Aromatični profil vina sorte Kujundžuša

Ančić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:296558

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

AROMATIČNI PROFIL VINA SORTE KUJUNDŽUŠA

DIPLOMSKI RAD

ANA ANČIĆ

Matični broj: 60

Split, listopad 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

AROMATIČNI PROFIL VINA SORTE KUJUNDŽUŠA

DIPLOMSKI RAD

ANA ANČIĆ

Matični broj:60

Split, listopad 2017.

UNIVERSTY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISRTY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

AROMATIC PROFILE OF THE KUJUNDŽUŠA WINE

DIPLOMA THESIS

ANA ANČIĆ

Parent number: 60

Split, October 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada: je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: izv.prof.dr.sc. Ani Radonić
Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. Zvonimir Marijanović

AROMATIČNI PROFIL VINA SORTE KUJUNDŽUŠA

Ana Ančić, 60

Sažetak:

Kujundžuša je autohtona sorta bijelog vina koja se tradicionalno uzgaja na području Imotskog. Vino je intenzivno žute boje, snažno, trpko te najviše ima poklonika u matičnom uzgojnom području. Za izolaciju hlapljivih aromatičnih spojeva korištene su tri metode izolacije: ekstrakcija tekuće-tekuće s dva različita organska otapala, smjesom pentan:dietil-eter (2:1 v/v) i diklormetanom, mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) i dehidratacija sa sredstvom za dehidrataciju, bezvodnim magnezijevim sulfatom. Dobiveni hlapljivi uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija- spektrometrija masa, GC/MS. Svi uzorci vina Kujundžuša bili su kvalitativno i kvantitativno vrlo slični bez obzira na metodu izolacije. Vina Kujundžuše su sadržavala visoku koncentraciju spojeva sekundarne arome kao što su viši alkoholi 2-feniletanol i 2-(*p*-hidroksifenil)etanol, isparljivi esteri monoetil- i dietil- sukcinat te esteri masnih kiselina etil-oktanoat i etil-dekanoat. Spojevi primarne arome, C_{13}-norizoprenoidi, su identificirani u veoma malim količinama, ili čak tragovima, samo u uzorcima dobivenim HS-SPME metodom. Od metoda korištenih u ovome radu za određivanje aromatičnog profila vina, najprikladnije su ekstrakcija tekuće-tekuće s organskim otapalom smjesa pentan:dietil-eter i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi.

Ključne riječi: Kujundžuša, aromatični profil, ekstrakcija tekuće-tekuće, HS-SPME, dehidratacija

Rad sadrži: 56 stranica, 25 slika, 5 tablica, 18 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Vesna Sokol — predsjednik
2. Doc.dr. sc. Zvonimir Marijanović — član
3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić — član-mentor

Datum obrane: 16. listopada 2017.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry an Tehnology Split
Graduate Study of Chemistry

Scientific area:	Natural sciences
Scientific field:	Chemistry
Thesis subject:	was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.
Mentor:	Ani Radonić, PhD, associate professor
Tehnical assistance:	Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

AROMATIC PROFILE OF THE KUJUNDŽUŠA WINE

Ana Ančić, 60

Absract:

Kujundžuša is an indigenous white-wine variety that traditionally grown in the Imotski area. The wine is intense yellow, strong, tart, somewhat dull and appreciated mostly by local drinkers. For the isolation of volatile aroma compounds, three different isolation methods were used, the liquid-liquid extraction with two different organic solvents, solvent mixture pentane:diethyl ether, (2:1 v/v) and dichloromethane, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and dehydration with anhydrous magnesium sulphate. The obtained volatile samples were analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS. All samples of Kujundžuša wines were qulitatively and quantitatively very similar, regardless of the the isolation method. Kujundžuša wines contained high concentrations of secondary aroma compounds such as higher alcohols 2-phenylethanol and 2-(p-hydroxyphenyl)ethanol, volatile esters monoethyl and diethyl succinate, and fatty acid esters ethyl octanoate and ethyl decanoate. Primary aroma compounds, namely two C_{13}-norisoprenoids, were identified in very small amounts, even traces, only in samples obtained by HS-SPME method. Among methods used in these investigation for determination of wine aromatic profile, the more suitable are liquid-liquid extraction with solvent mixture pentane:diethyl ether and headspace solid-phase microextraction.

Keywords: Kujundžuša, aromatic profile, liquid-liquid extraction, HS-SPME, dehydration

Thesis contains: 56 pages, 25 figures, 5 tables, 18 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Vesna Sokol - PhD, associate prof.	chair person
2. Zvonimir Marijanović - PhD,assistant prof.	member
3. Ani Radonić - PhD, associate prof.	supervisor

Defence date: October 16th 2017.

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

Rad je rađen u Zavodu za organsku kemiju, pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Ani Radonić u vremenskom razdoblju od svibnja do rujna 2017. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-11-2013-8547.

Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na pomoći i stručnim savjetima prilikom izrade, pisanja i pregleda diplomskog rada.

Doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću zahvaljujem na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili najveća podrška.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti aromatični profil vina sorte Kujundžuša, odnosno izolirati i identificirati hlapljive spojeve.
- Izolirati hlapljive spojeve vina sorte Kujundžuša koristeći različite metode izolacije, ekstrakciju tekuće-tekuće, mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi i dehidrataciju sa sredstvom za dehidrataciju – bezvodnim magnezijevim sulfatom ($MgSO_4$).
- Vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) analizirati uzorke hlapljivih spojeva
- Usporediti dobivene rezultate, istaknuti prednosti i mane pojedine metode izolacije radi izbora pogodnije metode za izolaciju hlapljivih spojeva iz vina sorte Kujundžuša.

SAŽETAK

Kujundžuša je autohtona sorta bijelog vina koja se tradicionalno uzgaja na području Imotskog. Vino je intenzivno žute boje, snažno, trpko te najviše ima poklonika u matičnom uzgojnom području. Za izolaciju hlapljivih aromatičnih spojeva korištene su tri metode izolacije: ekstrakcija tekuće-tekuće s dva različita organska otapala, smjesom pentan:dietil-eter (2:1 v/v) i diklormetanom, mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) i dehidratacija sa sredstvom za dehidrataciju, bezvodnim magnezijevim sulfatom. Dobiveni hlapljivi uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija- spektrometrija masa, GC/MS. Svi uzorci vina Kujundžuša bili su kvalitativno i kvantitativno vrlo slični bez obzira na metodu izolacije. Vina Kujundžuše su sadržavala visoku koncentraciju spojeva sekundarne arome kao što su viši alkoholi 2-feniletanol i 2-(*p*-hidroksifenil)etanol, isparljivi esteri monoetil- i dietil-sukcinat te esteri masnih kiselina etil-oktanoat i etil-dekanoat. Spojevi primarne arome, C_{13}-norizoprenoidi, su identificirani u veoma malim količinama, ili čak tragovima, samo u uzorcima dobivenim HS-SPME metodom. Od metoda korištenih u ovome radu za određivanje aromatičnog profila vina, najprikladnije su ekstrakcija tekuće-tekuće s organskim otapalom smjesa pentan:dietil-eter i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi.

Ključne riječi: Kujundžuša, aromatični profil, ekstrakcija tekuće-tekuće, HS-SPME, dehidratacija, GC-MS

SUMMARY

Kujundžuša is an indigenous white-wine variety that traditionally grown in the Imotski area. The wine is intense yellow, strong, tart, somewhat dull and appreciated mostly by local drinkers. For the isolation of volatile aroma compounds, three different isolation methods were used, the liquid-liquid extraction with two different organic solvents, solvent mixture pentane:diethyl ether, (2:1 v/v) and dichloromethane, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and dehydration with anhydrous magnesium sulphate. The obtained volatile samples were analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS. All samples of Kujundžuša wines were qulitatively and quantitatively very similar, regardless of the the isolation method. Kujundžuša wines contained high concentrations of secondary aroma compounds such as higher alcohols 2-phenylethanol and 2-(p-hydroxyphenyl)ethanol, volatile esters monoethyl and diethyl succinate, and fatty acid esters ethyl octanoate and ethyl decanoate. Primary aroma compounds, namely two C_{13}-norisoprenoids, were identified in very small amounts, even traces, only in samples obtained by HS-SPME method. Among methods used in these investigation for determination of wine aromatic profile, the more suitable are liquid-liquid extraction with solvent mixture pentane:diethyl ether and headspace solid-phase microextraction.

Keywords: Kujundžuša, aromatic profile, liquid-liquid extraction, HS-SPME, dehydration, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD....1

1. OPĆI DIO....3

1.1. POVIJEST VINOVE LOZE.... 3

1.2. GROŽĐE.... 4

1.2.1. MEHANIČKI SASTAV GROZDA.... 6

1.3. VINO.... 7

1.3.1. KEMIJSKI SASTAV VINA.... 7

1.4. AROMA VINA.... 11

1.4.1. TERPENI.... 12

1.4.1.1. Struktura i podjela terpena.... 12

1.4.2. BIOSINTEZA TERPENA.... 18

1.4.3. OSTALI SPOJEVI PRIMARNE AROME.... 23

1.5. METODE IZOLACIJE AROMATIČNIH SPOJEVA.... 25

1.5.1. EKSTRAKCIJA OTAPALOM.... 25

1.5.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće.... 26

1.5.2. SORPCIJSKE TEHNIKE.... 27

1.5.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi.... 27

1.6. ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA.... 29

1.6.1. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA- SPEKTROMETRIJA MASA.... 29

1.5.1.1.... 30

1.7. VINOGRADARSTVO U HRVATSKOJ.... 31

1.7.1. REGIONALIZACIJA VINOGRADARSKE PROIZVODNJE HRVATSKE.... 33

1.7.1.1. Podregija Dalmatinska zagora.... 34

1.7.2. KUJUNDŽUŠA.... 35

2. EKSPERIMENTALNI DIO....38

2.1. KEMIKALIJE I APARATURA.... 39

2.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE.... 40

2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI.... 40

2.4. DEHIDRATACIJA S MAGNEZIJEVIM SULFATOM.... 41

2.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA.... 42

3. REZULTATI....44

3.1. GC/MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA 44
4. RASPRAVA 49
4.1. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE 49
4.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI 51
4.3. DEHIDRATACIJA S MAGNEZIJEVIM SULFATOM 52
5. ZAKLJUČAK 54
6. LITERATURA 55

UVOD

U Antičkoj Grčkoj vino su opjevali mnogi pjesnici, povjesničari i umjetnici. Često se vino spominjalo u djelima Eshila, Sofokla i Homera. U Grčkoj vino se smatralo privilegijom viših klasa. Grčki bog vina i vinogradarstva, Dioniz, kojega su štovali i kao zaštitnika voćaka i grmlja jer, prema vjerovanju i tim biljkama on daje svježinu i sočnost, među ljudima je bio obožavan jer nudi slatke plodove i "opojni napitak pun životne radosti". Taj napitak je vino što liječi tijelo i dušu, te potiče na društvenost i ljubavni zanos, a umjetnike opijene vinom potiče na stvaralački rad.[1]

Uzgoj vinove loze počeo je oko Kaspijskog mora i na području Mezopotamije, a vinova loza se širila u tri pravca: na istok prema Indiji, na jug prema Egiptu te na zapad prema Mediteranu i zapadnoj Europi. Širenje Rimskog Carstva izravno je povezano s razvojem današnjih najvažnijih vinskih regija Europe, kao što su Burgundija, Champagne i dolina Rajne. Povećanje proizvodnje vina poticalo je razvoj različitih sorti grožđa i tehnika uzgoja.

Mnogi čimbenici doprinose u uživanju vina, no aroma je među najvažnijim. Općenito, aroma je kombinirana impresija okusa i mirisa. Okus je rezultat interakcije kemijskih sastojaka hrane i pića s osjetima okusa i mirisa konzumenta. Aromu vina predstavlja složena smjesa velikog broja hlapljivih spojeva, kao što su monoterpeni, norizoprenoidi, produkti šikiminskog biosintetskog puta, sumporovi spojevi, esteri, organske kiseline i alkoholi, metoksipirazini, derivati furfurala, laktoni itd. Hlapljivi spojevi su prisutni u složenom i promjenjivom okruženju te na njihovu hlapljivost može utjecati interakcija s makromolekulama prisutnim u vinu.

Prirodni spojevi, uz rijetke iznimke, prisutni su u biološkom materijalu u vrlo malim količinama. Izolacija, odjeljivanje i pročišćavanje te identifikacija pojedinačnih spojeva zahtijeva vještinu i vrijeme. Postoje različite metode izolacije hlapljivih spojeva, a najčešće se koriste razne vrste ekstrakcija, kao što su ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija kruto-tekuće, mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, superkritična ekstrakcija fluidima te razne destilacijske metode.[2,3]

U Hrvatskoj posljednjih godina, uz brojne turističke manifestacije i događanja vinskog sadržaja, vinogradarstvo i vinarstvo doživljavaju ponovni procvat te postaju dio kulturno-tradicijskog življenja na ovim prostorima. Unatoč tome, novi trendovi u poljoprivredi doveli su do visoke ugroženosti velikog broja izvornih i udomaćenih sorti na području Hrvatske. Zbog svoje izrazite ekološke i genetičke šarolikosti te sorte su dio ukupne bioraznolikosti kakvu danas poznajemo.

Nastala pod utjecajem čovjeka u lokalnim ekološkim uvjetima je i sorta Kujundžuša kojom se bavimo u ovome radu.[4]

1. OPĆI DIO

1.1. POVIJEST VINOVE LOZE

Pripitomljavanje vinove loze je proces koji se odvijao pod utjecajem čovjeka. Smatra se da je europska plemenita vinova loza, *Vitis vinifera* L.,nastala pripitomljavanjem divlje loze, kao i kasnijom spontanom hibridizacijom autohtone divlje loze i kultiviranih loza koje su kolonizatori antičkih civilizacija donijeli u Europu s prostora Male Azije.

Pretpostavlja se da je pripitomljavanje vinove loze prošlo kroz nekoliko stadija. U prvoj fazi ljudi su bili sakupljači plodova koje su nalazili u prirodi te su tako počeli sakupljati i grožđe. U sljedećoj fazi, takozvanoj fazi embrionskog vinogradarstva, ljudi su počeli štititi biljke eliminirajući iz njihove blizine loše izdanke, odstranjujući s njih suhe ili nerodne ogranke.U trećoj fazi ljudi su počeli primjenjivati čitav vinogradarski proizvodni ciklus, od pripreme biljke za sadnju, sadnje, brige za lozu, do berbe i upotrebe roda.Treća faza, početak vinogradarske proizvodnje, započinje istovremeno s razvojem sjedilačkog načina života koji je potreban za uzgoj višegodišnjih kultura. To je period razvoja društva kada je čovjek izumio plug i drugo oruđe, pripitomio životinje i naučio ih koristiti u poljoprivredi te je bio u stanju obraditi veće površine i stvoriti viškove proizvoda. Počela su se osnivati i naselja uz koja je došlo do specijalizacije pojedinih djelatnosti.

