat	1198	9,6	6,9	1,9	5,6	6,5	4,8
14.	etil-dekanoat	1397	17,9	7,2	3,4	14,7	6,2	10,5
15.	etil-dodekanoat	1593	2,8	1,3	-	4,7	2,3	4,7
16.	etil-tetradekanoat	1793	-	-	-	-	-	0,4
17.	etil-heksadekanoat	1992	0,9	3,1	-	1,3	1,3	3
18.	etil-linoleat	2159	2,6	2,9	-	1,3	-	2,2
<b>Aldehidi</b>								
19.	2-furankarboksialdehid	<900	-	1	3,1	-	0,9	-
20.	(E,E)-heksa-2,4-dienal	910	1	-	-	-	-	-
21.	benzaldehyd	965	1,7	-	-	-	1,2	-
22.	2-fenilacetaldehyd	1048	0,5	-	-	-	-	-
23.	5-hidroksimetilfurfural	1209	4,5	-	23,4	-	-	-
<b>Terpeni</b>								
24.	1,8-cineol	1039	0,1	-	-	-	-	-
25.	oktanol	1068	0,8	-	-	-	-	-
26.	trans-linalol oksid	1078	0,7	-	-	-	-	-
27.	cis-linalol oksid	1091	0,4	-	-	-	-	-
28.	linalol	1101	1,5	1	1,1	1	0,6	0,5
<b>Masne kiseline</b>								
29.	izovalerijanska kiselina*	<900	-	-	-	-	-	0,8
30.	heksanska kiselina	974	1	1,1	0,6	1	1,6	2,5
31.	oktanska kiselina	1174	3,9	1,8	2,5	3,6	2,6	2,1

32.	dekanska kiselina	1370	8,2	1,1	3,4	2,8	1,6	8,2
33.	dodekanska kiselina	1570	-	-	-	-	2,3	1,1
34.	tetradekanska kiselina	1768	-	-	1,6	-	-	-
<b>Ostalo</b>								
35.	1,3-dimetilbenzen*	<900	0,7	3,4	18,2	1,4	7,8	0,2
36.	nonan	900	-	-	-	-	3,9	-
37.	4-vinilfenol*	1221	-	1,7	-	-	-	-
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>91,0%</b>	<b>93,9%</b>	<b>89,9%</b>	<b>92,2%</b>	<b>94,2%</b>	<b>89,5%</b>

<sup>1</sup> Retencijski indeks na koloni HP-5MS

\* identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



**Slika 14.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva rakije biske izoliran iz uzorka 6 ekstrakcijom tekuće-tekuće

## 4. RASPRAVA

Proizvodnja rakije obuhvaća mnoge tehnološke postupke u kojima se odvijaju različite kemijske promjene. One rezultiraju nastankom brojnih aromatičnih tvari čiji udjel i sastav određuju kvalitetu finalnog proizvoda zbog čega je njihova identifikacija vrlo važna. Cilj ovog rada bio je okarakterizirati profil hlapljivih spojeva koji čine aromu tradicionalne istarske rakije biske, odnosno odrediti sastav i udio hlapljivih spojeva u šest različitih uzoraka biske, usporediti dobivene rezultate, te utvrditi razlike i sličnosti u analizi uzorka korištenjem dviju različitih metoda izolacije.

Ukupno je identificirano 46 hlapljivih spojeva: 12 alkohola, 12 estera, 6 masnih kiselina, 5 aldehida, 5 alkana, 4 terpena, 1 fenolni spoj i 1 aromatski ugljikovodik. HS-SPME metodom izolirano je 19 spojeva od toga 11 spojeva nije detektirano nakon ekstrakcije tekuće-tekuće. Metoda ekstrakcije tekuće-tekuće rezultirala je puno većim brojem spojeva, a ukupno je identificirano 36 spojeva od kojih 28 nije detektirano SPME metodom. Metoda ekstrakcije tekuće-tekuće pokazala se učinkovitijom za izolaciju aldehida, terpena i kiselina jer niti jedan spoj koji pripada ovim skupinama nije izoliran SPME metodom. SPME metodom pomoću plavog vlakna izolirani su alkoholi, esteri te četiri različita alkana koji su identificirani u uzorcima 1, 2 i 6, dok spojevi izolirani korištenjem sivog vlakna pripadaju samo skupinama alkohola i estera.

