

Metode određivanja reduktivnih sumpornih spojeva u vinu

Đukić, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:452929>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Darija Đukić

1249/PI

**METODE ODREĐIVANJA
REDUKTIVNIH SUMPORNIH
SPOJEVA U VINU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Marine Tomašević i Katarine Lukić, mag. ing.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić na stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Od srca zahvaljujem doc. dr. sc. Marini Tomašević na strpljenju, trudu te korisnim savjetima pri izradi ovog rada. Veliko hvala asistentici Katarini Lukić, mag. ing. na nesebičnoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji i bliskim prijateljima na iznimnoj potpori i razumijevanju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

METODE ODREĐIVANJA REDUKTIVNIH SUMPORNIH SPOJEVA U VINU

Darija Đukić, 1249/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je literaturni pregled najvažnijih reduktivnih sumpornih spojeva u vinu te metoda za njihovo određivanje. Također, provedeno je preliminarno istraživanje s ciljem kvalitativnog i kvantitativnog određivanja nekoliko sumpornih spojeva (etantiola, dimetil disulfida, dimetil trisulfida i metionola) uz poseban naglasak na pripremu uzoraka. U istraživanju su navedeni spojevi analizirani primjenom plinske kromatografije s tandem masenom spektrometrijom (GC-MS/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME). Priprema uzorka provodila se u posebnim uvjetima bez prisustva kisika, a identifikacija spojeva provedena je MRM (eng. *multiple reaction monitoring*) načinom rada masenog detektora. Dobiveni rezultati pokazuju da je postupak pripreme uzorka te SPME ekstrakcija koja je prethodila analizi uspješno minimizirala degradaciju hlapljivih sumpornih spojeva. Nadalje, utvrđeno je da je temperaturni program s višom početnom temperaturom (40 °C), s ciljem skraćivanja same metode analize, prikladan za analizu ovih spojeva.

Gljučne riječi: reduktivni sumporni spojevi, GC-MS/MS, MRM, vino

Rad sadrži: 46 stranica, 19 slika, 6 tablica, 58 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić*

Pomoć pri izradi: *doc. dr. sc. Marina Tomašević, Katarina Lukić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Draženka Komes*
2. Prof.dr.sc. *Karin Kovačević Ganić*
3. Prof.dr.sc. *Mara Banović*
4. Prof.dr.sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2020 .

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

METHODS FOR DETERMINATION OF REDUCTIVE SULFUR COMPOUNDS IN WINE

Darija Đukić, 1249/PI

Abstract: The aim of this work was to present an overview of most important reductive sulfur compounds in wine, as well as methods for their determination based on available scientific literature. Also, the preliminary study was conducted in order to qualitatively and quantitatively determine some sulfur compounds (ethanthiol, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide and methionol), with special emphasis on sample preparation. These compounds were analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after solid-phase microextraction (SPME). The preparation of samples was in inert conditions (without oxygen) and the identification of sulfur compounds was conducted by the multiple reaction monitoring (MRM) mode of mass spectrometry detector. The obtained results showed that the applied inert technique of sample preparation along with SPME extraction before GC-MS/MS analysis successfully minimizes the degradation of volatile sulfur compounds. Furthermore, in term of shortening the time of analysis, the temperature program with higher initial temperature (40 °C) showed to be suitable for the analysis of these compounds.

Keywords: reductive sulfur compounds, GC-MS/MS, MRM, wine

Thesis contains: 46 pages, 19 figures, 6 tables, 58 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Karin Kovačević Ganić, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD Marina Tomašević, Assistant professor, Katarina Lukić, mag. ing.*

Reviewers:

1. PhD. *Draženka Komes*, Full professor
2. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
3. PhD. *Mara Banović*, Full professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor

Thesis defended: 23 September 2020

| Sadržaj | stranica |
|--|-----------------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. SUMPORNI SPOJEVI | 2 |
| 2.1.1. Mehanizam nastanka | 2 |
| 2.1.2. Izvor sumpornih prekursora | 4 |
| 2.2. GLAVNI PREDSTAVNICI REDUKTIVNE AROME U VINU | 5 |
| 2.2.1. Sumporovodik | 5 |
| 2.2.2. Dimetil sulfid | 7 |
| 2.2.3. Metantiol | 8 |
| 2.2.4. Etantiol | 9 |
| 2.2.5. Dimetil disulfid i dimetil trisulfid | 10 |
| 2.2.6. Metionol | 11 |
| 2.3. METODE UKLANJANJA REDUKTIVNE AROME | 12 |
| 2.3.1. Dodatak soli | 12 |
| 2.3.2. Mikrooksigenacija | 13 |
| 2.3.3. Postupak dozrijevanja | 13 |
| 2.3.4. Postupci punjenja | 14 |
| 2.3.5. Genetičko inženjerstvo | 15 |
| 2.4. METODE ODREĐIVANJA REDUKTIVNIH SUMPORNIH SPOJEVA U VINU | 15 |
| 2.4.1. Plinska kromatografija | 15 |
| 2.4.2. Metode koncentriranja | 21 |
| 2.4.3. Problematika analize reduktivnih sumpornih spojeva | 23 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 25 |
| 3.1. MATERIJAL | 25 |
| 3.1.1. Uzorci | 25 |
| 3.1.2. Kemikalije | 25 |
| 3.1.3. Instrumenti i pomoćni pribor | 25 |
| 3.2. METODA | 26 |
| 3.2.1. Kromatografski uvjeti analize | 26 |
| 3.2.2. Priprema uzoraka | 27 |
| 3.2.3. Utvrđivanje retencijskih vremena | 28 |
| 3.2.4. Odabir temperaturnog programa | 28 |
| 3.2.5. Utvrđivanje linearnosti metode | 29 |
| 3.2.6. Obrada dobivenih rezultata | 29 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 30 |
| 4.1. RETENCIJSKA VREMENA | 30 |
| 4.2. ODABIR TEMPERATURNOG PROGRAMA | 32 |
| 4.3. IZRADA KALIBRACIJSKIH KRIVULJA | 35 |
| 5. ZAKLJUČAK | 40 |
| 6. LITERATURA | 41 |

1. UVOD

Vino je kompleksni sustav u kojem razina prisutnog kisika ima značajan utjecaj na senzorska svojstva. Pritom mala razina kisika pozitivno djeluje na teksturu i boju vina, no prevelika izloženost vina kisiku dovodi do nepoželjnih promjena u boji, mirisu i okusu vina. Moderan pristup smanjenja negativnog utjecaj kisika na kvalitetu vina je proizvodnja u strogo reduktivnim uvjetima. Međutim, u takvim uvjetima tijekom alkoholne fermentacije i dozrijevanja može doći do razvoja hlapljivih sumpornih spojeva i pojave nepoželjne reduktivne arome, koju karakterizira miris vina po trulim jajima, luku, češnjaku, kupusu i kuhanom povrću. Reduktivna aroma čini jednu četvrtinu otkrivenih mana u komercijalnim vinima.

Hlapljivi sumporni spojevi u vinima se nalaze u niskim koncentracijama, izrazito su osjetljivi na izloženost kisiku i svjetlu te su vrlo reaktivni spojevi. Navedena svojstva znatno otežavaju njihovu kvantitativnu analizu. Pritom se priprema uzorka mora odvijati u posebnim uvjetima bez prisustva kisika (u atmosferi inertnog plina), a zbog niske koncentracije u uzorcima nužno je provesti i određenu metodu ekstrakcije i koncentriranja prije same kvantitativne analize.

Cilj ovog rada bio je literaturni pregled najvažnijih reduktivnih sumpornih spojeva u vinu kao i metoda za njihovo određivanje. Nadalje, provedeno je i preliminarno istraživanje kojem je cilj bio ispitati mogućnost kvalitativnog i kvantitativnog određivanja ovih spojeva primjenom plinske kromatografije s tandem masenim detektorom (GC-MS/MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SUMPORNI SPOJEVI

Hlapljivi sumporni spojevi su male organske molekule, a nositelji su aroma koje utječu na kvalitetu i jedinstvenost vina. U vinima se nalaze u niskim koncentracijama, karakterizira ih niski senzorski prag osjetljivosti te intenzivna aroma. Iako većina sumpornih spojeva ima negativan utjecaj na aromu vina i mošta, određeni sumporni spojevi su nositelji pozitivne sortne arome (Kinzurik i sur., 2015).

Reduktivni sumporni spojevi nositelji su arome luka, češnjaka, kupusa, kuhanog povrća te arome trulih jaja. Njihova prisutnost u koncentracijama iznad pojedinačnih senzorskih pragova osjetljivosti definira se kao mana vina. Većina spojeva ima prag osjetljivosti 1,1-1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Bekker i sur., 2016). Nastaju metabolizmom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i bakterija mliječne kiseline ili kemijskim reakcijama iz nehlapljivih spojeva grožđa ili spojeva iz okoliša (Fracassetti i Vigentini, 2018). U postupku proizvodnje vina nastaju tijekom faza alkoholne fermentacije te starenja i dozrijevanja vina. Reduktivnu aromu vina pretežno čine sljedeći spojevi: sumporovodik, metantioi, etantioi, dimetil sulfid, dimetildisulfid, dimetiltrisulfid, dietilsulfid, dietildisulfid, metionol te metional (Bakker i Clark, 2012).