Iz dosad prikupljenih i dostupnih arheoloških nalaza poznato je da je uzgoj vinove loze započeo na području Bliskog istoka. Ovu teoriju potkrepljuju mnogi arheološki dokazi, kao što je pronađena posuda s ostatcima vina iz nalazišta Hajji Firuz (područje današnjeg sjevernog Irana) koja datira 5400-5000 godina pr. Kr. U području Mezopotamije, kolijevke ljudske civilizacije, kao i u državama koje su se razvile na tom području, a kasnije i u Egiptu i antičkoj Grčkoj, vinogradarstvo i proizvodnja vina bili su dobro razvijeni. Najznačajniju ulogu u razvoju vinogradarstva i vinarstva imali su Rimljani. Unaprijedili su proizvodnju vina te su prvi uočili razlike u kvaliteti vina s obzirom na sorte i geografska područja.

S povećanjem potreba, ali i uvjetima uzgoja, čovjek je znatno utjecao na nastanak novih sorti. Križanjem i daljnjim razmnožavanjem onih genotipova koji su odgovorali

potrebama nastao je veliki broj sorti od kojih su mnoge vezane isključivo za područje gdje su nastale te ih se smatra autohtonim sortama.[4]

1.2. GROŽĐE

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

Grožđe je plod vinove loze, *Vitis vinifera* L.,koji se zbog svojih fizioloških, kemijskih, senzorskih i drugih svojstava koristi za potrošnju u svježem neprerađenom stanju, kao sirovina za dobivanje vina, alkoholnih i bezalkoholnih pića, za proizvodnju džemova, meda i drugih proizvoda.

Vinova loza (*Vitis vinifera L.)* je biljka iz porodice lozica (*Vitaceae)*, trajna penjačica kojoj stabljika može narasti i do 20 metara. Korijen je dobro razvijen, dubok, a listovi su dugi 7-15 cm, naličje im je zeleno i prekriveno vunastim dlačicama. Listovi su urezani na nekoliko režnjeva s grubo nazubljenim rubovima te su smješteni na dugačkim peteljkama. Cvjetovi su dvospolni, mali, pravilni, skupljeni u grozdove. Plodovi su okrugle bobice, a svaka bobica sadrži po dvije do tri sjemenke. Plodovi, ovisno o sorti, mogu biti slatko-kiselkastog okusa te žute ili tamnocrvene boje, a dozrijevaju u kolovozu i rujnu.

Biljka uspijeva od Dalekog istoka sve do srednje Europe. Uzgaja se u Aziji, Europi, Africi, Južnoj i Sjevernoj Americi, Novom Zelandu, Australiji, a može je se pronaći i u nekim južnim dijelovima Sibira.

Razlikuje se 12 najpoznatijih i osnovnih vrsta grožđa od kojih se pravi većina svjetskih vina. Vina su se ranije označavala prema području na kojem se grožđe uzgaja, no kasnije, s porastom broja proizvođača i područja s vinogradima, uvedeno je označavanje prema vrsti grožđa.

Razlikuje se šest vrsta crnog grožđa iz kojih se proizvodi crno vino:

- *cabernet sauvignon*

- *merlot*
- *nebbiolo*
- *crni pinot*
- *syrah ili shiraz*
- *sangiovese*.

Preostalih šest vrsta grožđa ubraja se u vrste koje se koriste za proizvodnju bijelog vina:

- *Chardonnay* je vjerojatno najtraženije grožđe na svijetu. Uspijeva na siromašnijem zemljištu no prilagođava se i drugim tipovima. Daje male grozdove tanke kože, rano cvjeta i zrije. Danas se uzgaja u svakoj zemlji u kojoj se pravi vino.
- *Crni chenin* se koristi za najraznovrsnija vina, daje obična i pjenušava, suha i slatka. Uzgaja se na jugozapadu Francuske sve do Atlantika. Ima tanku kožu, kasno sazrijeva, daje dugotrajna vina, ali i vina koja se odmah piju.
- *Traminac* je grožđe ružičaste boje, daje suha i slatka bijela vina, karakterističnog aromatičnog, začinjenog okusa. Uzgaja se u Francuskoj, Austriji, Njemačkoj, Hrvatskoj, Mađarskoj.
- *Rizling* voli hladniju klimu. Daje blijeda zrna s mrljama, u malim grozdovima. Kasno cvjeta i zrije. Daje vrhunska suha, poluslatka i slatka vina. Uzgaja se u Njemačkoj, Francuskoj, Italiji, Australiji i SAD-u.
- *Crni sauvignon* je grožđe doline rijeke Loire, raste na vapnencu, pijesku, šljunku. Daje kompaktne male grozdove tanke kože. Rano zrije, a uzgaja se u Italiji, Južnoj Africi, Novom Zelandu
- *Semillon* daje sjajna slatka vina i visoko kvalitetna suha vina. Ima velika zrna i tanku kožu i sorta je koja traži specifične klimatske uvjete. Uzgaja se u području Bordeauxa u Francuskoj, Čileu, Australiji, SAD, Južnoj Africi.[4-7]

1.2.1. MEHANIČKI SASTAV GROZDA

Sastav grozda predstavlja ampelografsko i tehnološko obilježje pojedinih kultivara. Kultivar je nositelj kakvoće grožđa i vina. Pokazatelji strukture i kemijskog sastava grožđa i vina imaju praktični značaj u tehnologiji vina.

Pod mehanički sastav grozda ubrajaju se količine pojedinih sastavnih dijelova grozda, npr. peteljka, pokožica, sjemenka, grožđani sok. Najčešće se izražavaju u postocima u odnosu na ukupnu masu grozda. Za svaku sortu vinove loze mehanički sastav grozda je karakterističan i predstavlja njeno ampelografsko i tehnološko obilježje. Kod pojedinih dijelova grožđa postotni odnos varira ovisno o sorti, godini, zdravstvenom stanju, vremenu berbe i ekološkim uvjetima.

Mehaničkom analizom dobiva se niz pokazatelja koji čine osnovna obilježja sorte, a zajedno daju sliku značajnu za ocjenu tehnološke vrijednosti sorte.[5]

1.3. VINO

Vino je poljoprivredno prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa (Narodne novine, Zakon o vinu, 96/03).[5]

1.3.1. KEMIJSKI SASTAV VINA

Vino je vrlo kompleksan proizvod koji je poznat i kao jedno od najstarijih prirodnih pića. Kvantitativno najzastupljeniji sastojci vina su voda i alkohol etanol, ali vino sadrži i na stotine spojeva različitih kemijskih struktura i svojstava. Važnost u definiranju kakvoće vina pripada svakoj grupi spojeva, u većoj ili manjoj mjeri. Uz grožđe, kao izvor najvažnijih čimbenika kemijskog sastava i senzornih svojstava, važnu ulogu ima i tehnologija proizvodnje, uvjeti dozrijevanja vina tijekom kojeg neki spojevi nestaju, a neki novi nastaju.[8]

VODA

Voda je glavni sastojak vina čiji se udio mijenja u ovisnosti o udjelu alkohola, odnosno kod vina s prosječno 12% alkohola na vodu otpada oko 85%. Veliku sposobnost otapanja različitih spojeva u vinu upravo omogućuje veliki udio vode. U vodi se otapaju alkoholi, kiseline, soli te male količine „teških" sastojaka kao što su ulja, voskovi i druge slične komponente. Iako grožđe sadrži velike količine navedenih „teških" sastojaka, zbog njihove ograničene topljivosti i tehnologije koja ne dopušta pucanje sjemenki u kojima se nalaze, u vinu se nalaze u jako malim količinama.[8]

ALKOHOL

Etanol je drugi vodeći sastojak te njegov postotni udio može biti većeg raspona, no u suhim vinima nalazi se od 12,0 do 14,0 vol. %. Izvor etanola u vinu je metabolizam kvasaca u alkoholnoj fermentaciji tijekom koje nastaje i ugljikov dioksid, koji hlapi, a samo mali dio se otapa u vinu. Fizikalna svojstva vina mijenjaju se sa sadržajem alkohola. Tako se s povećanjem alkohola smanjuje viskoznost vina, ali se povećava sposobnost otapanja različitih spojeva u vinu. Zbog ovih svojstava vino je kroz povijest

bilo najbolji i najdostupniji prirodni medij za pripravljanje biljnih ekstrakata za medicinske pripravke.[8]

ORGANSKE KISELINE

Organske kiseline predstavljaju najvažniju grupu spojeva za okus vina. Vino je kisela alkoholna otopina, pH vrijednosti između 3 i 4. Ukupna titiracijska kiselost je temeljni način mjerenja kiselosti vina koja se izražava se u g/L vinske kiseline kao najjače kiseline, a najčešće je između 5 i 6 g/L. Najvažnije kiseline grožđa su vinska, jabučna i limunska kiselina, dok mliječna i jantarna kiselina nastaju kao proizvodi fermentacije. Tijekom dozrijevanja vina događaju se promjene u sastavu kiselina zbog reakcija s etanolom, npr. esterifikacije, što rezultira nastajanjem etilnih estera. Različite kiseline daju različit okusni dojam, limunska kiselina ima vrlo svježi okus i daje citrusni dojam, jabučna kiselina ima grubi, oštri okus, a nježnim mirisom podsjeća na aromu jabuke. Budući da je kiselinski sastav izuzetno važan za senzorsku kakvoću i stabilnost vina dopušteno je dodavanje kiselina u vino, najčešće vinske. [8]

ŠEĆERI

Najzastupljeniji sastojci grožđa, uz vodu, su šećeri. Kako je šećer idealan spoj za balansiranje okusa u vinu, često se ciljanim prekidanjem vrenja proizvode vina sa zaostalim šećerom od desetak g/L kojima većina potrošača ne može odoljeti. Šećeri smanjuju okus kiselosti, gorčine i osjet trpkosti. U hladnijim klimatskim područjima, kao što je sjeverozapadna Hrvatska, šećerom se smanjuje kiselost i tako indirektno utječe na aromu vina. U slatkim vinima sadržaj šećera je veći, preko 100 g/L, te je u takvim vinima slatko dominantni okus. [8]

ESTERI

Esteri su grupa spojeva posebno važna za aromu vina. Dvije su grupe estera u vinu, "voćni" esteri koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije i imaju izrazito svježe, voćne arome te grupa estera koji nastaju tijekom dozrijevanja vina.

Esteri su vrlo hlapljivi spojevi te tijekom prve godine dozrijevanja vina, osobito u neodgovarajućim uvjetima, njihove koncentracije opadaju. Smanjenje voćnih aroma u mladim vinima može biti posljedica hidrolitičkog cijepanja estera, stoga je jedan od preduvjeta za očuvanje finih, svježih, voćnih mirisa čuvanje vina na nižim

temperaturama. Među esterima najzastupljeniji je etil-acetat koji u umjerenim količinama, 50 do 60 mg/L, pridonosi voćnosti vina. [8]

MERKAPTANI

Merkaptani su spojevi vrlo jakih agresivnih mirisa. Najzastupljeniji je sumporovodik, mirisa na trula jaja, koji nastaje tijekom alkoholne fermentacije, metabolizmom kvasaca. U mladim vinima sumporovodik se uklanja aeracijom vina, no ako se to ne napravi nastaju složeniji sumporovi spojevi (npr. etiltiol, metiltiol). Većina tiola vrlo je postojana te se ne može jednostavno eliminirati iz vina, a što je najvažnije za kakvoću vina, vrlo su nepoželjnih mirisa.

Provedena istraživanja su otkrila specifične sumporove spojeve nositelje sortnih aroma, unatoč činjenici da većina tiola negativno utječe na aromu vina. 3-Merkaptoheksan-1-ol, spoj jake voćne arome, pronađen je u Sauvignonu, a njegov miris opisuje se kao mirisa grejpa. Furan-2-metantiol (furfuril merkaptan) je također tiol, a njegov miris se opisuje kao miris pržene kave, ali samo kada je razrijeđen. Srodni spojevi, kao dimetilsulfid, također se mogu opisivati kao spojevi voćnog mirisa, mirisa maline ili tartufa. [8]

KATEHINI

Katehini su polifenolni spojevi, točnije flavonoidi, smješteni najvećim dijelom u sjemenkama, bobicama i peteljci. Ubrajaju se u flavanole, a imaju gorki ili lagano trpki okus te mogu utjecati na gorčinu vina. Nastaju tijekom alkoholnog vrenja, posebno pri produljenom vrenju, uz veći sadržaj alkohola. Osim utjecaja na senzorna svojstva, važni su i kao antioksidansi, odnosno čimbenik su čuvanja vina od oksidacije tijekom dozrijevanja. [8]

TANINI

Tanini su grupa spojeva srodnih katehinima, no složeniji su od njih i nastaju vezanjem većeg broja molekula katehina u polilance. U usnoj šupljini reagiraju s bjelančevinama sline i talože se što uzrokuje izrazitu astrigenciju, ali i kompleksnost vina.

Tanini su najzastupljenija grupa polifenola, na njih otpada oko 50% ukupnih polifenolnih spojeva. U bijelim vinima dolaze u vrlo malim količinama.

Dijele se na kondenzirane i hidrolizirajuće tanine. Kondenzirani tanini se sintetiziraju u kožici i sjemenkama bobica, a hidrolizirajući tanini potječu uglavnom iz drveta. U hidrolizirajuće tanine ubrajaju se esteri galne kiselina ili elaginske kiseline i glukoze. Reagiraju s antocijanima, tijekom dozrijevanje vina, stvarajući puno stabilnije pigmente koji su vjerojatno i odgovorni za stabilnost boje crvenih vina.[8]

1.4. AROMA VINA

Aroma vina je rezultat interakcija između tvari vina s osjetima okusa i mirisa kod konzumenata vina. Aroma vina nije dovoljno istražena. Do danas je identificirano oko 2000 spojeva arome vina, a njihov sadržaj u vinu je tek oko 1‰, odnosno oko 0,8 - 1,2 g/l. Međutim bez obzira na tako malen sadržaj, njihov utjecaj na senzornu ocjenu vina je ogroman. Dokazano je da i kada su neke od aromatičnih tvari sadržane u količini manjoj od ljudske senzorne osjetljivosti, da one i tada zajednički (sinergijski) utječu na aromu vina.

Aroma vina sastoji se od hlapljivih spojeva (terpeni, viši alkoholi, esteri, karbonilni spojevi, hlapljive kiseline, spojevi sa sumporom, hlapljivi fenoli i dr.) i nehlapljivih spojeva (ugljikohidrati, organske kiseline, fenolni spojevi, mineralne tvari i dr.). Aroma vina se, prema fazama nastajanja, dijeli na:

- Primarna ili sortna aroma obuhvaća sve aromatične spojeve koji potječu iz grožđa. Najvažniji predstavnici ove skupine aromatičnih spojeva su terpeni, C_{13}-norizoprenoidi, derivati benzojeve kiseline, hlapljivi tiolski spojevi i pirazini.
- Sekundarna aroma razvija se u razdoblju od berbe do početka vrenja mošta, odnosno masulja, kada se počinju odvijati složene kemijske i biokemijske reakcije te nastaju sekundarni aromatični sastojci. Ova aroma se naziva i predfermentativnom aromom.
- Aroma fermentacije (tercijarna aroma vina ili bouquet vrenja) nastaje tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije kao proizvod metabolizma kvasaca i bakterija. U tom razdoblju nastaju važni aromatični sastojci kao što suviši alkoholi, hlapljive kiseline, etilni esteri masnih kiselina, hlapljivi fenoli.
- Aroma dozrijevanja (postfermentativna aroma ili bouquetstarenja) oblikuje se tijekom dozrijevanja i skladištenja vina. Ako vina zriju u drvenim bačvama, u njima se povećava sadržaj vanilina i kisika. Ako se zrenje odvija u boci u vinu se smanjuju acetati i događaju brojne druge, još nedovoljno objašnjene promjene. Tijekom zrenja vina gube voćne mirise, svježinu i sortne karakteristike, a dobivaju (uslijed razgradnje ugljikohidrata, karotenoida i drugih sastojaka te oksidacije terpena, kiselina) zaseban bouquet starosti, koji je cijenjen kod crnih vina.[3,9]

1.4.1. TERPENI

Glavni aromatični spojevi koji su odgovorni za primarnu aromu vina su terpeni. Terpeni se u grožđu, moštu i vinu nalaze slobodni ili glikozidno vezani. Glikozidno vezani terpeni su prekursori arome grožđa i vina.