### 4.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva iz uzoraka dobiven HS-SPME metodom izolacije koristeći plavo vlakno i sivo vlakno prikazan je u tablicama 1 i 2. Nakon izolacije pomoću plavog vlakna ukupno je identificirano 17 spojeva dok je izolacijom pomoću sivog vlakna identificirano 14 spojeva. Spojevi koji su identificirani u svakom uzorku pomoću oba vlakna su: 2-metil-propan-1-ol, 3-metil-butan-1-ol, etil-acetat, etil-oktanoat i etil-dekanoat. Plavim vlaknom izolirano je 5 spojeva koji nisu identificirani korištenjem sivog vlakna i to: 2-feniletanol, pentadekan, heksadekan, heptadekan i oktadekan. Butanol i butan-2-ol detektirani su jedino korištenjem sivog vlakna.

## PLAVO VLAKNO

Korištenjem plavog vlakna izolirano je 6 viših alkohola, a najzastupljeniji u svim uzorcima je 3-metil-butan-1-ol. Njegov udio kreće se u rasponu od 39,5% do 52,3%. Izuzetak je uzorak 2 u kojem je 3-metil-butan-1-ol drugi spoj po zastupljenosti, a u većem postotku izoliran je samo etil-dodekanoat (33,9%). Viši alkoholi nastaju kao sekundarni produkti procesa fermentacije razgradnjom aminokiselina, a karakterizira ih sladna i zagorena aroma. Smjesa 2-metilbutan-1-ola i 3-metilbutan-1-ola (izoamilni alkohol) u literaturi se navodi kao glavni aromatični spoj u rakijama, a nositelj je alkoholnog mirisa i mirisa otapala. Upravo zbog toga je zanimljivo da se 2-metil-butan-1-ol pojavljuje samo u uzorku 5 (14,4%) i uzorku 6 (17,1%). Propanol je izoliran samo u uzorku 3 (15,7%), dok je 2-feniletanol pronađen jedino u uzorku 4 (0,8%). Heksanol je izoliran u uzorku 1 (2,1%), uzorku 2 (0,3%) i uzorku 4 (1,1%), a njegovo podrijetlo i aroma bit će detaljno pojašnjeni u nastavku rada.

Esteri se smatraju jednim od najvažnijih aromatskih skupina spojeva u destilatima. Njihove količine i međusobni omjeri od velike su važnosti za percipirani okus alkoholnog pića zbog njihovog niskog praga detekcije (22; 42). Plavim vlaknom izolirano je 7 estera, od kojih su identificirana 3 estera masnih kiselina srednjeg lanca, 2 estera masnih kiselina kratkog lanca i 2 acetatna estera. Etil-acetat, etil-oktanoat i etil-dekanoat pronađeni su u svim uzorcima iako se njihova zastupljenost značajno razlikuje ovisno o promatranom uzorku. Najzastupljeniji ester je etil-dekanoat (7,6%-32,3%), s izuzetkom uzorka 2 i 6. U uzorku 2 uvjerljivo dominira etil-dodekanoat (33,9%), dok u uzorku 6 prevladava etil-acetat (8,5%). Etilni esteri masnih kiselina srednjeg lanca nastaju tijekom fermentacije sirovog materijala nositelji su voćne i cvjetne arome. Konkretno, aroma etil-oktanoata podsjeća na banane, ananas i rakije, dok se uljane, voćne i groždane arome pripisuju etil dekanoatu (43). Udio etil-acetata u uzorcima kreće se u rasponu od 1,1% do 8,5%. To je spoj koji uglavnom nastaje esterifikacijom octene kiseline, a ima karakterističan miris koji podsjeća na ljepilo ili aceton zbog čega njegova prisutnost u većoj mjeri nije poželjna.