Prema strukturi dijele se u 5 različitih skupina: tioli, sulfidi, polisulfidi, tioesteri i heterociklički sumporni spojevi. Tioli imaju zamijenjenu hidroksilnu skupinu (-OH) sa sulfhidrilnom skupinom (-SH). Jednostavni tioli sadrže jednu zamijenjenu sulfhidrilnu skupinu, a različitim povezivanjima nastaju disulfidi (-S-S-) i trisulfidi (-S-S-S-). S obzirom na temperaturu vrelišta mogu se podijeliti na lako hlapljive i teže hlapljive spojeve. Lako hlapljivi sumporni spojevi isparavaju na temperaturama nižim od 90 °C. Primjer takvog spoja je dimetil sulfid. Teže hlapljivi sumporni spojevi isparavaju na temperaturama višim od 90 °C i u ovu kategoriju pripada metantioi. Obje prethodno navedene skupine odgovorne su za reduktivnu aromu vina. Podjela prema temperaturi vrelišta češće se primjenjuje jer olakšava odabir i provedbu odgovarajuće analitičke tehnike (Bakker i Clark, 2012).

2.1.1. Mehanizam nastanka

Hlapljivi sumporni spojevi mogu nastati enzimskim i neenzimskim putem. U enzimatskom mehanizmu djelovanjem kvasca i bakterija nastaju kao produkti metaboličke aktivnosti i fermentacijskih puteva aminokiselina sa sumporom ili prisutnih pesticida koji u svojem sastavu

sadrže spojeve sa sumporom (Fracassetti i Vigentini, 2018). Tijekom fermentacije mošta u kojem je zaostala određena količina sumpornih pesticida metabolizmom kvasca nastaje sumporovodik (H_2S), ugljikov disulfid (CS_2) te tioli koji su skloni oksidaciji u disulfide (Mestres i sur., 2000). Tijekom starenja i dozrijevanja vina reduktivni spojevi nastaju neenzimskim mehanizmom uslijed fotokemijskih, termokemijskih i drugih kemijskih reakcija. Nastaju hidrolizom tioacetata i tioestera, redukcijom disulfida, reakcijama između aminokiseline cisteina i α -dikarbonila u vinu te metal kataliziranim reakcijama. Pritom metalni ioni (Cu^{2+} i Fe^{2+}) kataliziraju reakcije redukcije sulfata i sulfita te dezaminacije aminokiselina sa sumporom (Franco-Luesma i Ferreira, 2016a).

Jabučno- mliječna fermentacije provodi se nakon alkoholne fermentacije u svrhu pretvorbe jabučne kiseline u mliječnu kiselinu. Posljedično dolazi do poboljšanja organoleptičkih karakteristika vina zbog mekšeg i zaobljenijeg okusa. Provode ju bakterije iz roda *Lactobacillus*, *Oenococcus* i *Pediococcus*, a najznačajnija je *Oenococcus oeni*. Zbog bakterijske sposobnosti metaboliziranja aminokiseline metionina uz sintezu metantiola, dimetil disulfida te metinonola, tijekom jabučno- mliječne fermentacije također može doći do razvoja reduktivne arome (Rauhut i Kiene, 2019).

Reduktivna aroma se može pojaviti i tijekom starenja čistih vina, odnosno vina kod kojih prije ove faze senzorski nije utvrđeno prisustvo hlapljivih sumpornih spojeva. U bijelim vinima udio sumporovodika može se povećati tri do četiri puta u odnosu na početnu koncentraciju tijekom šestomjesečnog skladištenja u bocama. Stupanj povećanja ovisi o sastavu vina te uvjetima skladištenja. Tijekom dozrijevanja vina, koncentracija dimetil sulfida, metionala, dietil sulfida i dietil disulfida se povećava, a određeni čimbenici poput povišene temperature skladištenja dodatno to pospješuju (Ugliano, 2013). U tablici 1 prikazani su najčešći hlapljivi sumporni spojevi, faza proizvodnje u kojoj nastaju te faktori koji pospješuju njihovu sintezu.