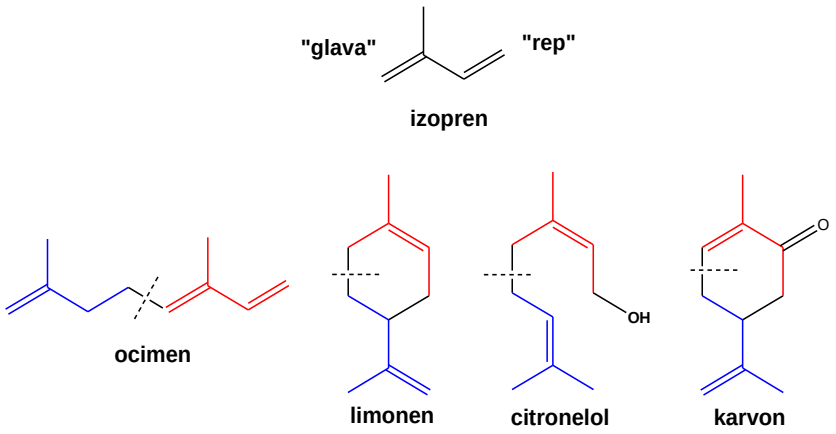
Terpeni (terpenoidi, izoprenoidi) su velika i vrlo raznolika grupa prirodnih organskih spojeva koji se najčešće nalaze u višim biljkama, ali i u drugim organizmima kao što su gljive i vodeni organizmi. Između ostalog to su spojevi koji biljkama daju miris.

Razvojem metoda za izolaciju mirisnih spojeva, odnosno eteričnih ulja, dolazi do razvoja kemije eteričnih ulja i do većeg istraživanja terpena. U 19. st. postepeno se određuju strukture terpenskih komponenti eteričnih ulja. Wallach je 1881. god. utvrdio izopren, 2-metilbuta-1,3-dien, kao strukturnu jedinicu zajedničku svim terpenima, a koji se kraće označava C_5 jedinicom. Također je predložio tzv. izoprensko pravilo za jednostavnije razumijevanje građe terpena. Za vrijeme rada s Kekulé-om, Wallach je sustavno analizirao eterična ulja iz kojih do tada nisu bile izolirane čiste tvari te je destilacijom eteričnih ulja uspio izolirati mirisne tvari, koje je nazvao terpenima.

Naziv terpena potječe od terpentina (sinonim terpentinsko ulje) koji se dobiva destilacijom smole bora. Moderna definicija terpena je da su to ugljikovodici biljnog porijekla kemijske formule $(C_5H_8)_n$ te njihovi oksidirani, hidrogenirani i dehidrogenirani derivati. Biološka funkcija terpena ni do danas nije u potpunosti istražena. Hlapljivi terpeni privlače insekte te omogućavaju oprašivanje biljaka ili tjeraju predatore, dok slabije hlapljivi, gorki ili otrovni terpeni štite biljke.[10-13]

1.4.1.1. Struktura i podjela terpena

Njemački znanstvenik Otto Wallach je 1887. god. predložio izoprensko pravilo prema kojem su pravilni terpeni izgrađeni od izoprenskih jedinica povezanih "glava na rep" (eng. *head to tail*), odnosno razgaranati završetak jedne C_5-jedinice (glava) je povezan na nerazgranati završetak druge C_5-jedinice (rep). Shematski primjer predložene građe je prikazan na slici 1.



Slika 1. Primjer pravilnih terpena i povezivanje C_5-jedinica "glava na rep"

Postoje i nepravilni terpeni koji su građeni od izoprenskih jedinica povezanih na drugi način, npr."glava na glavu" ili "rep na rep". Terpeni se nazivaju i izoprenoidi kako bi se naglasila međusobna izoprenska povezanost.

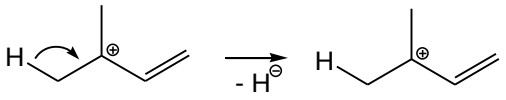
Klasifikacija terpena se provodi prema broju izoprenskih jedinica koje čine osnovu njihove strukture (tablica 1). Terpenski skelet se pojavljuje u obliku otvorenog lanca, ali i u različitim cikličkim formama tako da je moguća daljnja podjela terpena na acikličke i cikličke. Također mogu sadržavati različite funkcijske skupine, npr. hidroksilnu skupinu, pa se takvi terpeni nazivaju terpenskim alkoholima. Terpenski oksidi su spojevi koji imaju prsten s kisikovim atomom i osnovnu izoprensku strukturu te kao takvi sadrže cikličku etersku vezu (C-O-C). Stoga, prema funkcijskim skupinama terpeni mogu biti terpenski ugljikovodici, alkoholi, fenoli, kiseline, esteri, oksidi, aldehidi, ketoni i drugi.[11-13]

Tablica 1. Podjela terpena prema broju izoprenskih jedinica.

KLASA TERPENA	BROJ C-ATOMA	BROJ IZOPRENSKIH JEDINICA
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni	40	8
Politerpeni	5n	n

Semiterpeni

Poznato je samo nekoliko prirodnih spojeva iz skupine semiterpena (eng. *semiterpenes*). Osim izoprena, poznati su izopentenol te 3,3-dimetilalil-alkohol, izuzetno isparljivi spojevi koji se javljaju u eteričnim uljima slobodni i u obliku estera. Na slici 2 je prikazan nastanak izoprena gubitkom protona iz alilnog kationa.[12]

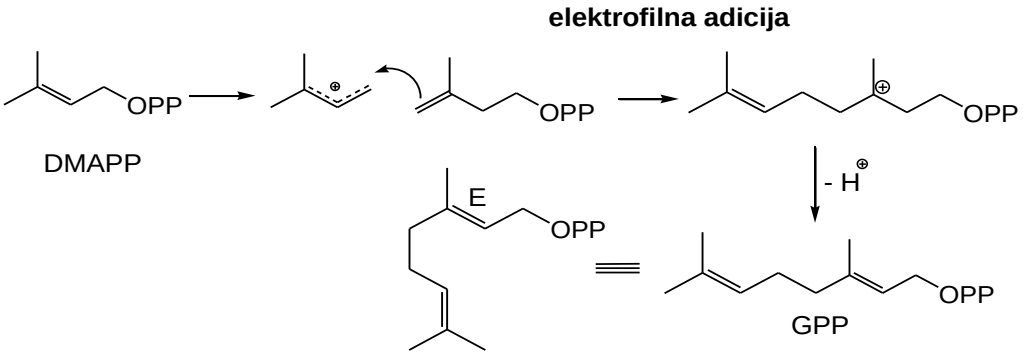


Slika 2. Nastanak izoprena

Monoterpeni

Monoterpeni (eng. *monoterpenes*) su hlapljivi spojevi koji je sastoje od 10 C-atoma te dviju izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep". Glavni su sastojci eteričnih ulja, primjenjuju se u medicinske svrhe, ali najveću važnost imaju kao korigensi okusa i mirisa u lijekovima i ljekovitim pripravcima.

Prekursor monoterpena je geranil-pirofosfat (GPP), koji nastaje dimerizacijom izopentenil-pirofosfata i dimetilalil-pirofosfata (slika 3).

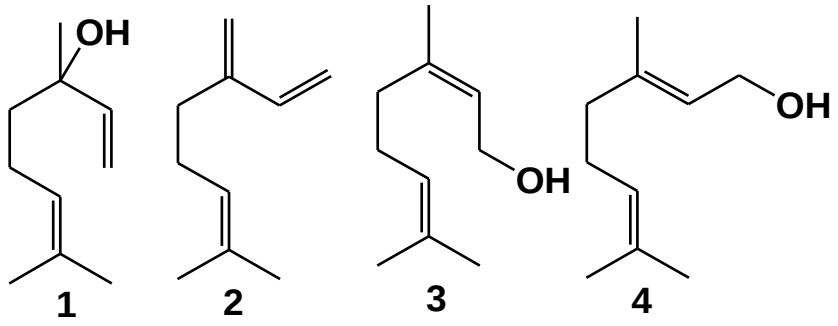


Slika 3. Biosinteza geranil-pirofosfata

Monoterpeni se mogu podijeliti, ne uzimajući u obzir podjelu prema funkcijskim skupinama, na pravilne i nepravilne monoterpene. Nepravilni monoterpeni sadrže izoprenske jedinice povezane "glava na glavu" ili "glava na sredinu".

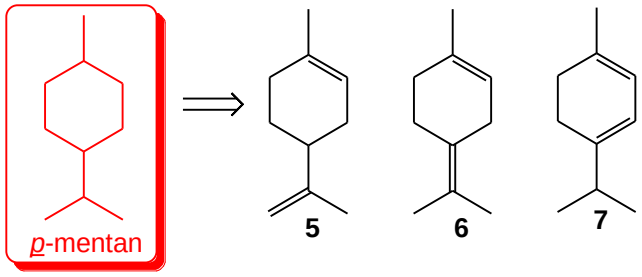
Prema građi pravilni monoterpeni mogu biti:

- Aciklički, npr. linalool, *β*-mircen, citronelol, geraniol (slika 4)
- Monociklički, biciklički i triciklički koji se izvode iz *p*-mentana, bornana, pinana, tujana i karana.



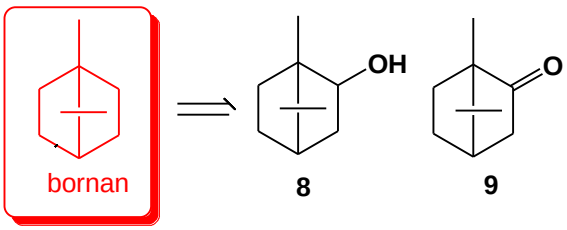
Slika 4. Aciklički monoterpeni: linalol (1), β-mircen (2), citronelol (3), geraniol (4)

Uobičajeni *p*-mentanski monoterpeni, prikazani na slici 5, su: limonen (5), α-terpinolen (6), α-terpinen (7) te timol i karvakrol.



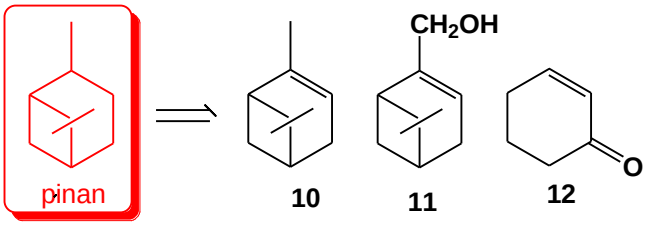
Slika 5. p-Mentanski monoterpeni

Najvažniji biciklički monoterpeni sa skeletom bornana, prikazani na slici 6, su borneol (8) i kamfor (9).



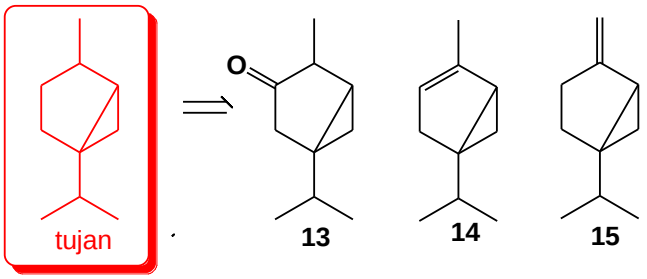
Slika 6. Monoterpeni sa skeletom bornana

Monoterpeni koji su najčešće prisutni u prirodi su *α*-pinen i *β*-pinen. To su biciklički spojevi pinanskog skeleta. Njihove oksidirane derivate mirtenol i verbenon, također nalazimo u prirodi (slika 7).



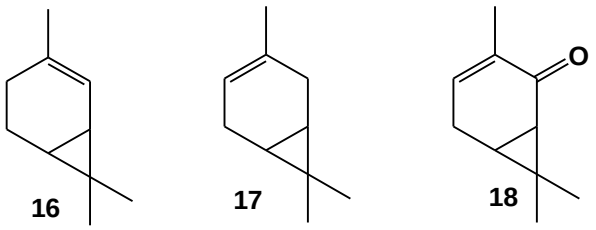
Slika 7. Biciklički monoterpeni sa skeletom pinana: α-pinen(10), mirtenol (11) i verbenon (12)

Najčešći biciklički monoterpen tujanske grupe je keton tujon te ugljikovodik *α*-tujen (slika 8). U ovu grupu monoterpena ubrajaju se i sabinen (slika 8), sabinol i sabinen-hidrat.



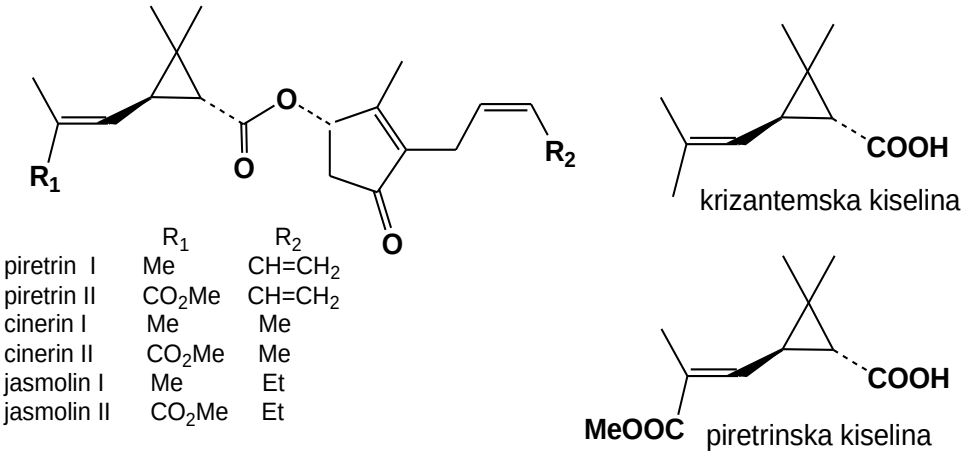
Slika 8. Biciklički monoterpeni sa skeletom tujana: tujon (13), α-tujen (14) i sabinen (15)

U grupu bicikličkih monoterpena s karanskim skeletom ubrajaju se: kar-2-en (slika 9, 16), kar-3-en (slika 9, 17), kar-3-en-2-on (slika 9, 18).