Alkani su posljednja skupina spojeva izolirana plavim vlaknom. Oni su kvantitativno najmanje zastupljeni spojevi, a pronađeni su samo u uzorcima 1 i 2. Ukupno je izolirano 4 alkana: pentadekan, heksadekan, heptadekan i oktadekan. Svi se pojavljuju u oba uzorka osim pentadekana koji nije identificiran u uzorku 1. Alkani nisu karakteristični sastojci destilata stoga se može pretpostaviti da potječu od imele.

Hayashi i sur. (1996) identificirali su više od 200 spojeva iz ulja tri različite imele (svježe i osušene stabljike i lišća) roda *Viscum* (44). Svi identificirani alkani u ovom radu pronađeni su i u njihovoj studiji.

### **SIVO VLAKNO**

Korištenjem sivog vlakna izolirano je 7 viših alkohola od kojih se 3-metil-butan-1-ol i 2-metil-propan-1-ol pojavljuju u svim uzorcima. Najzastupljeniji alkohol je 3-metil-butan-1-ol, a njegov udio kreće se u rasponu od 33,5% do 59,1%. Butanol i butan-2-ol izolirani su samo pomoću sivog vlakna, a pojavljuju se u uzorku 4 (0,6%) i uzorku 3 (4%). Oni ne nastaju alkoholom fermentacijom već potječu od sirovina korištenih u proizvodnji destilata. Nikićević i Tešević (2010) navode da je povećan sadržaja butan-2-ola karakterističan za rakiju lozovaču, međutim previsoke razine butan-2-ola mogu ukazivati na bakterijsko kvarenje sirovina ili komine (22; 45). Butanol i butan-2-ol imaju visok prag mirisne detekcije stoga njihov utjecaj na aromu nije značajan. Propanol je izoliran samo u uzorku 1 (12,2%). To je spoj koji nastaje tijekom alkoholne fermentacije, međutim ukoliko se u destilatu pojavljuje u višoj koncentraciji može biti pokazatelj kvarenja komine (22). Viši alkohol 2-metil-butan-1-ol pojavljuje samo u uzorku 7 (21,3%), dok je heksanol je izoliran u uzorku 1 (1,6%), uzorku 2 (0,6%), uzorku 3 (0,5%) i uzorku 5 (0,2%).

Svi esteri izolirani sivim vlaknom pronađeni su i korištenjem plavog vlakna iako se njihova zastupljenost razlikuje. Spojevi identificirani u svakom uzorku ponovno su etil-acetat, etil-oktanoat i etil-dekanoat, a etil-heksanoat nije identificiran samo u uzorku 6. Za etil-heksanoat u literaturi se navodi kako ima miris koji podsjeća na vino (46). Najzastupljeniji spoj u uzorcima 1, 3, 4 i 5 je etil-dekanoat (10,9-33,1%), dok u uzorcima 2 i 6 prevladava etil-acetat (13,2%, 10,6%). Acetatni esteri, 3-metil-butan-1-ol-acetat, pronađen je samo u uzorku 1 što je bio slučaj i kod korištenja plavog vlakna, a zbog niskog udjela njegov doprinos aromi rakije biske nije značajan. Etil-dodekanoata identificiran je u uzorcima 1,3,4,5 (0,8-2,3%), a može se zaključiti da upotpunjuje aromu destilata jer je nosioc voćnog i cvjetnog mirisa (46).

## 4.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva iz uzoraka dobiven ekstrakcijom tekuće-tekuće prikazan je u tablici 3. Ovom metodom ukupno je izolirano 36 spojeva: 11 estera, 7 alkohola, 6 masnih kiselina, 5 aldehida, 4 terpena, 1 alkan, 1 fenol i 1 aromatski ugljikovodik. Od svih detektiranih alkohola samo su heksanol i 2-feniletanol izolirani korištenjem SPME metode. Međutim, SPME metodom izolacije 2-feniletanol detektiran je samo u uzorku 4 u vrlo niskom postotku (0,8%) dok je kod ekstrakcije tekuće-tekuće on jedan od najzastupljenijih spojeva. Sličan slučaj je i s heksanolom čija se zastupljenost u SPME metodi kreće od 0,2% do 2,1% dok je njegov udio kod ekstrakcije tekuće-tekuće značajno veći, a u uzorku 1 on je najzastupljeniji spoj. Još je šest spojeva identificirano pomoću obje metode, a svi oni pripadaju skupini estera (3-metil-butan-1-ol-acetat, etil-acetat, etil-heksanoat, etil-oktanoat, etil-dekanoat, etil-dodekanoat).