Tablica 1. Reduktivni sumporni spojevi u vinu i uvjeti njihove sinteze (Ugliano i sur., 2012)

| <i>Spoj</i> | <i>Faza proizvodnje</i> | <i>Faktori utjecaja</i> |
|----------------------------------|-------------------------|---|
| <i>Sumporovodik</i> | Fermentacija | Metabolička aktivnost kvasca, nedostupnost dušika, izvor sumpora, zamućenost mošta |
| <i>Merkaptani</i> | | Metabolička aktivnost kvasca, nedostupnost dušika i drugi neutvrđeni čimbenici |
| <i>Sumporovodik i merkaptani</i> | Nakon fermentacije | Odležavanje na kvascu, stupanj izloženosti kisiku |
| <i>Sumporovodik i merkaptani</i> | Dozrijevanje i starenje | Prisustvo prekursora, izloženost kisiku i drugi nepoznati čimbenici |
| <i>Dimetil sulfid</i> | | Koncentracija prekursora i temperatura skladištenja |

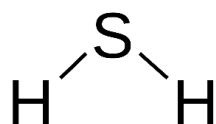
2.1.2. Izvor sumpornih prekursora

Prekursori hlapljivim sumpornim spojevima su sumporni spojevi prisutni u grožđu te vanjski izvori sumpora iz vinograda. Anorganski sulfat je glavni izvor sumpora u grožđu te njegova koncentracija najviše ovisi o mineralnom sastavu tla vinograda. Ostali izvori sumpora su vitamini tiamin i biotin, aminokiseline metionin i cistein, peptidi i tripeptidi. Tretman vinograda sumpornim pesticidima te elementarnim sumporom zbog zaštite od rasta plijesni i korova također može biti potencijalni izvor sumpora. Osim toga upotreba sumporovog dioksida (SO₂) ili kalij metabisulfita tijekom proizvodnje u svrhu zaštite od mikrobiološkog kvarenja i oksidacije također su dodatni izvor sumpornih prekursora. Nadalje, produljeno odležavanje vina na talogu kvasca pospješuje razvoj hlapljivih sumpornih spojeva uslijed autolize stanica kvasca (Smith i sur., 2015).

2.2. GLAVNI PREDSTAVNICI REDUKTIVNE AROME U VINU

2.2.1. Sumporovodik

Sumporovodik (slika 1) je najprepoznatljiviji i najistraženiji predstavnik reduktivne arome vina. Iako u malim koncentracijama doprinosi kompleksnosti arome, u višim koncentracijama uzrokuje negativnu aromu vina po trulim jajima. Ima niski senzorski prag osjetljivosti ($10\text{--}80 \mu\text{g L}^{-1}$) i visoku reaktivnost. U vinima nastaje tijekom dvije faze: alkoholne fermentacije i starenja vina u bocama, pri čemu je sam biosintetski put tijekom alkoholne fermentacije u potpunosti razjašnjen (Bekker i sur., 2016).

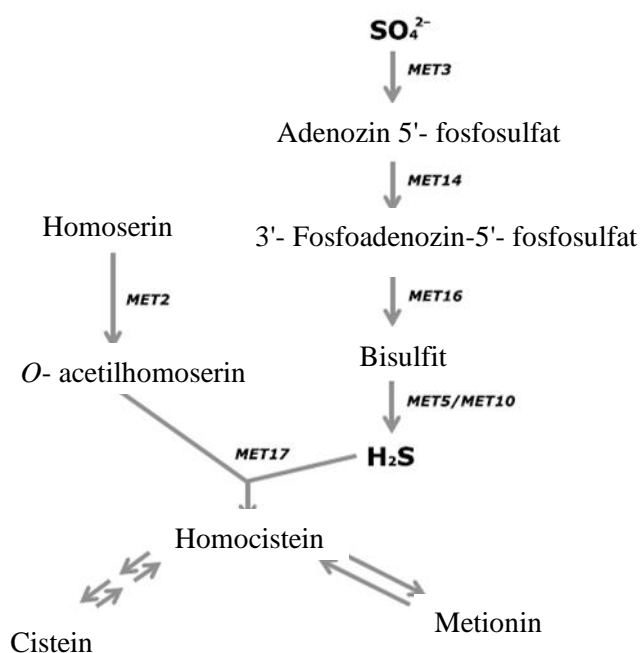


Slika 1. Sumporovodik (ACS, 2015)