Slika 9. Biciklički monoterpeni sa skeletom karana

Nepravilni monoterpeni mogu nastati preuređivanjem pravilnih monoterpena, npr. kamfen. Poznati predstavnici nepravilnih monoterpena su krizantemska kiselina i piretrinska kiselina (slika 10). Ove kiseline se u prirodi nalaze u vezanom obliku, kao esteri piretrini, cinerini i jasmolini.[11-13]



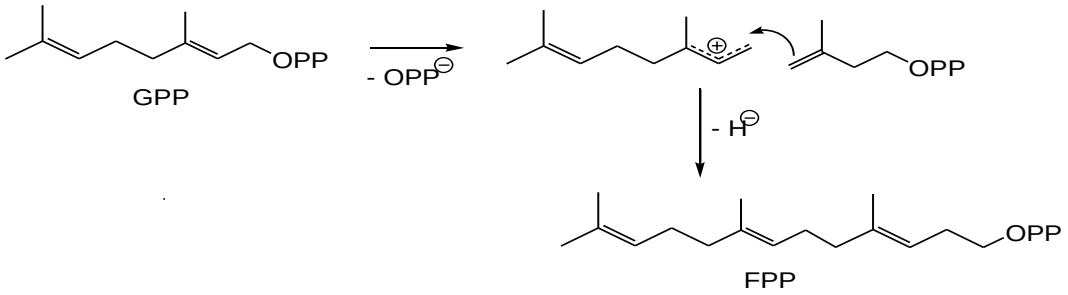
Slika 10. Prikaz krizantemske i piretrinske kiseline

Monoterpeni su najvažniji spojevi primarne arome vina. S obzirom na funkcijske skupine, najznačajniji su monoterpenski alkoholi i to linalool, geraniol, α-terpineol, nerol, citronelol i farnezol. Ovi alkoholi se u vinima nalaze u slobodnom obliku ili glikozidno vezani. Treba spomenuti i odgovarajuće monoterpenske aldehide (npr. geranial, neral), kiseline (npr. geranijska kiselina) i estere (npr. linalil-acetat).[10]

Seskviterpeni

Seskviterpeni (eng. *sesquiterpenes*) su uobičajeni i vrlo rasprostranjeni, ali količinski manje značajni sastojci eteričnih ulja. Seskviterpeni su spojevi koji sadrže 15 ugljikovih atoma, no manje su isparljivi od monoterpena. Strukturne varijacije seskviterpena su veće od monoterpena.

Farnezil-pirofostat, FPP, je osnovni prekursor seskviterpena, a nastaje dimerizacijom izopentenil-pirofosfata i geranil-pirofosfata, GPP, te može dati acikličke i cikličke seskviterpene (slika 11).



Slika 11. Nastanak farnezil-pirofosfata

Zbog produljenja ugljikovodičnog lanca i dodatnih dvostrukih veza u molekuli FPP, odnosno zbog postojanja četiri geometrijska izomera FPP kao i alilnog izomera, nerolidil-pirofosfata, povećan je broj mogućih načina ciklizacije što rezultira čitavim nizom mono-, bi- i tricikličkih struktura.

Prisutnost strukturnih izomera kao i stereoizomera čini mono- i seskviterpenske spojeve brojnom i strukturno vrlo raznolikom grupom organskih spojeva.[11-13]

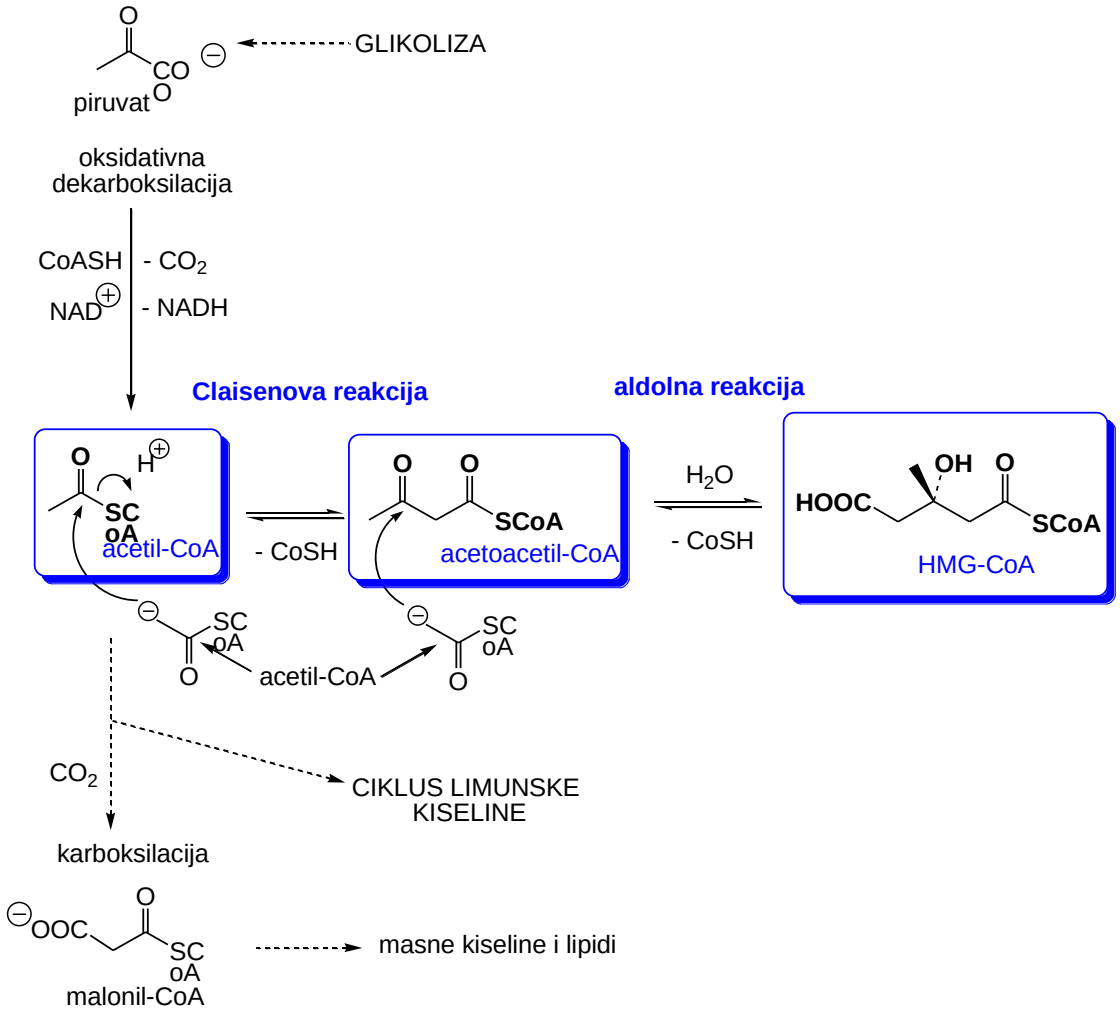
1.4.2. BIOSINTEZA TERPENA

Biljke ne sintetiziraju *in vivo* terpene iz izoprena, već iz njegovog biosintetskog ishodnog spoja izopentenil-pirofosfata u biosintetskom putu preko mevalonske kiseline ili deoksiksiluloza-5-fosfata.

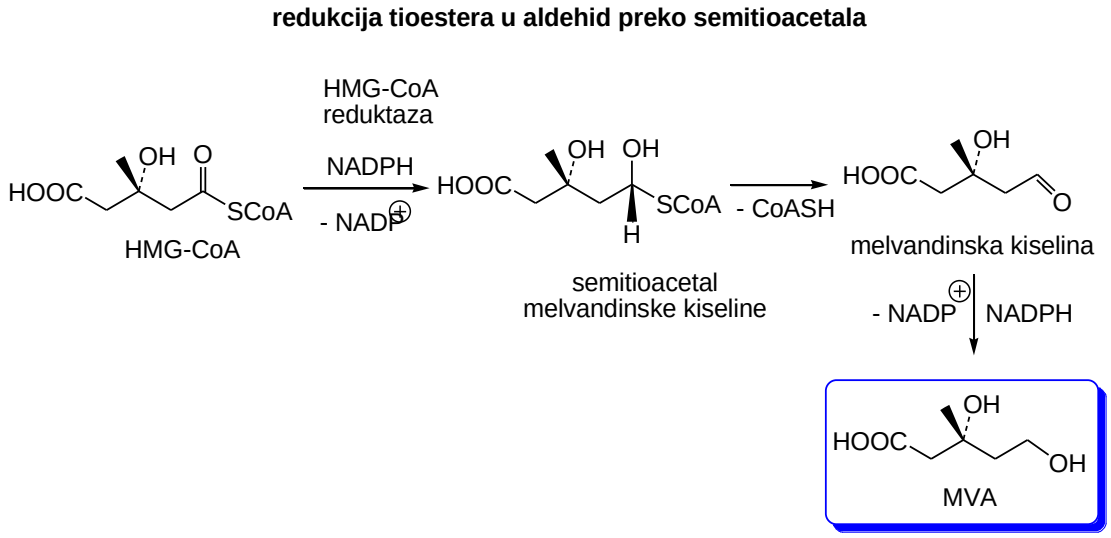
U sintezi izopentenil-pirofosfata polazna tvar je acetoacetil-koenzim A (acetoacetil-CoA), koji može nastati razgradnjom dugolančanih masnih kiselina ili prenošenjem acetilne skupine acetil-CoA enzimom tiolazom na drugu molekulu.

Mevalonski biosintetski put se odvija u više koraka (slike 12 - 14):

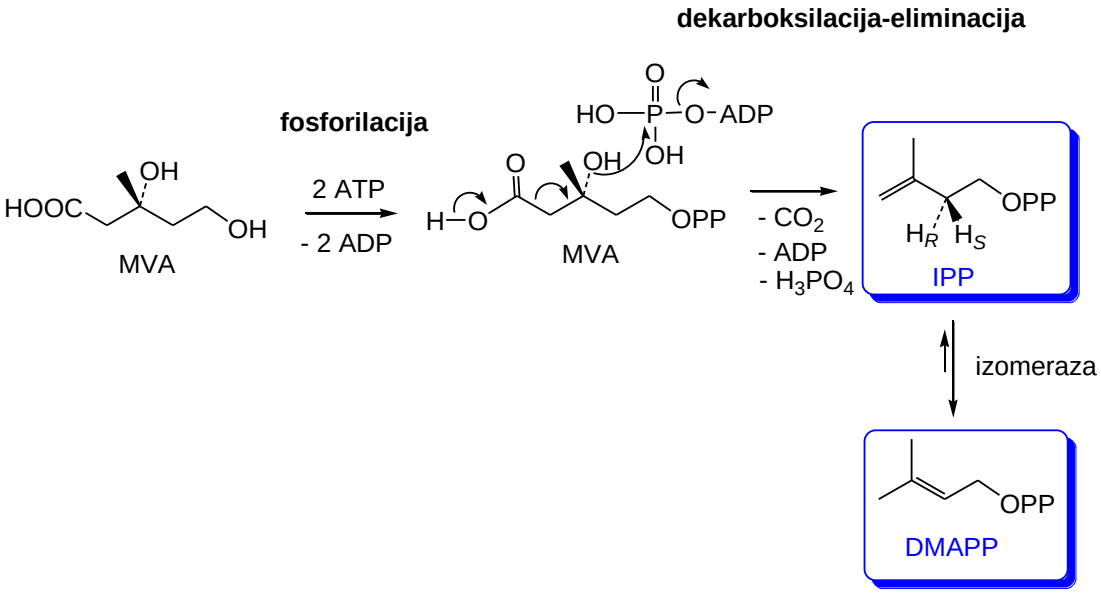
- glukoza se glikolizom pretvara u piruvat
- piruvat se zatim pretvara u acetil-koenzim A, dvije molekule acetil-koenzima A međusobno reagiraju dajući produkt acetoacetil-koenzim A
- acetoacetil-koenzim A reagira s još jednom molekulom acetil-koenzima A dajući β-hidroksi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), ključni intermedijer u sintezi (3R)-mevalonske kiselina ((3R)-MVA)
- MVA se fosforilizira uz ATP dajući mevalonsku kiselinu-5-difosfat
- MVA-5-difosfat sudjeluje u nizu reakcija dekarboksilacije i eliminacije pirofosfata kako bi kao produkt nastala aktivna C_5 ili izoprenska jedinica, izopentenil-difosfat (IPP)
- IPP se izomerizira katalitičkim reakcijama uz sulfhidril enzim IPP-izomerazu u dimetilalil-difosfat (DMADP)[11-13]



Slika 12. Biosinteza β-hidroksi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)



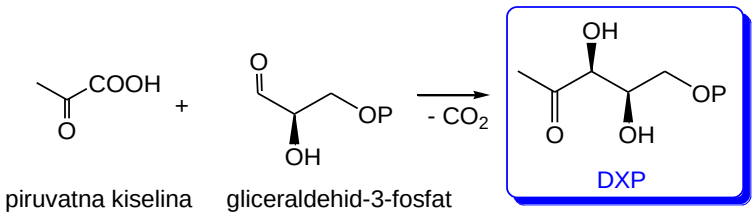
Slika 13. Biosinteza mevalonske kiseline (MVA)



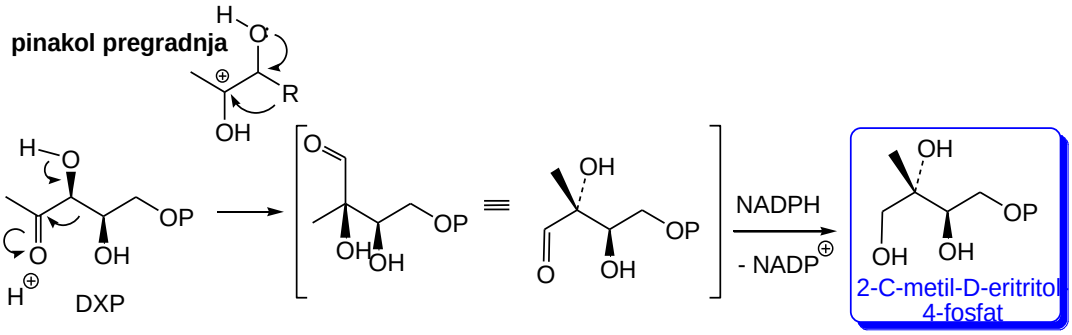
Slika 14. Biosinteza 3-izopentenil-pirofosfata (3-IPP) i dimetilalil-pirofosfata (DMAPP)

U novije vrijeme je otkriveno kako se biosinteza određenih bakterijskih i biljnih terpena ne može objasniti putem mevalonske kiseline te je predložen drugi biosintetski put terpena. I ovaj biosintetski put se odvija u nekoliko koraka (slike 15 – 18):