Od svih identificiranih alkohola samo se 2-feniletanol i heksanol pojavljuju u svim uzorcima. Već je napomenuto da je 2-feniletanol najzastupljeniji spoj, a njegov udio kreće se u rasponu od 22,3% do 36,1%. Izuzetak je uzorak 1, gdje se on nalazi u znatno nižem postotku (2,4%). Aromatski alkohol, 2-feniletanol, nastaje metabolizmom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u procesu fermentacije, a nositelj je karakterističnog mirisa na ružu (42). Drugi identificirani za aromu bitan spoj je heksanol. Njegova zastupljenost u uzorcima varira između 2,9% i 23,4%. On se zajedno s (*Z*)-heks-3-en-1-olom svrstava u grupi takozvanih C<sub>6</sub> spojeva. To su spojevi koji nastaju u tehnološkim postupcima primarne prerade grožđa te tijekom eventualnog zagrijavanja mošta ili maceracije grožđa pri čemu dolazi do enzimatske razgradnje i naknadne redukcije dugolančanih masnih kiselina. Heksanol može nastati i tijekom procesa fermentacije kao produkt metabolizma kvasaca. C<sub>6</sub> alkoholi pozitivno utječu na aromu rakija, a njihov miris je u literaturi opisan izrazima: zelena trava i lišće. Međutim, prekomjerne količine 1-heksanola mogu rezultirati oštrim i odbojnim mirisom koji podsjeća na kakao, sladić, pa čak i na pastu za zube, što može ozbiljno umanjiti osjetnu kvalitetu rakije (47; 48). Svi ostali identificirani alkoholi prisutni su u udjelima manjim od 1,3%.

Kvantitativno, značajne komponente su i etil esteri masnih kiselina, i to: etil-dekanoat, etil-oktanoat i dietil-sukcinat, koji su identificirani u svim uzorcima. Na ove spojeve otpada 3,4-17,9% ukupni aromatski spojevi za etil-dekanoat, 1,9-9,6% za etil-oktanoat, 2,2-13,9% za dietil-sukcinat. Prisutnost dietil-sukcinata u destilatu može biti

pokazatelj mogućeg kvarenja prefermentirane komine u periodu od završetka fermentacije do destilacije, a njegova povećana koncentracija dovodi do smanjenja voćnih aroma rakije (42). Metodom ekstrakcije tekuće-tekuće izolirana su 3 etilna estera masnih kiselina dugog lanca: etil-tetradekanoat, etil-heksanoat, etil-linoleat. Oni doprinose aromi destilata samo kada su prisutni u višim koncentracijama, a imaju miris na vosak i svijeće (42). Svi ostali identificirani esteri prisutni su u niskim udjelima, a zanimljivo je kako je etil-acetat, koji je u SPME metodi jedan od najzastupljenijih estera, pomoću ekstrakcije tekuće-tekuće izoliran samo u uzorku 3.

Šest aldehida izolirano je ekstrakcijom tekuće-tekuće, ali njihov udio u ukupnom aromatskom profilu uzoraka vrlo je nizak te se može zaključiti da nemaju značajni utjecaj na aromu biske. Izuzetak je 5-hidroksimetilfurfural koji se pojavljuje u uzorku 1 (4,5%) i uzorku 3 (23,4%). Njegova visoka zastupljenost u uzorku 3 može se objasniti karakterističnim procesom proizvodnje. Naime, prilikom proizvodnje u ovu bisku se dodaje šećer, a ona, prije nego što se plasira na tržište, prolazi period odležavanja koji traje dvije godine. Čiča i sur. (2018) u svojem su istraživanju utvrdili da se pH biske kreće u rasponu od 4.4 do 6.5 (43). Uzmemo li sve navedene parametre u obzir može se reći da su zadovoljeni uvjeti za nastajanje 5-hidroksimetilfurfurala, a produženim vremenom odležavanja njegov se udio značajno povećava.