Metabolička sinteza sumporovodika potaknuta je prisustvom anorganskog sumpora, sulfata, sulfita te organskih spojeva koje sadrže sumpor (aminokiselina cistein i tripeptid glutation). Količina nastalog sumporovodika ovisi o aktivnosti kvaščeve sulfit reductaze te njegove sposobnosti za trošenje dostupnog dušika (Franco-Luesma i Ferreira, 2016b). Tek 1 % prirodno prisutnih kvasaca nema sposobnost sinteze sumporovodika. Osim prisutnosti prekursora za sintezu sumporovodika važan je utjecaj okoliša, nutritivno stanje mošta i vina te dostupnost dušika. Najveći dio sumporovodika nastaje tijekom alkoholne fermentacije kao nusprodukt sinteze aminokiselina metionina i cisteina (Cordente i sur., 2012).

Grožđe sadrži veliku količinu sulfata ($160\text{--}700 \text{ mg L}^{-1}$), te puno manju koncentraciju aminokiselina cisteina i metionina ($< 20 \text{ mg L}^{-1}$) (Huang i sur., 2017). S obzirom na to da su aminokiseline neophodne za rast stanica kvasca *S. cerevisiae*, u slučaju da nisu prirodno prisutne u moštu kvasac ih sintetizira pomoću sulfat reducirajućeg metaboličkog puta prikazanog na slici 2. Ekstracelularni sulfat se transportira u stanicu pomoću specifičnih transportnih proteina uz utrošak 2 molekule ATP-a. Redukcijom sulfata nastaju sulfiti koji se naknadno reduciraju do sulfida. Uz formiranje sulfida, nastaju i dušični prekursori *O*-acetil serin i *O*-acetil homoserin, koji su važni za sintezu aminokiselina. Nedostatak asimilirajućeg dušika u moštu smanjuje nastanak dušičnih prekursora i posljedično se nakupljeni sulfidi konvertiraju u sumporovodik koji iz stanica kvasca prelazi u vino (Cordente i sur., 2012).

Neenzimatski put sinteze sumporovodika odvija se redukcijom elementarnog sumpora podrijetlom iz primijenjenih pesticida (Franco-Luesma i Ferreira, 2016b).



Slika 2. Prikaz sulfat reducirajućeg metaboličkog puta. Gen MET 2 kodira sintezu enzima homoserin transacetilaze, gen MET3 kodira sintezu enzima adenozin trifosfat sulfurilaze, gen MET5/MET 10 kodira sintezu enzima sulfit reduktaze (α i β podjedinice), gen MET 14 kodira sintezu enzima adenozin 5'-fosfosulfat (APS) kinaze, gen MET 16 kodira sintezu enzima 3'- Fosfoadenozin-5'- fosfosulfat (PAPS) reduktaze, gen MET 17 kodira sintezu enzima O-acetilhomoserin sulfhidrilaze (Kinzurik i sur., 2016).

Koncentracija sumporovodika tijekom alkoholne fermentacije se mijenja. Lako je hlapljiv spoj, stoga većina nastalog spoja ishlapi s ugljikovim dioksidom tijekom fermentacije. U ovoj fazi koncentracija sumporovodika može biti i do 1 mg L^{-1} , no na kraju fermentacije se mjeri u $\mu\text{g L}^{-1}$ (Jastrzembski i sur., 2017). Zaostali dio sumporovodika, zbog svoje velike reaktivnosti, ulazi u naknadne reakcije s drugi prisutnim spojevima i posljedično nastaju etantiol, dietil disulfid i drugi neželjeni hlapljivi sumporni spojevi. Tako nastali spojevi nositelji su negativne arome po kuhanom povrću, a zbog tvorbe disulfidnih veza i manje reaktivnosti teže se uklanjaju iz vina (Kinzurik i sur., 2020; Kinzurik i sur., 2016).

S druge strane njegov reakcijski put nastanka u fazi starenja u bocama još uvijek nije razjašnjen. Poznato je tek da određeni uvjeti skladištenja i smanjena koncentracija kisika tijekom fermentacije pozitivno djeluju na njegovu biosintezu (Bekker i sur., 2016). Njegova sinteza u

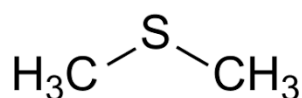
ovoj fazi velik je problem proizvođačima jer nije poznata niti jedna tehnika njegovog uklanjanja iz buteljiranog vina. Tijekom starenja povećanje koncentracije sumporovodika u buteljiranim vinima odvija se većinom uslijed oslobađanja sumporovodika iz reverzibilnih kompleksa s metalnim ionima (Cu^{2+} , Fe^{2+} i Zn^{2+}) (Vela i sur., 2017; Franco-Luesma i Ferreira, 2016b).