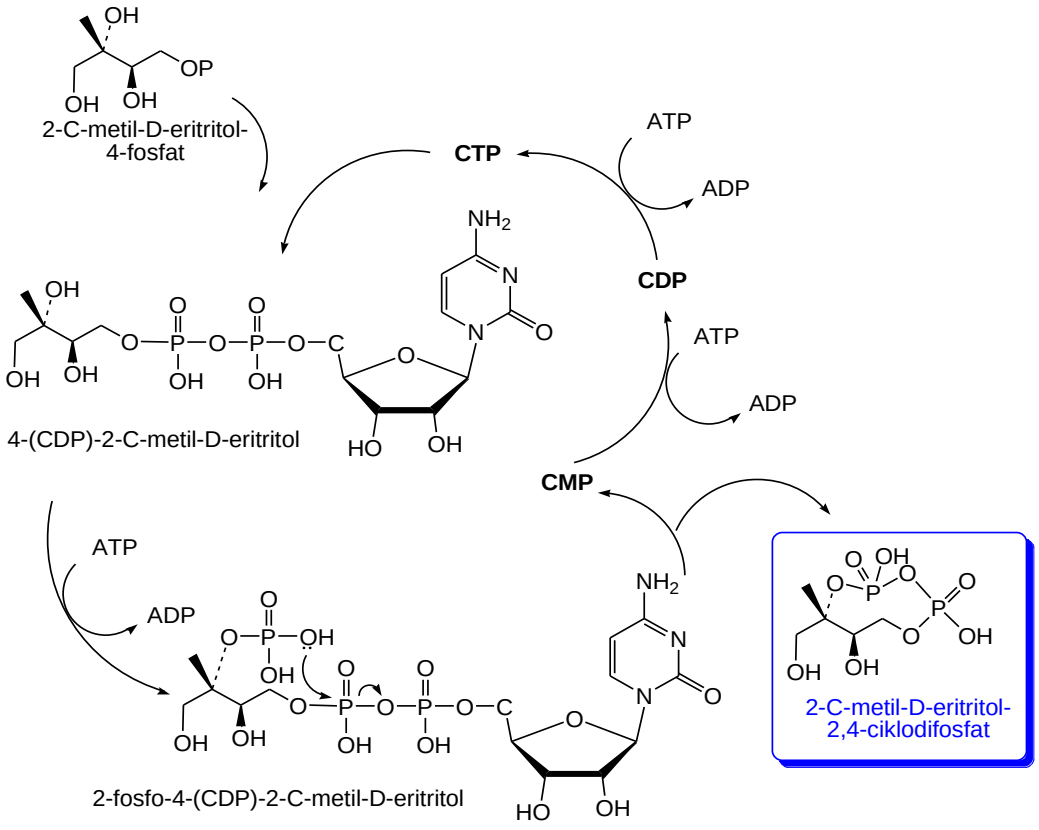
- iz piruvatne kiseline i gliceraldehid-3-fosfata nastaje 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat (DXP) uz gubitak piruvatnog karboksila u obliku CO_2
- DXP se zatim transformira u 2-C-metil-eritritol-4-fosfat pregradnjom koja se može klasificirati kao pinakol pregradnja u kombinaciji s redukcijom
- slijedi reakcija 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfata s citidin-3-fosfatom (CTP) u kojoj nastaje citidin-difosfo derivat koji se fosforilira preko ATP-a
- rezultirajući 2-fosfat se pretvara u ciklički fosfoanhidrid, 2-C-metil-D-erititol-2,4-difosfat, gubitkom citidin-difosfata (CDP)
- DMAPP može zatim nastati izomerizacijom 3-IPP-a ili nastati neovisno što još nije utvrđeno. Moguća je intramolekulska eliminacija iz 2-C-metil-D-eritritol-2,4-diciklofosfata praćena enol-keto tautomerizmom.[11-13]



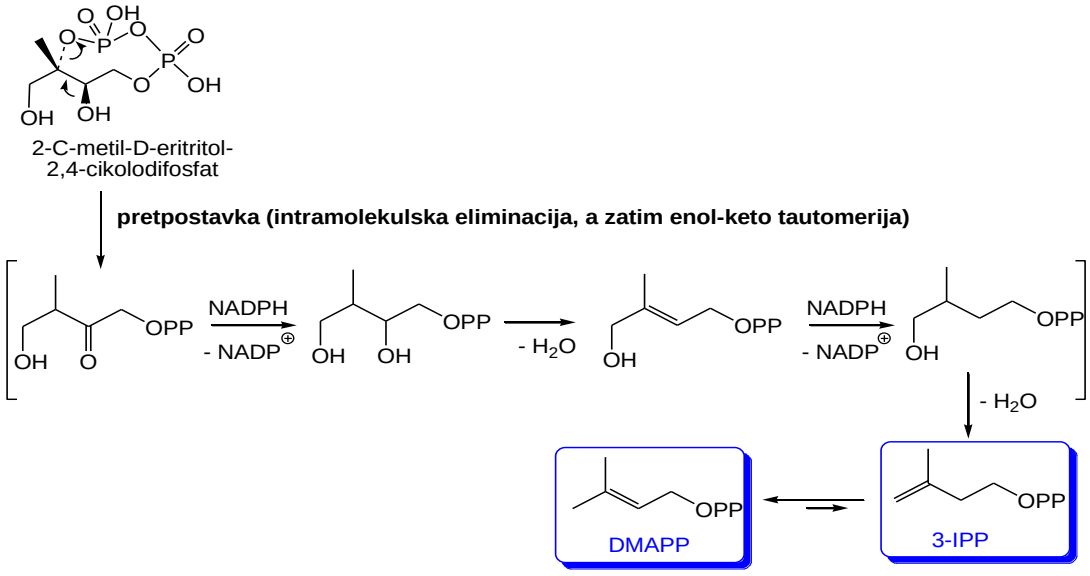
Slika 15. Nastanak DXP-a iz piruvatne kiseline i gliceraldehid-3-fosfata



Slika 16. Natanak 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfata



Slika 17. Nastanak 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciklodifosfata



Slika 18. Pretpostavka nastanka 3-IPP-a i DMAPP-a iz 2-C-metil-D-eritritol-2,4-diciklofosfata

1.4.3. OSTALI SPOJEVI PRIMARNE AROME

Ostali aromatični spojevi koji čine primarnu aromu vina (spojevi primarne arome) su C_{13}-norizoprenoidi, derivati benzojeve kiseline, hlapljivi tioli i pirazini.

C_{13}-Norizoprenoidi nastaju oksidacijskom razgradnjom karotenoida. Karotenoidi su također terpenski spojevi, točnije tetraterpeni (C_{40} spojevi). Najznačajniji spojevi arome vina iz ove skupine su damascenoni i jononi. Tako je β-damascenon u većim koncentracijama identificiran u crnim vinima nego u bijelim suhim vinima, a visoke koncentracije karakteristične su za muškatne sorte. β-Jonon je identificiran u različitim sortama, ali ipak veću ulogu ima u aromi crnog vina.

Od spojeva koji su derivati benzojeve kiseline u grožđu i vinu su identificirani 2-feniletanol i benzaldehid. 2-Feniletanol je odgovoran za aromu ruža u grožđu i može utjecati na aromatični karakter vina.

Pirazini su heterociklički spojevi, poznati odoranti, koji aktivno pridonose formiranju primarne arome vina. Iako je njihovo porijeklo u grožđu i vinu nepoznato, smatra se da su mogući prekursori pirazina aminokiseline leucin, izoleucin, valin i glioksalin.

Metoksipirazini su derivati pirazina, također heterociklički aromatski spojevi, koji nastaju u bobici grožđa kao produkti metabolizma aminokiselina.

Iako je većina spojeva sumpora neugodnog mirisa, za neke od njih je ustanovljeno da pridonose aromi mnogih aromatičnih biljaka i voća (borovnice, grejp, guava i ostalo egzotično voće). Dva takva spoja, etil-3-tiopropionat i etil-2-tiopropionat, uobičajeni su sastojci mnogih sorti grožđa.[10]

1.5. METODE IZOLACIJE AROMATIČNIH SPOJEVA

Prije izolacije aromatičnih spojeva potrebno je dobro poznavati matriks (voće, povrće, fermentirani proizvod), aromatične spojeve koji se mogu očekivati te one koji najviše doprinose aromi. Metode izolacije se odabiru tako da osiguravaju minimalne gubitke i nastajanje artefakata. Odabrana metoda izolacije ne smije diskriminirati polarne i nepolarne spojeve, uzrokovati toplinsku razgradnju aromatičnih spojeva, oksidaciju, redukciju, promjenu pH ili gubitak najisparljivijih spojeva. Budući da uzorak iz kojeg se izoliraju spojevi nositelji arome obično sadrži i spojeve velike molekulske mase ili neisparljive spojeve poželjno je odabrati metodu koja smanjuje mogućnost pojave ovih tvari u ekstraktu i tako smanjuje probleme koji mogu nastati u daljnjoj, najčešće plinsko-kromatografskoj analizi, kao što su nečiste bazne linije, onečišćenje kolona i, općenito, lošu kromatografiju. Često se za dobivanje kompletnog profila arome upotrebljava više ekstrakcijskih tehnika.

Laboratorijske metode izolacije aromatičnih spojeva mogu se podijeliti na: metode ekstrakcije otapalima, destilacijske metode, tehnike "vršnih para", sorpcijske tehnike.[3]

1.5.1. EKSTRAKCIJA OTAPALOM

U ovoj tehnici izolacije aromatičnih spojeva vrlo važan je izbor otapala. Otapalo mora biti niske temperature vrenja kako bi se lako uklonilo bez značajnijih gubitaka hlapljivih spojeva. Najčešće se kao otapalo upotrebljavaju diklormetan, smjesa pentana i dietil-etera, heksan, etanol, aceton.

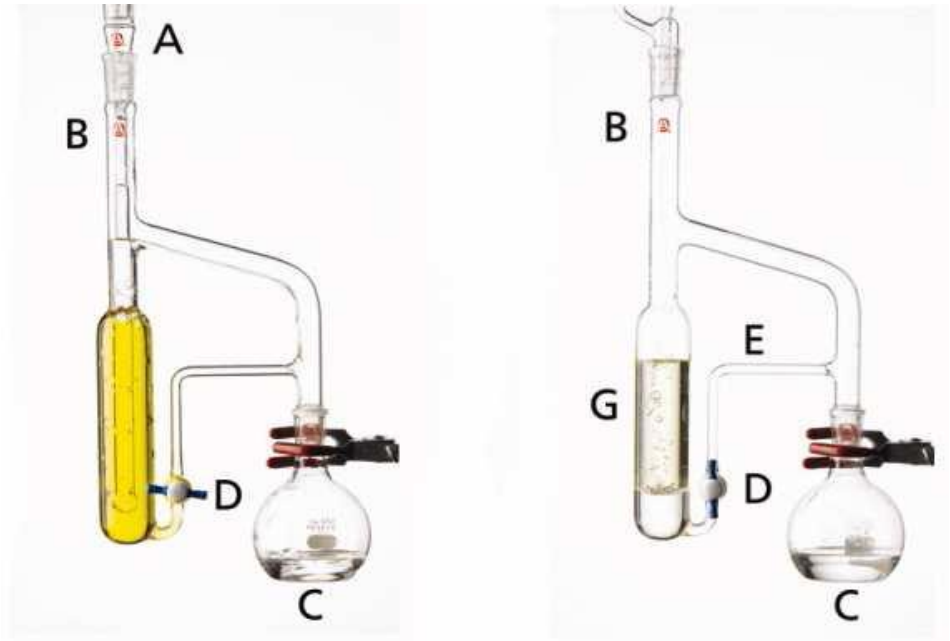
Prednosti metode ekstrakcija otapalom je u jednostavnosti izvedbe te dobroj ekstrakciji aromatičnih spojeva. Nedostatci metode su da tijekom uklanjanja otapala može doći do gubitka najhlapljivijih spojeva, otapala mogu biti toksična te unijeti onečišćenja u ekstrakt. Također potrebna je velika količina uzorka za dobivanje koncentriranog ekstrakta te signal otapala može prekriti rano izlazeće hlapljive spojeve u kromatogramu.[3,14]

1.5.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ukoliko je uzorak iz kojeg se izoliraju spojevi arome tekućina tada se ekstrakcija s organskim otapalom provodi u lijevku za odjeljivanje (diskontinuirano) ili komercijalno dostupnim ekstraktorima za kontinuiranu ekstrakciju. Kontinuirani ekstraktori se razlikuju po izvedbi, ovisno o tome jesu li namijenjeni za ekstrakciju otapalom lakšim ili težim od vode (slika 19).

Za otapala lakša od vode potrebno je u ekstraktor umetnuti adapter (A). Svježe otapalo se kondenzira u hladilu i kroz cijev adaptera difundira sa dna ekstraktora, a zatim se podiže kroz vodeni sloj zbog manje gustoće od vode. Ekstrakcijsko otapala se vraća preko bočne cijevi nazad u zagrijavanu tikvicu (C).

Za otapala teža od vode kontinuirana ekstrakcija se ostvaruje kondenzacijom svježeg otapala iz hladila (B) i prolazeći kroz vodenu fazu u ekstraktoru (G). Otapalo se sakuplja na dnu ekstraktora te kada dosegne nivo cijevi (E) sistemom sifona se preko otvorenog teflonskog pipca (D) prelijeva u zagrijavanu tikvicu (C).



Slika 19. Kontinuirani ekstraktor za ekstrakciju tekuće-tekuće za otapala lakša i teža od vode

Za vrijeme ekstrakcije može doći do stvaranja emulzije što otežava odvajanje organskog od vodenog dijela. U tom slučaju koristi se centrifugiranje za razbijanje emulzije i pospješivanje odvajanja slojeva. Nastanak emulzije se može spriječiti i korištenjem zasićene vodene otopine NaCl umjesto destilirane vode.[3]

1.5.2. SORPCIJSKE TEHNIKE

Sorpcijske tehnike su tehnike koje omogućavaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na particiji organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. U ove tehnike ubrajaju se mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.[3]

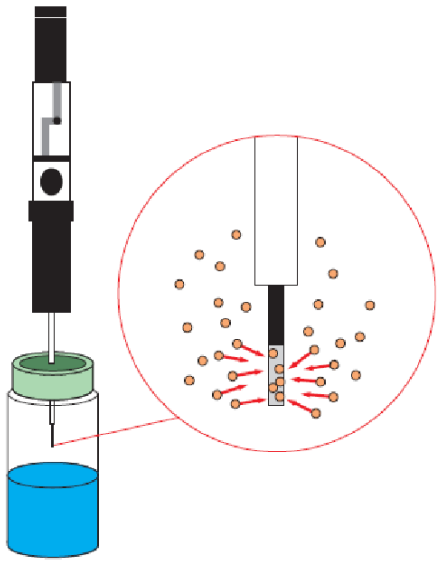
1.5.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (eng. *headspace solid phase microextraction,* HS-SPME) je tehnika koje se često upotrebljava za izolaciju aromatičnih tvari. Ova tehnika koristi silikonsko vlakno, dugo 1 ili 2 cm, prekriveno polimernim filmom za adsorpciju (sakupljenje) hlapljivih spojeva iz uzoraka. Vlakno se nalazi u sustavu igle koja je smještena na SPME držaču za uzorkovanje i desorpciju.

Ekstrakcija aromatičnih spojeva iz uzorka se provodi tako da se uzorak stavi u posudu koja se hermetički zatvori sa tzv. septom i zagrijava. Zatim se u prazni prostor iznad uzorka uvodi vlakno na koje se adsorbiraju hlapljivi spojevi koji su isparili iz uzorka tijekom zagrijavanja, tzv. vršne pare (slika 20). Potom se vlakno uvlači, a vršne pare se desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa. SPME vlakno se rekondicira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa 5-15 minuta.

Prednosti tehnike mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi su brza i laka uporaba, a i ne koriste se otapala. HS-SPME je dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih mirisa.

Nedostatak HS-SPME tehnike je što aromatični profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisi o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja.[3, 15]



Slika 20. Princip ekstrakcije HS-SPME tehnikom[16]

1.6. ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA

Analiza aromatičnih spojeva uključuje instrumentalne tehnike, od kojih treba izdvojiti vezani sustav plinska kromatografija- spektrometrija masa, GC-MS.