Od terpenskih spojeva u svim uzorcima je identificiran samo linalol, a njegov udio se kreće u rasponu od 0,5% do 1,5%. Ostali identificirani terpeni su *trans*-linalol oksid, *cis*-linalol oksid i 1,8-cineol, koji su pronađeni samo u uzorku 1. Oni su nosioci cvjetnog mirisa, a prag mirisne osjetljivosti im je relativno nizak. Svi identificirani terpeni u ovom radu pronađeni su i u prethodno spomenutom istraživanju Hayashi-a i sur. (1996) te se može pretpostaviti da potječu od imele, iako ne treba odbaciti mogućnost da je njihov izvor grožđe.

Alkoholnom fermentacijom nastaju i masne kiseline. Njihova biosinteza započinje u stanicama kvasca sintezom acetil-CoA, koji reagira s malonil-CoA stvarajući uglavnom zasićene ravnolančane masne kiseline s parnim brojem, od 4 do 18, atoma ugljika (22). Tri takve masne kiseline srednjeg lanca identificirane su u svim uzorcima i to: heksanska kiselina, oktanska kiselina i dekanska kiselina. One obično nemaju značajan utjecaj na aromu destilata zbog relativno visokih pragova mirisne detekcije. Miris koji karakterizira ove kiseline opisuje se kao neugodan i užegao (46; 47). Međutim, postoji mogućnost da ove kiseline potječu od imele. Naime, Hayashi i sur. (1996) u svojem istraživanju kao glavne hlapljive spojeve identificirane u imeli

navode baš te tri kiseline (44).

Od ostalih spojeva 1,3-dimetilbenzen je detektiran u svim uzorcima, a njegov udio kreće se u rasponu od 0,7% do 18,2%. Nonan je identificiran samo u uzorku 5 (3,9%), dok se 4-vinilfenol pojavljuje jedino u uzorku 2 (1,7%).



## 5. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir dobivene rezultate, kao i raspravu ovog diplomskog rada može se zaključiti:

- Promatrajući svaku metodu izolacije zasebno vidljive su određene sličnosti u izoliranim aromatičnim spojevima između uzoraka. Uočene razlike u aromatičnom profilu mogu se objasniti različitim recepturama proizvođača te razlikama u parametrima unutar proizvodnog procesa.
- Dobiveni rezultati prikazuju veliku raznolikost identificiranih aromatičnih spojeva ovisno o korištenoj metodi izolacije, a samo je 8 spojeva identificirano pomoću obje metode.
- Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi selektivno se izoliraju hlapljivi spojevi vršnih para male molekulske mase, dok se ekstrakcijom tekuće-tekuće izoliraju hlapljivi i poluhlapljivi spojevi.
- U HS-SPME analizi najzastupljeniji spojevi su 3-metil-butan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, etil-dekanoat, etil-oktanoat i etil-acetat. Spojevi koji nisu izolirani korištenjem plavog vlakna su butanol i butan-2-ol, dok korištenjem sivog vlakna nisu identificirani 2-feniletanol, pentadekan, heksadekan, heptadekan i oktadekan.
- Glavni spojevi izolirani metodom ekstrakcije tekuće-tekuće su: 2-feniletanol, heksanol, etil-dekanoat, etil-oktanoat, dietil-sukcinat i etil-heksadekanoat.
- U cilju standardizacije hlapljivih aromatskih spojeva rakije biske trebalo bi provesti daljnja ispitivanja na većem broju uzoraka, a za detaljniji aromatski profil potrebno je nastaviti istraživanje koristeći se različitim analitičkim metodama.