Manji dio sumporovodika tijekom dozrijevanja sintetizira se iz prekursora, odnosno aminokiselina cistein te tripeptid glutation. Bakrovi ioni (Cu^{2+}) kataliziraju reakciju sinteze sumporovodika iz nepoznatih prekursora prisutnih u bijelom vinu. U crnim vinima utvrđeno je manje povećanje sumporovodika. Razlog tome je prisustvo veće koncentracije polifenola, kinona i tanina, zbog čega se sumporovodik povezuje u disulfidne komplekse s cisteinom i glutationom (Bekker i sur., 2018).

2.2.2. Dimetil sulfid

Dimetil sulfid (slika 3) je lako hlapljivi sumporni spoj koji nastaje tijekom alkoholne fermentacije. Doprinosi negativnoj aromi po šparogama, kukuruzu, melasi i zelenim maslinama (Rauhut i Kiene, 2019). Osim u vinima dimetil sulfid prisutan je i u kuhanom mesu, siru, citrusima, rajčici te pivu (Lytra i sur., 2016). Senzorski prag osjetljivosti dimetil sulfida iznosi $27 \mu\text{g L}^{-1}$ (Belda i sur., 2017).

Njegova percepcija u vinu ne ovisi samo njegovoj koncentraciji nego i o sastavu vina. Prisutnost dimetil sulfida ne mora nužno biti negativna. U određenim vrstama vina poput vina Syrah i Cabernet Sauvignon u manjim koncentracijama doprinosi kompleksnosti voćne arome, dok u vinima Porto naglašava aromu tartufa (Ye i sur., 2016). Doprinos voćnoj aromi vina rezultat je kompleksnih interakcija s ostalim hlapljivim spojevima, odnosno prisutnim esterima i norizoprenoidima. Međutim, pozitivan doprinos nije utvrđen kod bijelih vina (Robinson i sur., 2013).



Slika 3. Dimetil sulfid (Clark, 2018)

Tijekom alkoholne fermentacije dimetil sulfid nastaje iza aminokiselina sa sumporom djelovanjem metabolizma kvasaca. Kao što je prethodno istaknuto lako je hlapljiv spoj zbog čega većina nastalog spoja izlazi iz fermentora s ostalim nastalim plinovima, prvenstveno

ugljkovim dioksidom. Stoga je u mladim vinima njegova koncentracija niska, ispod senzorskog praga osjetljivosti i ne detektira se kao mana vina (Ye i sur., 2016).

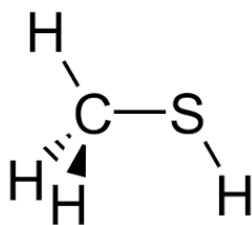
Faktori koji utječu na sintezu ovog spoja tijekom fermentacije su sastav grožđa, agrotehnički i vinifikacijski postupci te pH vina. Osim toga, važna je prisutnost kisika te iona metala (bakra, željeza i mangana) tijekom fermentacije (Bekker i sur., 2018).

U post fermentacijskoj fazi nastaje redukcijom dimetil sulfoksida, a tijekom starenja u boci dolazi do povećanja njegove koncentracije primarno iz prekursora *S*-metil metionina. Smatra se da otprilike 70 % nastalog dimetil sulfida nastaje razgradnjom ovog prekursora (Ye i sur., 2016). Raspon koncentracije *S*-metil metionina u grožđu je velik i može biti prisutan u koncentracijama od nekoliko $\mu\text{g L}^{-1}$ pa do 5 g L^{-1} . Osim toga, ovaj prekursor može nastati u vinu i metilacijom metionina (Smith i sur., 2015).

Korišteni spremnici utječu na razinu njegovog nastajanje tijekom dozrijevanja. Manje povećanje utvrđeno je kod dozrijevanja vina u hrastovim bačvama nego kod dozrijevanja u spremnicima od nehrđajućeg čelika. Također, dodatak tostiranih čipseva rezultirao je smanjenjem razine njegova nastanka u ovoj fazi. Iako mala izloženost kisiku te doticaj vina s dužicama bačve ne utječe direktno na nastajanje dimetil sulfida, tijekom prirodne mikrooksigenacije dolazi do brojnih fizikalno-kemijskih procesa koji mogu rezultirati inhibicijom sinteze iz prekursora *S*-metil metionina ili njegove degradacije. Mehanizam nastanka dimetil sulfida tijekom dozrijevanja vina još uvijek nije razjašnjen (Ye i sur., 2016).