1.6.1. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

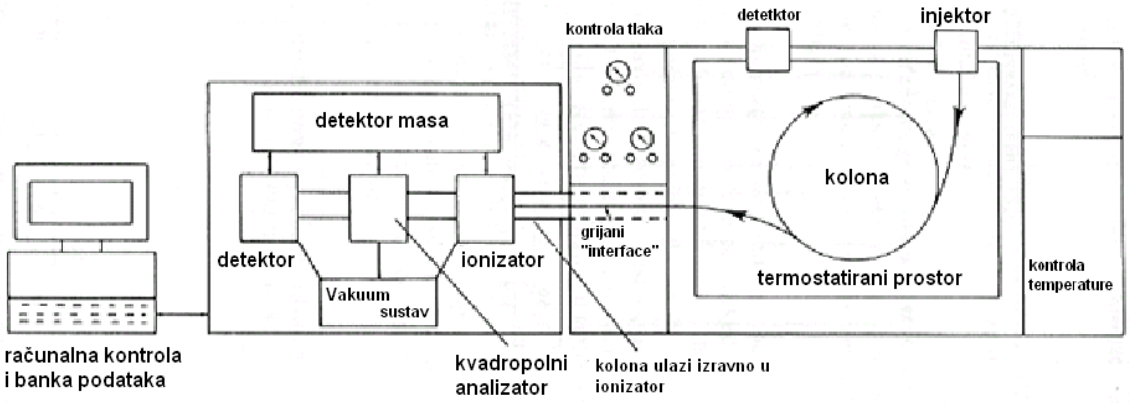
Vezana tehnika plinska kromatografija- spektrometrija masa (eng. *gas chromatography-mass spectrometry,* GC-MS) zauzima posebno mjesto među analitičkim tehnikama koje se koriste u istraživanju hlapljivih spojeva jer omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala.

Spektar masa djeluje kao vrlo osjetljivi detektor za plinski kromatograf. Budući da se vrlo dobro nadopunjuju ove dvije metode se idealne za povezivanje. Obje metode rade s uzorkom u plinskoj fazi te ono što je odvojeno u plinskom kromatografu može biti lako analizirano u spektrometru masa. Nedostatak plinske kromatografije je što je nepouzdana za kvalitativnu analizu, ali je vrlo uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa. Prednost spektrometrije masa je u tome što je pogodna upravo za kvalitativnu analizu što čini ove dvije metode komplementarnim, a njihovom kombinacijom se može postići osjetljivost tehnike u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari. Važan čimbenik u radu vezanog sustava GC-MS je brzina snimanja spektara masa, budući da odijeljene komponente ulaze u detektor masa jedna za drugom.

Spektrometar masa je pod visokim vakuumom (10^{-7} do 10^{-8} tora). Uzorak ulazi u ionizator, u plinskoj fazi, gdje se u slučaju elektron-ionizacije bombardira elektronima energije 50-70-eV. Molekula uzorka se ionizira, tj. nastaje molekulski kation, koji se dalje razlaže u čitav niz iona (fragmenata). O strukturi molekule ovisi koji će fragmentni ioni nastati i u kojem intenzitetu. Na taj način u ionizatoru se stvara veliki broj ionskih vrsta - ionski snop.

Ionski snop se fokusira kroz leće i dolazi do kvadrupolnog filtra masa koji je sastavljen od četiri elektrode postavljene paralelno s ionskim snopom. Kroz njega prolaze samo

ioni koji postižu stabilniju putanju, a ostali se uklanjaju. Elektrode su međusobno električni križno povezane i na dvije skupine povezanih elektroda se priključuje istosmjerni električni potencijal i izmjenični radiofrekvencijski napon. Ioni osciliraju i veći broj ih se izgubi udaranjem u jednu od elektroda gdje se izbijaju. Amplituda oscilacije ostaje malena samo za ione određenog omjera *m/z* te samo ti ioni prolaze do detektora. Detektor je elektronski multiplikator koji uzrokuje emisiju elektrona zbog udara upadnih iona u katodu. Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa s odnosom intenziteta i omjera mase i naboja nastalih fragmenata.[3]



Slika 21. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS

1.5.1.1.

1.7. VINOGRADARSTVO U HRVATSKOJ

Jedan od povijesnih dokaza da su Iliri poznavali vinovu lozu i prije dolaska Kelta su pronađene sjemenke grožđa s komadićima glinene posude nađene u Podvršju kod Zadra. Nije poznato jesu li Iliri znali spravljati i vino ili su pronađene bobice služile samo u pogrebnom obredu. S obzirom da su neka ilirska plemena, kao Liburni, Dalmati, bili vješti pomorci postoji mogućnost kako su kulturu uzgoja vinove loze upoznali na svojim putovanjima i u zemljama koje su imale razvijeno vinogradarstvo. Trgovačka djelatnost na Jadranu temeljila je se na robno-novčanoj razmjeni sa državama na istom stupnju gospodarskog razvoja, sve do grčke kolonizacije.

U četvrtom stoljeću pr. Kr. Grci plove uz Hrvatsku obalu te osnivaju mnoge kolonije na Visu, Hvaru, Korčuli i obalnom dijelu. Proizvodnju vina na Visu i Hvaru potvrđuju stari grčki novčići s motivima grozda ili vrčeva pronađeni u grobnicama.

Dolaskom Rimljana dolazi do razvoja vinogradarstva i vinarstva, jer su Rimljani smatrali poljoprivredu osnovnom granom gospodarstva. Poljoprivrednu proizvodnju, naročito vinogradarstvo i vinarstvo, zatim voćarstvo i proizvodnju maslinovog ulja promicali su na području Istre, Primorja i Dalmacije.

Pokazatelj ustrjanosti Rimljana u jačanju vinogradarstva i vinarstva su pronađeni naputci iz tadašnje prakse proizvodnje vina. Vinske posude bile su označene posebnim listićem, s oznakom količine vina, vrstom vina, količinom alkohola, provedenim sumporenjem i količinom sumpora te godina berbe i vlasnik podruma.

Na području kontinentalne Hrvatske nije pronađeno puno povijesnih podataka kao u Dalmaciji, no smatra se da je i tu vinogradarstvo bilo razvijeno prije širenja Rimskog Carstva. Kulturu uzgoja donijeli su vjerojatno Tračani iz područja Male Azije.

S propašću Rimskog Carstva dolazi do propadanja vinograda i u Panoniji i u Dalmaciji, a razaranja su bili pošteđeni otoci.

U srednjem vijeku, u velikoj seobi naroda, u ove krajeve naseljavaju se Hrvati koji brzo prihvaćaju kulturu uzgoja vinove loze te nakon prihvaćanja kršćanstva vinogradarstvo dobiva još veće značenje. Crkva, kao i u svim drugim segmentima, igrala je važnu ulogu u očuvanju i promicanju vinogradarstva. Raznim darovnicama Crkva postaje

vlasnikom velikih površina pod vinogradima. Najpoznatiji zakonik, Vinodolski zakonik s kraja 13. st., je primjer kako je vinogradarska proizvodnja bila regulirana brojnim zakonskim propisima.

U srednjem vijeku vinogradarstvo je bilo važno za neke gradove poput Splita, Zadra, Trogira, koji su se financirali prihodima koji su dolazili s vinogradarskih posjeda. Statutima su bila određena pravila i kazne pri trgovanju vinima, ponekad i cijene vina.

Iako su dalmatinski gradovi bili pod vlašću Mletačke Republike, tijekom turskih osvajanja su također stradali te je zaustavljen prosperitet vinogradarstva i dolazi do pada broja površina pod vinogradima. U to doba prevladavale su crne sorte, crno vino je bilo dio svakodnevne prehrane stanovništva, dok je bijelo vino bilo piće bogatih i služilo se u svečanim prigodama.[4]

U drugoj polovini 19. st. u kontinentalnoj Hrvatskoj dolaze do pojave bolesti vinove loze koje su tada harale Europom. Zbog bolesti, poput plamenjače i filoksere, koje su pogodile dio Hrvatske, javlja se pojačana potražnja za dalmatinskim vinima. Raste izvoz i cijene grožđa i vina, a ponajviše se izvozilo u Francusku. Krajem 19. st. dalmatinska vina doživljavaju procvat na međunarodnim izložbama u Beču, Trstu, Zagrebu gdje ih komisija ocjenjuje kao vina "kod kojih je uočen najveći napredak od svih austrijskih pokrajina" (Ožanić, 1995.).

Bolesti vinove loze koje su zahvatile Europu pojavile su se i u Hrvatskom primorju što je dovelo do velikog gubitka prinosa. Obnova vinove loze odmah je započela cijepljenjem, no obnova vinograda ide sporo te su se napuštali kvalitetni položaji, a loza se počela saditi u poljima. Promjenom načina podizanja vinograda dovelo je do nepovratnog gubitka mnogih autohtonih sorti ili su one gubile na važnosti, a uvodile su se strane sorte, prikladnije zahtjevima tadašnjeg tržišta.

Tijekom dvaju Svjetskih ratova došlo je do stagnacije vinogradarstva, a nakon Drugog svjetskog rata na području kontinentalne Hrvatske organizirana su društvena poljodjelska gospodarstva s plantažnim vinogradima i vinarijama. U primorskoj Hrvatskoj gradile su se industrijske vinarije.[4]

Hrvatsko vinogradarstvo danas

Nakon proglašenja hrvatske neovisnosti vinogradarstvo postaje sve važniji segment poljoprivredne proizvodnje. Primjena novih znanstvenih i tehničkih dostignuća te sve veća privatna inicijativa doprinijele su povećanju kakvoće hrvatskih vina.

Prema podacima Vinogradarskog registra (2013. god.) u Hrvatskoj ima 21 184, 45 ha vinograda, no veći dio proizvođača posjeduje vinograde veličine manje od jednog hektara. Iz toga proizlazi kako je najveći problem hrvatskog vinogradarstva velika usitnjenost.

Također, prema izvješću Vinogradarskog registra tri najzastupljenije sorte vinove loze u vinogradarskom sortimentu Republike Hrvatske čine Graševina, Malvazija istarska i Plavac mali crni.

Uz brojne turističke manifestacije i događanja vinskog sadržaja, posljednjih godina vinogradarstvo i vinarstvo doživljavaju ponovni procvat i postaju dio kulturno-tradicijskog življenja na ovim prostorima.[4]

1.7.1. REGIONALIZACIJA VINOGRADARSKE PROIZVODNJE HRVATSKE

Zemljopisna područja na kojima se uzgaja vinova loza karakteriziraju određene klimatske i geomorfološke prilike. S obzirom na klimatska obilježja (temperatura, oborine, kretanje vjetra) i geomorfološka svojstva (sastav tla, nagib terena) svaka cjelina u kombinaciji sa sortom uvjetuje specifičnu kakvoću grožđa te kakvoću i stil budućeg vina.

Regionalizacijom je znatno olakšana kontrola i evidencija ukupne vinogradarsko-vinarske proizvodnje. U Hrvatskoj je prva regionalizacija provedena 1975. godine, a takva regionalizacija odražala se i do danas.

Prema Pravilniku o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze Republika Hrvatska podijeljena je na tri vinogradarske regije:

- Istočna kontinentalna Hrvatska
- Zapadna kontinentalna Hrvatska

- Primorska Hrvatska.

Unutar tri navedene regije objedinjeno je 12 podregija: Hrvatsko Podunavlje, Slavonija, Moslavina, Prigorje-Bilogora, Zagorje-Međimurje, Plešivica, Pokuplje, Hrvatska Istra, Hrvatsko primorje, Sjeverna Dalmacija, Dalmatinska zagora, Srednja i južna Dalmacija (slika 22).[4]

Slika 22. Prikaz vinogradarskih podregija u Hrvatskoj[4]

1.7.1.1. Podregija Dalmatinska zagora

Podregija Dalmatinska zagora nalazi se u zaleđu planina Kozjak, Mosor i Biokovo te obuhvaća područje Sinja, Vrlike, Imotskog i Vrgorca. Sjeverni i sjevernoistočni dio

Zagore čine Imotsko, Vrličko i Sinjsko polje. Tla krških polja aluvijalnog i koluvijalnog su podrijetla, na ostalim područjima nalaze se crvenice i smeđa tla razvijena na vapnencima. Zbog odvojenosti planinskim masivima povoljni je utjecaj mora na klimu Dalmatinske zagore nešto slabiji. Srednja godišnja temperatura iznosi 13,3 ^{0}C, a insolacija oko 2500 sati. Područje karakteriziraju visoke količine oborina tijekom godine, od čega većina padne tijekom jesenskih i zimskih mjeseci, dok se ljeti mogu dogoditi i sušna razdoblja. Područje je također poznato po velikom broju autohtonih sorata, prije svega Kujundžuša, zatim Zlatarica vrgorska, Trbljan, Medna, Vranac, Trnjak, Žilavka, Blatina, Debit i Maraština.[4]

1.7.2. KUJUNDŽUŠA

Podrijetlo sorte nije sa sigurnošću utvrđeno, ali se smatra autohtonom sortom imotskog područja. Prema usmenoj predaji nađena je u selu Ivanbegovina. Navodno se u početku zvala Žutac ili Žutka, a tek kasnije je dobila ime Kujundžuša po prezimenu Kujundžić koje je raširenо u tom području. Uzgaja se uglavnom na području Imotskog vinogorja, gdje je najzastupljenija i najvažnija sorta u sortimenu. Iz tog područja proširila se i u susjednu Hrcegovinu. U Hrvatskoj se uzgaja na površini od 238,37 ha.

Botanički opis

Vrh mladice je blago povijen, dlakav, svijetlozelene boje. Mladi listići su žljebasti s izraženim zupcima, prva dva s rijetkim paučinastim dlačicama na naličju, a ostali gotovo goli. List je srednje velik do velik, pravilan, peterodijelan sa srednje duboko urezanim postranim sinusima. Sinus peteljke je zatvoren ili blago otvoren. Lice je glatko, zelene boje, a naličje vunasto dlakavo. Po obodu su izraženi, veliki, oštri zupci. Cvijet je morfološki i funkcionalno hermafroditan.

Grozd je srednje velike, ponekad i velik, piramidalan, zbijen, srednje duge peteljke (slika 23). Bobice su srednje velike, okrugle ili blago eliptične. Kožica je prozirna, žuta, na sunčanoj strani blago crvenkasta. Meso je sočno, a sok sladak, neutralnog okusa.

Biološka svojstva

S vegetacijom počinje srednje kasno, a dozrijeva kasno, krajem trećeg i početkom četvrtog razdoblja. Vrlo je bujna sorta koja nije osobito osjetljiva na gljivične bolesti, tek su u zrelosti bobice osjetljive na otkidanje zbog na primjer jakog vjetra. Rodnost sorte je redovita i visoka. Kakvoća sorte je prosječna, jako ovisi o visini prinosa. Pri manjem opterećenju koncentracija šećera može biti zadovoljavajuća, ali joj je kiselost redovito vrlo niska.

Gospodarska važnost

Sorta je vrlo raširena, budući da je redovite i visoke rodnosti te malih zahtjeva prema ekološkim uvjetima, isključivo na području Imotskog. Vino Kujundžuše se još često proizvodi tradicionalnom tehnologijom, uz dugotrajnu maceraciju stoga su vina intenzivno žute boje, trpka, snažna, pogodna za duže čuvanje, ali najčešće tupa i neharmonična čemu je pridonijela i niska kiselost. Ovo vina nema mnogo poklonika izvan matičnog uzgojnog područja gdje su potrošači navikli na taj tip vina. U posljednje vrijeme su, primjenom suvremene tehnologije i ranijom berbom, vina puno užitnija. Za postizanje bolje kakvoće vina važno je posvetiti više pozornosti tehnologiji proizvodnje grožđa, ali osobito reguliranju prekomjerne rodnosti.