## 6. LITERATURA

1. Mujić I. Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića. Rijeka, Hrvatska: Veleučilište u Rijeci; 2010.
2. Pravilnik o jakim alkoholnim pićima. Narodne novine 61/09. Zagreb, Hrvatska: Narodne Novine Republike Hrvatske; 2009. Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_05\\_61\\_1405.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_05_61_1405.html).
3. URL: <https://wein-aus-kroatien.at/en/webshop-detail/aura-biska> (pristupljeno: 25.08.2021.).
4. Kirkup DW, Polhill RM, Wiens D. *Viscum* in the context of its family, Viscaceae, and its diversity in Africa. U: Büssing A, urednik. *Mistletoe: The Genus Viscum*. Amsterdam, The Netherlands: Hardwood Academic; 2000. str. 8-13.
5. Zuber D. Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora*. 2004;199:181-203.
6. Kovačec A, urednik. Hrvatska enciklopedija, 5. sv: Hu-Km. Zagreb, Hrvatska: Leksikografski zavod Miroslav Krleža; 2003.
7. Büssing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Research*. 1999;19:23-28.
8. Vicas SI, Rugina D, Socaciu C. Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album*). *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. 2011;7:115-130.
9. Büssing A. Introduction: Histori of mistletoe uses. U: Büssing A, urednik. *Mistletoe The Genus Viscum*. Amsterdam, The Netherlands: Hardwood Academic; 2000. str. 1-7.
10. URL: <https://www.sciencephoto.com/media/28372/view/mistletoe-viscum-album-> (pristupljeno: 25.08.2021.).
11. URL: <https://www.mediastorehouse.com/science-photo-library/mistletoe-viscum-album-berries-9246945.html> (pristupljeno: 25.08.2021.).
12. Tubeuf KF. *Monographie der Mistel*. München, Berlin, DE: Oldenburg; 1923. Dostupno na: <https://archive.org/details/monographiedermi1923tube/page/n3/mode/2up>.
13. Keršek E. Ljekovite biljne i voćne rakije: Rakijska biljaruša. Zagreb, Hrvatska: V.B.Z.; 2008.
14. Luminita BD, Ion N. Physiological particularities of the species *Viscum Album* L. spp. *album* and *Loranthus Europaeus* Jack, hemi-parasites on lignuous species from the comanesti forest, Romania. *Annals of the University of Craiova- Agriculture.Craiova, RO:University of Cralov*; 2020.

15. Lakatos F, Mirtchev S., Mehemeti, A. Hand Book of Major Forest Pests in Southeast Europe. Priština, Kosovo: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2014. Dostupno na: <http://www.fao.org/3/i4084e/i4084e.pdf>.
16. URL: <https://www.tumgir.com/tag/Loranthaceae> (pristupljeno: 25.08.2021.).
17. URL: <https://flora.nhm-wien.ac.at/Seiten-Arten/Loranthus-europaeus.htm> (pristupljeno 25.08.2021.).
18. Sharquie K, Noaimi A, Saleh B. *Loranthus europaeus* as an Alternative Medicine in Treatment of Acute Cutaneous Lesions: Review Article. Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications. 2016; 6, 24-33. doi: 10.4236/jcdsa.2016.61004.
19. Nazaruk J, Orlikowski P. Phytochemical Profile and Therapeutic Potential of *Viscum album* L. Natural Product Research. 2016 ;30: 373-385.
20. Kazazić S. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada toksikologiju. 2004; 55: 279 – 290.
21. Cordella CBY. Flavors and Taste. U: Bordiga M, Nollet LML, urednici. Food Aroma Evolution: During Food Processing, Cooking, and Aging. Boca Ration, USA: CRC Press; 2019. str. 15-22.
22. Christoph N, Bauer-Christoph C. Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation, and Ageing. U: Berger RG, urednik. Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer; 2007 str. 219-239.
23. Śliwińska M, Wiśniewska P, Dymerski T, Wardencki W, Namieśnik J. The flavour of fruit spirits and fruit liqueurs: a review. Flavour Fragrance Journal. 2015;30(3):197-207.
24. Lukić I. Karakterizacija sortnih rakija komovica na osnovi sastava hlapivih spojeva arome. Doktorski rad. Osijek, Hrvatska; Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2008.
25. Nykänen L, Suomalainen H, editors. Aroma Beer Wine Distilled Alcoholic Beverages. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer; 1983.
26. Jurić D. Primjena plinske kromatografije za određivanje sastava i udjela hlapivih komponenti različitih vrsta rakija s područja Hercegovine. Diplomski rad. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. 2018.
27. Sides A, Robards K, Helliwell S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. Trends in analytical chemistry.2000;19(5):322-329.
28. Jerković I. Kemija aroma. Recenzirana interna skripta. Kemijsko-tehnološki fakultet Split. Sveučilište u Splitu. 2011.