2.2.3. Metantiol

Metantiol (slika 4) je sumporni spoj niskog praga osjetljivosti koji doprinosi reduktivnoj aromi vina. Senzorski prag osjetljivosti metantiola je $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$, a opisuje se kao aroma kuhanog kupusa i ostalog povrća (Belda i sur., 2017). Glavni prekursori sinteze ovog spoja su aminokiselina metionin, metil tioacetat i dimetil disulfid. Stoga, mošt s velikim udjelom aminokiseline metionina pogodan je za sintezu velikog udjela nepoželjnog metantiola tijekom alkoholne fermentacije. Osim toga, ovaj spoj nastaje u različitim oblicima: u slobodnom obliku, slabo vezan za ione metala te kao kompleksi s tiolima u buteljiranim vinima (Bekker i sur., 2018).



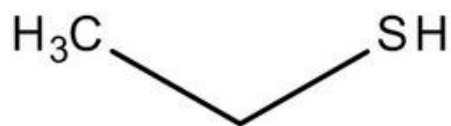
Slika 4. Metantiol (Anonymous 1, 2020)

U prvoj fazi alkoholne fermentacije kvašćevim metabolizmom aminokiselina, metionin se preko keto međuprodukta provodi u metantiol. Reakciju katalizira enzim demetilaza (Belda i sur., 2017). Međutim, najveće povećanje koncentracije metantiola primijećeno je tijekom prvih 6-12 mjeseci dozrijevanja. Sinteza metantiola iz prekursora metil tioacetata značajnije se odvija u bijelim vinima zbog manje koncentracije polifenolnih spojeva koji mogu reagirati s tioacetatima i spriječiti nastanak menatiola. Udio kisika u vinu u ovoj fazi ključan je za sintezu metantiola. Utvrđeno je da vino s otprilike 7 mg L^{-1} kisika karakterizira slabije povećanje metantiola tijekom skladištenja (Ugliano, 2013). Oksidacijom metantiola nastaje dimetil sulfid. S obzirom na to da je senzorski prag osjetljivosti dimetil sulfida 60 puta veći od onog kod metantiola, posljedica oksidacije metantiola je uklanjanje neugodne arome (Belda i sur., 2017).

2.2.4. Etantiol

Etantiol (slika 5) karakterizira senzorski prag osjetljivosti od $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ i aroma po luku, gumi i truljenju. Prvenstveno nastaje u fazi dozrijevanja vina iz etil tioacetata. Tioacetati imaju viši senzorski prag osjetljivosti i ne detektiraju se u vinima prije punjenja, no važni su prekursori reduktivne arome. Tijekom starenja u bocama prisutni reduktivni uvjeti omogućavaju njihovu hidrolizu u odgovarajuće tiole nižeg senzorskog praga osjetljivosti. Na ovu sintezu utječe pH vrijednost vina te prisustvo bakrovih iona kao katalizatora. Kiselinska hidroliza tioacetata (metil i etil tioacetata) smanjena je u prisustvu bakrovih iona. S druge strane niža pH vrijednost vina pozitivno utječe na sintezu tiola iz tioacetata (Bekker i sur., 2018).

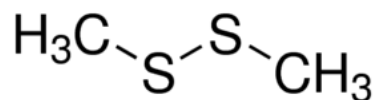
Etantiol može nastati i kao rezultat interakcije sumporovodika s etanolom i acetaldehidom. Naknadnom pregradnjom, etantiol se prevodi u dietil disulfid, *S*-etil tioacetat i *S*-metil tioacetat koji su također nositelji arome po trulom povrću (Kinzurik i sur., 2016).



Slika 5. Etanol (Bekker i sur., 2018)

2.2.5. Dimetil disulfid i dimetil trisulfid

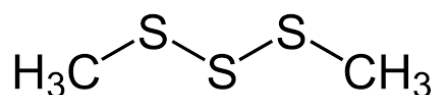
Dimetil disulfid (slika 6) je nositelj arome po kuhanom povrću i luku, a senzorski prag osjetljivosti mu je 20-45 $\mu\text{g L}^{-1}$. Prvenstveno nastaje u fotokemijskim reakcijama tijekom starenja vina punjenih u prozirne boce uslijed kontakta svjetla s određenim fotosenzibilnim spojevima u vinu (Fracasetti i sur., 2019).