Ugroženost

Usprkos uskom području raspostranjenosti, sorta se ne smatra ugroženom zbog velike populacije i gospodarskog značaja. Promjenama u tehnologiji proizvodnje vina Kujundžuše kakvoća se može prilagoditi suvremenom shvaćanju kakvoće bijelih vina te time osigurati dugotrajan opstanak sorte.[4]

Slika 23. Sorta Kujundžuša[4]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovome radu je određen aromatični profil vina sorte Kujundžuša, odnosno izolirani su i identificirani hlapljivi spojevi (spojevi arome) iz tri uzorka vina sorte Kujundžuša:

- Kujundžuša 1
- Kujundžuša 2
- Kujundžuša 3.

Vino je dobiveno iz vinarije Grabovac u Prološcu, imotsko vinogorje.

2.1. KEMIKALIJE I APARATURA

Kemikalije:

- dietil-eter, p.a., Panreac, Španjolska
- pentan, p.a., Lach-Ner, Zagreb, Hrvatska
- diklormetan, p.a., Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
- metanol, p.a., T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- natrijev-sulfat, bezvodni, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- magnezijev-sulfat, bezvodni, p.a., ThermoFisher, Kandel, Njemačka
- NaCl (kuhinjska sol), Solana Pag, Hrvatska.

Aparatura:

- magnetska miješalica, model MR Hei-Standard, s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Schwabach, Njemačka
- analitička vaga, Kern model ALS 120-4, Velika Britanija
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME), sa SPME vlaknom DVB/PDMS (divinilbenzen/polidimetilsiloksan), Supelco, Bellefonte, SAD
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies, Santa Clara, SAD:
    - plinski kromatograf model 7820A
    - spektrometar masa model 5977E.

2.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE

Ekstrakcija hlapljivih spojeva iz vina provedena je diskontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće sa dva organska otapala: smjesom pentan:dietil-eter, 1:2 v/v i diklormetanom.

UErlenmeyerovu tikvicu stavljeno je 50 mL uzorka (vina), 25 mL smjese otapala pentan:dietil-eter i tri žlice kuhinjske soli (NaCl) te magnetić. Erlenmeyerova tikvica postavljena je na magnetsku miješalicu, a broj okretaja podešen je na 480 okr/min. Ekstrakcija je provedena pri sobnoj temperaturi u trajanju od 45 minuta. Po završetku ekstrakcije smjesa je ostavljena nekoliko minuta da se odijele slojevi. Potom je gornji, organski sloj, odnosno pentan:dietil-eterski ekstrakt, kapaljkom odijeljen od donjeg, vodenog sloja te je filtriran preko vate na kojoj se nalazio sloj sredstva za sušenje, bezvodnog natrijevog sulfata. Na taj način je organski sloj osušen, tj. uklonjeni su ostatci vode u organskom sloju. Organski ekstrakt je uparen frakcijskom destilacijom do volumena od 1 do 2 mL, prebačen u bočicu koja je hermetički zatvorena te čuvan na -18 °C do analize na GC-MS-u.

Ekstrakcija uzoraka vina s diklormetanom provedena je na isti način. Diklormetan je otapalo teže od vode i predstavlja donji sloj u Erlenmeyerovoj tikvici, pa je odvajanje diklormetanskog ekstrakta od vodenog sloja nešto teže. Osim toga tijekom ekstrakcije došlo je do stvaranja emulzije pa je nakon provedene ekstrakcije smjesa centrifugirana 8 minuta pri 3000 okr/min radi boljeg odjeljivanja slojeva. Zatim je gornji, vodeni sloj odvojen od diklormetanskog ekstrakta pomoću kapaljke, a diklormetanski ekstrakt je filtriran na gore opisani način. Suhi diklormetanski ekstrakt je uparen frakcijskom destilacijom do volumena od 1 do 2 mL, prebačen u bočicu koja je hermetički zatvorena te čuvan na -18 °C do analize na GC-MS-u.

2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI

Uzorak za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (5 mL vina) je stavljen u staklenu bočicu volumena 15 mL, dodane su dvije žlice NaCl i magnetić te je bočica

hermetički zatvorena teflonskom septom. Bočica s uzorkom je stavljena u vodenu kupelj zagrijanu na 60 ºC koja je pripremljena na magnetskoj miješalici te je miješana 15 minuta pri 500 okr/min. Za to vrijeme hlapljivi spojevi iz uzorka su isparili u prazni prostor iznad uzorka.

U skladu s uputama, svjetloplavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 minuta na 300º C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzorka.

Nakon kondicioniranja vlakna, u prazni prostor iznad uzorka uvedena je SPME igla s vlaknom radi adsorpcije hlapljivih spojeva koji su isparili iz uzorka tijekom zagrijavanja od 15 min, tzv. vršnih para. Adsorpcija vršnih para vršena je 40 minuta. Nakon adsorpcije SPME vlakno vraćeno je u iglu, izvučeno iz bočice s uzorkom i odmah postavljeno u GC-MS injektor gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (250º C, 7 minuta).

2.4. DEHIDRATACIJA S MAGNEZIJEVIM SULFATOM

U epruvetu s brušenim čepom stavljeno je 5 mL uzorka (vina) i 3,5 g sredstva za dehidrataciju, bezvodnog magnezijevog sulfata, $MgSO_4$. Smjesa je špatulom miješana dok nije postignuta homogena suspenzija te je stavljena na tzv. vortex u trajanju od 8 minuta. Potom je provedeno centrifugiranje smjese u trajanju od tri minute radi boljeg odijeljivanja faza. Gornji sloj je pažljivo sakupljen, razrijeđen s metanolom (1:1 v/v) te izravno injektiran u GC-MS.[2]

2.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Za analizu je korišten spregnuti sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa proizvođača Agilent Technologies (SAD) koji se sastoji od plinskog kromatografa model 7820A u kombinaciji sa spektrometrom masa model 5977E te računala (slika 24).

Separacija sastojaka provedena je na kapilarnoj koloni sa nepolarnom stacionarnom fazom (HP–5MS), proizvođača Agilent Technologies ((5% fenil)-metilpolisiloksan) dimenzija 30 m × 0,25 mm i debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm.

Uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone:
  3,5 minute izotermno pri 70 ^{0}C, zatim od 70 do 200 ^{0}C s porastom od 3 ^{0}C/min i 20 min izotermno pri 200 °C
- "solvent delay" (vrijeme u kojem izlazi otapalo): 3 minute
- temperatura injektora: 250 ^{0}C
- omjer cijepanja: 1:50
- količina injektiranog uzorka: 1μL
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin^{-1}

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV
- temperatura detektora: 280 ^{0}C
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize, osim kromatograma ukupne ionske struje, dobiveni su podaci o nazivu spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente, vrijeme zadržavanja pojedine komponente koja je na kromatogramu ukupne ionske struje predstavljena pikom te relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja poznatih tvari iz eteričnih ulja (ili smjesa hlapljivih spojeva) prethodno analiziranih GC/MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju. Osim toga identifikacija je provedena i usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara, Wiley 9 MS library i NIST14 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) i /ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Slika 24. GC-MS uređaj u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu

3. REZULTATI

3.1. GC/MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Izolacija hlapljivih aromatičnih spojeva iz tri uzorka vina sorte Kujundžuša provedena je ekstrakcijom tekuće-tekuće korištenjem smjese otapala pentan:dietil-eter, 1:2 v/v i diklormetana, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) te dehidratacijom pomoću sredstva za dehidrataciju, bezvodnog magnezijevog sulfata (opisano u poglavljima 2.2. – 2.4). Na taj način je dobiveno jedanaest uzoraka hlapljivih spojeva, a svi uzorci su analizirani spregnutim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 2 - 5. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (izražen u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

1, 2 i 3 – uzorci vina: Kujundžuša 1, Kujundžuša 2 i Kujundžuša 3

tr. – spoj prisutan u tragovima (< 0,1 %)

[a] - identifikacija isključivo usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley 9 i/ili NIST14biblioteka masenih spektara

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim ekstrakcijom sa smjesom otapala pentan:dietil-eter, 1:2 v/v

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) 1	2	3
1.	1,3-oksatian	4,30	/	0,2	/
2.	heksanska kiselina	6,12	1,7	0,4	/
3.	2-feniletanol	10, 45	48,1	16,7	59,1
4.	dietil-sukcinat	12,98	6,6	3,6	17,7

5.	oktanska kiselina	13,12	2,8	0,3	/
6.	monoetil-sukcinat	13,45	32,5	37,0	14,0
7.	*p*-vinilfenol	15,10	/	1,1	/
8.	dietil-malat	16,62	6,2	0,6	4,3
9.	dietil-2-hidroksiglutarat	21,48	/	0,3	/
10.	dekanska kiselina	21,81	/	0,3	/
11.	etil-3-metilbutil-sukcinat	23,29	/	0,4	/
12.	2-(*p*-hidroksifenil)etanol	24,11	0,3	14,4	/
13.	2,6-di(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT)	26,60	1,8	0,9	4,9
14.	1H-indol-3-etanol	36,05	/	2,7	/
15.	2-feniletil-3-metilbutanoat	38,23	/	0,5	/
16.	*p*-kumarinska kiselina	38,81	/	4,9	/
17.	ferulinska kiselina	40,25	/	1,0	/
18.	heksadekanska kiselina	42,78	/	3,1	/
19.	oktadekanska kiselina	49,56	/	1,9	/
20.	5-etil-2(5H)furanon	58,62	/	1,1	/
Ukupno identificirano (%)			100	91,4	100

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim ekstrakcijom s diklormetanom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) 1	2	3
1.	1,3-oksatian	4,30	/	0,1	0,2
2.	dihidro-2(3H)-furanon	4,43	/	0,2	0,1
3.	heksanska kiselina	6,12	/	/	0,1
4.	etil-4-hidroksibutanoat	8,31	/	0,2	/
5.	2-feniletanol	10, 45	8,3	11,7	7,5
6.	dietil-sukcinat	12,98	1,2	2,4	1,8
7.	oktanska kiselina	13,35	0,9	/	/

8.	monoetil-sukcinat	13,45	25,0	54,0	34,2
9.	*p*-vinilfenol	15,10	1,4	/	/
10.	dietil-malat	16,62	5,2	1,3	3,3
11.	dihidro-5-propil-2(3H)furanon	18,19	/	0,5	/
12.	jabučna kiselina	18,80	0,3	4,6	2,3
13.	jantarna kiselina	19,99	/	1,4	/
14.	etil-3-hidroksiheksanoat	20,07	/	0,9	/
15.	dietil-tartarat	20,35	1,6	1,1	1,7
16.	dietil-2-hidroksiglutarat	21,48	0,7	0,5	0,9
17.	dekanska kiselina	21,81	/	0,3	0,4
18.	2-pentil-pentanoat	21,85	1,0	/	/
19.	etil-3-metilbutil-sukcinat	23,29	/	0,1	/
20.	2-(*p*-hidroksifenil)etanol	24,11	7,6	11,8	6,5
21.	vanilinska kiselina	30,17	/	/	1,2
22.	dihidrokoniferil-alkohol	32,27	/	0,2	0,3
23.	1H-indol-3-etanol	36,05	/	0,5	0,3
24.	2-feniletil-3-metilbutanoat	38,23	/	0,6	/
25.	izopropil-tetradekanoat	38,10	/	/	0,2
26.	etil-*p*-kumarat	38,67	0,9	0,5	1,1
27.	siringinska kiselina	39,04	/	/	0,7
28.	*p*-kumarinska kiselina	38,81	2,7	0,4	2,7
29.	ferulinska kiselina	40,25	2,4	/	1,0
30.	heksadekanska kiselina	42,78	2,0	1,7	1,3
31.	heptadekanska kiselina	45,93	/	0,1	/
32.	oktadekanska kiselina	49,56	4,7	1,2	1,7
Ukupno identificirano (%)			65,9	71,0	69,5

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) 1	2
1.	etil-acetat	1,67	1,6	2,5
2.	etanol	1,70	tr.	0,8
3.	3-metilbutan-1-ol	2,16	13,6	18,2
4.	etil-butanoat	2,69	0,2	/
5.	furfural	3,12	0,9	/
6.	butan-1-ol	3,58	0,5	/
7.	heksanska kiselina	6,12	4,0	/
8.	etil-heksanoat	6,44	/	1,9
9.	2-feniletanol	10, 45	14,4	32,2
10.	dietil-sukcinat	12,98	4,1	9,4
11.	oktanska kiselina	13,35	13,4	6,8
12.	etil-oktanoat	13,62	23,9	14,5
13.	etil-2-fenilacetat	15,59	0,4	/
14.	vitispiran	16,99	1,1	tr.
15.	1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftalen	20,07	1,6	tr.
15.	dekanska kiselina	21,81	4,4	2,0
16.	etil-dekanoat	21,89	11,4	10,3
17.	etil-3-metilbutil-sukcinat	23,29	/	0,7
18.	heksadekanska kiselina	42,78	1,8	/
Ukupno identificirano (%)			97,3	99,3

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim dehidratacijom s magnezijevim sulfatom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) 1	2	3
1.	furfural	3,12	/	/	2,0
2.	heksanska kiselina	6,12	1,2	/	1,0
3.	glicerol	6,86	2,1	/	/
4.	2-feniletanol	10, 45	13,0	15,3	15,0
5.	dietil-sukcinat	12,98	/	13,5	4,4
6.	oktanska kiselina	13,12	3,0	/	1,5
7.	monoetil-sukcinat	13,45	14,2	39,2	22,2
8.	dietil-malat	16,62	3,6	0,7	2,4
9	jabučna kiselina	18,80	6,1	/	11,0
10.	jantarna kiselina	19,99	/	8,4	/
11.	dekanska kiselina	21,22	0,5	/	
12.	dietil-2-hidroksiglutarat	21,48	0,9		
13.	2-(*p*-hidroksifenil)etanol	24,11	3,2	10,8	4,9
14.	heksadekanska kiselina	42,78	0,5	/	2,0
15.	farnezil-acetat	48,28	6,8	/	/
Ukupno identificirano (%)			55,1	87,9	66,4

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti profil hlapljivih spojeva koji čine aromu vina sorte Kujundžuša, odnosno odrediti sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u odabranim uzorcima vina te usporediti dobivene rezultate, istaknuti prednosti i mane pojedine metode izolacije radi izbora pogodnije metode za izolaciju hlapljivih aromatičnih spojeva.