29. Reineccius G. Instrumental methods of analysis. U: Taylor AJ, Linforth RST, urednici. Food Flavour Technology. Nottingham, UK: Wiley-Blackwell; 2010. str. 229-265.
30. Jerković I, Radonić A. Praktikum iz Organske kemije. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2009.
31. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Available from: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=17468>. (pristupljeno 2. 9. 2021.).
32. Merkle S, Kleeberg KK, Fritsche J. Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis—A Review. Chromatography. 2015; 293-381.
33. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2014.
34. Valente ALP, Augusto F. Microextração por Fase Sólida. Química Nova. 2000;23(4):523–530.
35. Nongonierma A, Cayot P, Le Quéré JL, Springett M, Voilley A. Mechanisms of Extraction of Aroma Compounds from Foods, Using Adsorbents. Effect of Various Parameters. Food Reviews International. 2006;22:51–94.
36. URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/solid-phase-microextraction-spme-method-development-in-analysis-of-volatile-organic-compounds-vocs-as-potential-biomarkers-of-cancer-2155-9929-1000253.php?aid=64169> (pristupljeno: 21.07.2019.).
37. Silić A. Glukozinolatni profil u biljkama *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiola incana* (L.) BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima. Diplomski rad. Split, Hrvatska; Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2018.
38. Radić Nj. Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb, Hrvatska; Školska knjiga; 2016.
39. URL: <https://docplayer.cz/docs-images/26/7300261/images/37-0.png> (pristupljeno: 21.07.2019.).
40. Blažević I. Masena spektroskopija (MS). Nerecenzirani materijali za predavanje kolegija Organska kemija. Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet Split; 2017.
41. Sutherland K. Gas chromatography/mass spectrometry techniques for the characterisation of organic materials in works of art. Physical Sciences Reviews. 2018;4(6):3.

42. Šarolić M, Bosnić N, Friganović E, Delić Ž, Šuste M, Svalina T, i sur. Kemijska analiza hlapljivih spojeva tradicionalne rakije Aničete s otoka Korčule – Republika Hrvatska. *Glasilo Future*. 2019;2(5-6):48-57.
43. Hanousek Čiča K, Rupert M, Koczoń P, Derewiaka D, Gajdoš-Kljusurić J, Petravić-Tominac V i sur. Characterisation of flavour compounds in Biska – a herbal spirit produced with mistletoe. *J. Inst. Brew.* 2019;125:143–154.
44. Hayashi S, Miyamoto E, Kudo K, Kameoka H, Hanafusa M. Comparison of the volatile components of three mistletoes. *J. Essent. Oil Res.* 1996;8:619–626.
45. Nikićević N, Tešević V. Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta. Beograd, Srbija: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta u Beogradu; 2010.
46. URL: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-flav/en/> (pristupljeno: 15.09.2021.).
47. Lukić I, Miličević B, Banović M, Tomas S, Radeka S, Peršurić Đ. Aroma Compounds in Marc Distillates. *Food Technol. Biotechnol.* 2011;49 (2):214–227.
48. Oliveira JM, Faria M, Sá F, Barros F, Araújo IM. C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytica Chimica Acta.* 2006;563:300–309.