Vino Kujundžuša je intenzivno žute boje, trpko, snažno, pogodno za duže čuvanje, ali najčešće tupo i neharmonično. Još uvijek se najčešće proizvodi tradicionalnom tehnologijom, uz dugotrajnu maceraciju i dozrijevanje. Ovo vino nema mnogo poklonika izvan matičnog uzgojnog područja, Imotske krajine, gdje su potrošači navikli na taj tip vina. U posljednje vrijeme su, primjenom suvremene tehnologije i ranijom berbom, vina puno užitnija.[4]

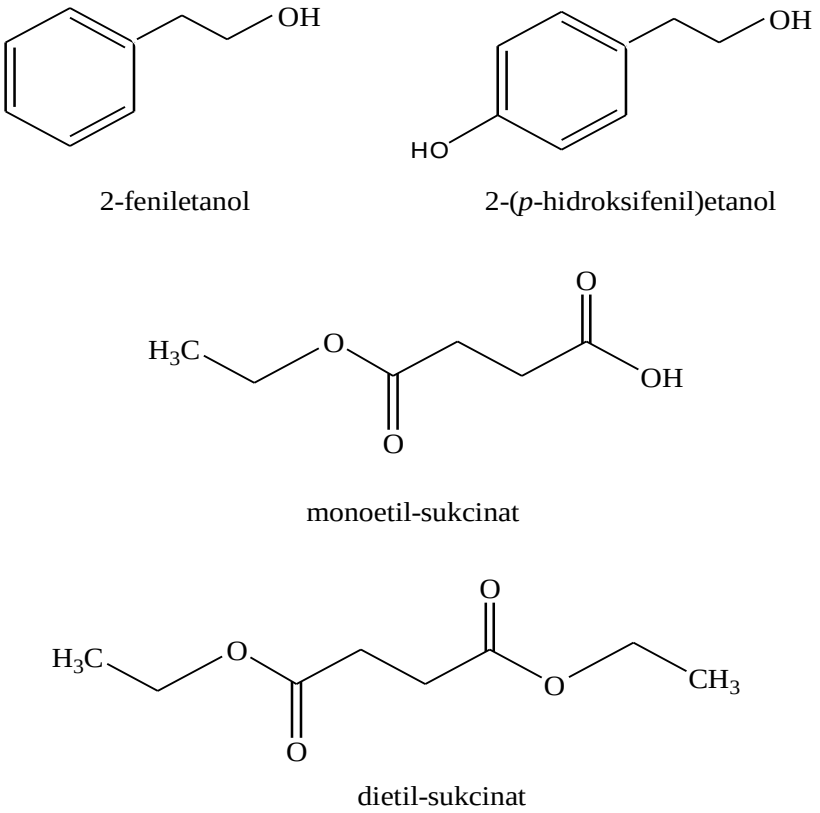
Za dobivanje aromatičnog profila korištene su tri metode izolacije, ekstrakcija tekuće-tekuće i to sa dva otapala različite polarnosti, smjese otapala pentan:dietil-eter, 1:2 v/v i diklormetana, zatim mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) te dehidratacija pomoću sredstva za dehidrataciju, bezvodnog magnezijevog sulfata. Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva analizirani su spregnutim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 2 - 5.

4.1. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim ekstrakcijom sa smjesom otapala pentan:dietil-eter (1:2 v/v) dan je u tablici 2. U uzorku Kujundžuša 1 identificirano je 8 spojeva što predstavlja 100 % od ukupnog uzorka. Glavni sastojci u uzorku su 2-feniletanol (48,1 %) i monoetil-sukcinat (32,5 %), a slijede dietil-sukcinat (6,6 %) i dietil-malat (6,2 %). U uzorku Kujundžuša 2 identificirano je 20 spojeva što čini 91,4 % od ukupnog uzorka. Glavni sastojak u ovom uzorku je monoetil-sukcinat (37,0 %), a kvantitativno značajni sastojci su i 2-feniletanol (16,7 %) i 2-(p-hidroksifenil)etanol (14,4 %). Pet spojeva identificiranih u uzorku Kujundžuša 3 čine 100 % od ukupnog uzorka. U uzorku dominira 2-feniletanol (59,1 %), a udio estera

jantarne kiseline, dietil-sukcinata (17,7 %) i monoetil-sukcinata (14,0 %) je također značajan. Treba napomenuti da je u sva tri uzorka hlapljivih spojeva dobivenih ovom metodom identificiran 2,6-di(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (butilirani hidroksitoluen – BHT) koji vjerojatno potječe iz otapala, dietil-etera, gdje se dadaje kao antioksidans.

Glavni hlapljivi spojevi u sva tri uzorka Kujundžuše su 2-feniletanol te etilni esteri jantarne kiseline, monoetil-sukcinat i dietil-sukcinat (slika 25). Navedeni spojevi spadaju u hlapljive spojeve sekundarne arome vina.[17] Aromatski alkohol 2-feniletanol spada u skupinu viših alkohola i važan je za senzorsku aromu vina. Ovaj alkohol nastaje iz aminokiseline fenilalanina tijekom alkoholne fermentacije. Međutim 2-feniletanol je u glikozidno vezanom obliku prisutan i u grožđu te vjerojatno jedan dio ovog alkohola potječe i iz grožđa. Ovako visok sadržaj 2-feniletanola karakterističan je za slatka vina (npr. prošek). 2-Feniletanol daje vinima aromu ruže i meda.[18] Općenito, porast sadržaja viših alkohola rezultat je dulje maceracije uz doticaj s kisikom i više temperature fermentacije.[17] Hlapljivi esteri, kao što su monoetil-sukcinat i dietil-sukcinat, nastaju jabučno-mliječnom fermentacijom, ali i esterifikacijom tijekom dozrijevanja vina. Identificirani sukcinati vinima daju laganu voćnu aromu.



Slika 25. Hlapljivi spojevi sekundarne arome vina Kujundžuša

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim ekstrakcijom sa diklormetanom prikazan je u tablici 3. U uzorku Kujundžuša 1 identificirano je 16 spojeva što predstavlja 65,9 % od ukupnog uzorka. Glavni sastojak u uzorku je monoetil-sukcinat (25,0 %), a kvantitavno značajni satojci su 2-feniletanol (8,3 %), 2-(*p*-hidroksifenil)etanol (7,6 %) i dietil-malat (5,2 %). U uzorku Kujundžuša 2 identificirana su 24 hlapljiva spoja, odnosno 71,0 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni sastojak ovog uzorka je monoetil-sukcinat (54,0 %), a slijede 2-(*p*-hidroksifenil)etanol (11,8 %) i 2-feniletanol (11,7 %). U uzorku Kujundžuša 3 identificirana su 22 hlapljiva spoja, odnosno 69,5 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni sastojak i ovog uzorka je monoetil-sukcinat (34,2 %), a kvantitativno značajni sastojci su 2-feniletanol (7,5 %) i 2-(*p*-hidroksifenil)etanol (6,5 %).

Ekstrakcijom s diklormetanom iz sva tri uzorka vina izoliran je i identificiran veći broj hlapljivih spojeva, ali je uspješnost identifikacije znatno slabija nego kod uzoraka hlapljivih spojeva dobivenih ekstrakcijom sa smjesom otapala pentan:dietil-eter. Glavni sastojak sva tri uzorka je monoetil-sukcinat. Dietil-sukcinat je također identificiran u sva tri uzorka, ali je njegov sadržaj manji nego u uzorcima hlapljivih spojeva dobivenih ekstrakcijom sa smjesom otapala pentan:dietil-eter. Glavni hlapljivi spojevi u sva tri uzorka Kujundžuše dobiveni ekstrakcijom s diklormetanom, ali i većina ostalih identificiranih spojeva, kao što su hlapljive masne kiseline srednje dugog (C_6 – C_{10}) i dugog (C_{16} i C_{18}) ugljikovodičnog lanca, dikarboksilne kiseline i hlapljivi esteri, spadaju u spojeve sekundarne arome vina.[17]

4.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) prikazan je u tablici 4. Ovom metodom izolirani su hlapljivi spojevi iz dva uzorka vina, Kujundžuše 1 i Kujundžuše 2. U uzorku Kujundžuša 1 identificirano je 17 spojeva što predstavlja 97,3 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni spojevi u ovom su etil-oktanoat (23,9 %), 2-feniletanol (14,4

%), 3-metilbutan-1-ol (13,6 %), oktanska kiselina (13,4 %) i etil-dekanoat (11,4 %). U uzorku Kujundžuša 2 identificirano je 13 spojeva što predstavlja 99,3 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. 2-Feniletanol je dominantan spoj u uzorku (32,2 %), a kvantitativno značajni sastojci su još i 3-metilbutan-1-ol (18,2 %), etil-oktanoat (14,5 %) i etil-dekanoat (10,3 %). U oba uzorka hlapljivih spojeva dobivena HS-SPME metodom identificiran je dietil-sukcinat (4,1, odnosno 9,4 %).

Poznato je da je HS-SPME metoda prikladna za izolaciju hlapljivih spojeva primarne arome, monoterpena i C_{13}-norizoprenoida.[17] Međutim svi navedeni spojevi izolirani HS-SPME metodom iz Kujundžuše su spojevi sekundarne arome vina, hlapljivi esteri masnih kiselina srednje dugog CH-lanca, odgovarajuće masne kiseline i viši alkoholi. Oba uzorka sadrže samo dva spoja primarne arome, C_{13}-norizoprenoide vitispiran i 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftalen, koji su u uzorcima prisutni u vrlo malim količinama ili čak u tragovima.

4.3. DEHIDRATACIJA S MAGNEZIJEVIM SULFATOM

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima dobivenim dehidratacijom s bezvodnim magnezijevim sulfatom prikazan je u tablici 5. U uzorku Kujundžuša 1 identificirano je 12 spojeva, odnosno 55,1 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni sastojci uzorka su monoetil-sukcinat (14,2 %) i 2-feniletanol (13,0 %). U uzorku je identificiran jedan terpenski spoj, ester farnezil-acetat /6,8 %) te jabučna kiselina (6,0 %) i njen diester, dietil-malat (3,6 %). U uzorku Kujundžuša 2 identificirano je manje spojeva, 6, koji predstavljaju 87,9 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. najviše je monoetil-sukcinata (39,2 %), a slijede 2-feniletanol (15,3%9, dietil-sukcinat (13,5 %), 2-(p-hidroksifenil)etanol (10,8 %) te jantarna kiselina (8,4 %). U uzorku Kujundžuša 3 identificirano je 10 spojeva, odnosno 66,4 % od ukupno izoliranih hlapljivih spojeva. Glavni sastojci i u ovom uzorka su kvalitativno isti, monoetil-sukcinat (22,2 %), 2-feniletanol (15,0 %) i jabučna kiselina (11,0 %).

Svi navedeni hlapljivi spojevi, osim farnezil-acetata, su spojevi sekundarne arome vina. Visoki udio jabučne kiseline u uzorcima 1 i 3 ukazuje na nepotpunu jabučno-mliječnu

fermentaciju. U uzorku 2 nije identificirana jabučna kiselina, nego jantarna kiselina, uobičajena kiselina prisutna u vinima.

U ovom radu istražen je profil hlapljivih spojeva arome vina koji su izolirani različitim metodama. Bez obzira na metodu izolacije dobiveni profil hlapljivih spojeva Kujundžuše je sličan i to kvalitativno i kvantitativno. Vina Kujundžuše karakterizira tipični aromatski profil bijelih vina u kojima dominiraju spojevi sekundarne arome kao što su viši hlapljivi alkoholi, hlapljivi esteri i kiseline. Premda je očekivano da će HS-SPME metoda dati drugačiji profil hlapljivih spojeva, s većim udjelom monoterpena i C_{13}-norizoprenoida koji su spojevi primarne arome vina, to nije postignuto. Ipak treba istaknuti HS-SPME metodu i ekstrakciju tekuće-tekuće sa smjesom otapala pentan:dietil-eter (1:2, v/v) kao prikladnije metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome vina Kujundžuše. Korištenjem navedenih metoda uspješnost identifikacije je bila znatno bolja (91 – 100 %).

5. ZAKLJUČAK

- Cilj istraživanja, određivanje aromatičnog profila vina sorte Kujundžuša korištenjem različitih metoda izolacije, ekstrakcijom tekuće-tekuće sa otapalima pentan:dietil-eter i diklormetan, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) i dehidratacijom pomoću sredstva za dehidrataciju te usporedba kemijskog sastava i udjela identificiranih hlapljivih spojeva arome u dobivenim uzorcima, je ostvaren.

- Bez obzira na metodu izolacije dobiveni profil hlapljivih spojeva arome Kujundžuše je kvalitativno i kvantitativno sličan. U svim uzorcima dominiraju hlapljivi spojevi sekundarne arome, viši alkoholi 2-feniletanol i 2-(*p*-hidroksifenil)etanol, esteri dikarboksilnih kiselina monoetil-sukcinat i dietil-sukcinat, esteri masnih kiselina etil-oktanoat i etil-dekanoat te masne kiseline.

- Suprotno od očekivanog, i HS-SPME metoda je dala sličan profil hlapljivih spojeva kao i druge metode, odnosno ni ovom metodom nisu izolirani i identificirani spojevi primarne arome vina, monoterpeni i C_{13}-norizoprenoidi.

- HS-SPME metoda i ekstrakcija sa smjesom otapala pentan:dietil-eter (1:2, v/v) su prikladnije metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome vina Kujundžuše od ekstrakcija sa diklormetanom i dehidratacije s bezvodnim magnezijevim sulfatom.

- Za istraživanje hlapljivih spojeva primarne arome vina treba nastaviti istraživanja HS-SPME metodom korištenjem različitih vlakana za adsorpciju.

- Općenito, za dobivanje što detaljnijeg aromatičnog profila vina, koji uključuje hlapljive spojeve primarne, sekundarne i tercijarne arome vina, potrebno je nastaviti istraživanja koristeći različite metode izolacije hlapljivih spojeva.

6. LITERATURA

1. https://www.wineinmoderation.eu/en/content/History-Tradition-of-Wine.4/ (preuzeto 25. kolovoza 2017.)
2. A. Angioni, G. A. M. Pintore, P. Caboni,*Journal of AOAC International***95** (2012) 813-820.
3. I. Jerković,*Kemija aroma*, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, travanj 2011.
4. E. Maletić i sur.,*Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze*, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 2015.
5. I. Generalić, D. Skroza, V. Katalinić,*Prerada grožđa*, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, 2010.
6. http://www.plantea.com.hr/vinova-loza/(preuzeto 31. kolovoza 2017.)
7. https://hr.wikipedia.org/wiki/Vinova_loza (preuzeto 31. kolovoza 2017.)
8. I. Alpeza,*Glasnik zaštite bilja* **6** (2008) 143-150.
9. http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=aroma(preuzeto 5. listopada 2017.)
10. E. Lengyel,*Primary aromatic character of wines*, Faculty of Agricultural Sciences, Food Industry and Environmental Protection "Lucian Blaga" University of Sibiu, Romania, 2012, pp. 3-18.
11. S.V.Bhat, B.A. Nagasampagi, M. Sivakumar, *Chemistry of Natural Products*, Springer-Narosa, Berlin, New Delhi, 2005, pp. 115-120.
12. Paul M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997, pp. 152-168.
13. J. Mann, R. S. Davidson, J. B. Hobbs, D. V. Banthorpe, J. B.Harborne, *Natural products: their chemistry and biological significance*, Addison Wesley Longman Limited, Harlow, 1994, pp. 289-296.
14. I. Kaselj, *Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2012.
15. I. Jerković, Z. Marijanović, *Croat. J. Food Sci. Technol.*,**1** (2009) 28-34.
16. https://www.omicsonline.org/articles-images/2155-9929-6-253-g002.html(preuzeto 7. listopada 2017.)

17. I. Lukić, S. Radeka, A. Vanzo, K. Lisjak, D. Bavčar, *Proceedings, 50th and 10th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 2015, pp. 515-520.
18. I. Budić-Leto, G. Zdunić, M. Banović, K. Kovačević Ganić, I. Tomić-Potrebuješ, T. Lovrić, Food Technol. Biotechnol., **48** (2010) 530-537.