Slika 6. Dimetil disulfid (Anonymous 2, 2020)

Vitamin riboflavin iz grožđa dospijeva u vino i njegova koncentracija se povećava tijekom alkoholne fermentacije zbog metaboličkog djelovanja kvasca. Svjetlo potiče pomak riboflavina u triplet stanje te u tom stanju sudjeluje u brojnim foto-induciranim reakcijama i posljedično mijenja sastav hlapljivih spojeva, boje i okusa vina u bocama. Triplet riboflavin je snažan oksidans i reagira s aminokiselinom metionin. Fotokemijskom oksidacijom metionina nastaje metional, spoj nestabilan na svjetlu. Degradacijom fotosenzibilnog metionala nastaju akrolein i metantiol. Povezivanjem metantiola nastaje dimetil disulfid (Fracasetti i sur., 2019).

Osim dimetil disulfida povezivanjem metantiola nastaje dimetil trisulfid (slika 7). Nositelj je arome po kupusu, luku, kuhanom povrću te zemljanim nota. Senzorski prag osjetljivosti dimetil trisulfida je 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fracasetti i Vigentini, 2018).



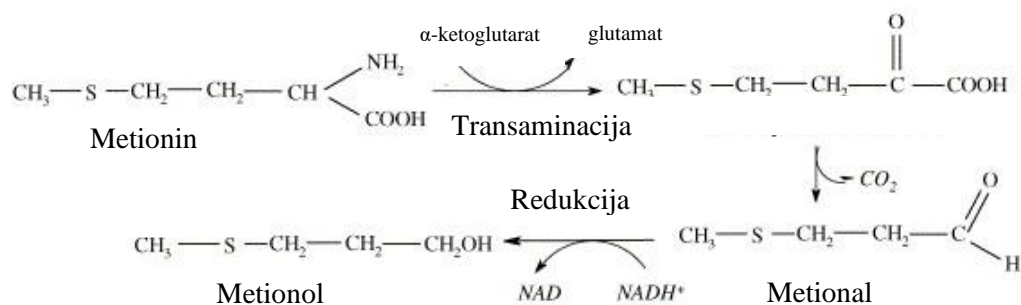
Slika 7. Dimetil trisulfid (Anonymous 3 , 2020)

Reduktivni uvjeti pojačavaju sintezu metantiola, dimetil disulfida i dimetil trisulfida. Koncentracija proizvedenog metantiola i dimetil trisulfida je šest puta veća od koncentracije nastale uz prisustvo kisika. Pritom reduktivni uvjeti imaju najveći utjecaj na sintezu dimetil disulfida pri čemu povećanje njegove koncentracije u takvim uvjetima može biti i do 86 puta. Kisik stabilizira riboflavin te potiče sintezu stabilnih metionin sulfoksida i ostalih oksidativnih oblika metionina. Nadalje, dodatak hidrolizirajućih tanina inhibira oksidaciju metionala i metantiola do dimetil trisulfida. Kinoni lako stupaju u reakciju s metantiolom i onemogućavaju nastanak dimetil disulfida i dimetil trisulfida (Fracassetti i sur., 2019).

Nastanak ove reakcije sprječava se smanjenjem koncentracije riboflavina u bijelim vinima. Poželjno je da njegova koncentracija nije viša od 80-100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Pritom se primjenjuju sojevi kvasca s nižom sposobnosti sinteze riboflavina te kontrolirani tretman vina adsorpcijskim sredstvima poput bentonita ili aktivnog ugljena. Međutim, takva sredstva mogu ukloniti i poželjne aromatične spojeve i negativno utjecati na aromu vina (Fracassetti i sur., 2019).

2.2.6. Metionol

Prisustvo veće koncentracije metionola u vinu uzrokuje pojavu arome po sirovom krumpiru i cvjetači. Prisutan je u koncentracijama do 5 mg L^{-1} , a senzorski prag osjetljivosti mu je 1,2 mg L^{-1} . Nastaje metaboličkom aktivnosti kvasca *S. cerevisie* te bakterija *O. oeni*. Povišena temperatura i veća količina kisika pozitivno djeluju na njegovu sintezu. U takvim uvjetima metionol nastaje reakcijama tzv. Streckerove degradacije aminokiseline metionina uz prisustvo dikarbonila (slika 8). Osim toga, nastaje i peroksidacijom (Robinson i sur., 2013). Tijekom jabučno-mliječne fermentacije metionol nastaje djelovanjem bakterija *O. oeni* redukcijom i oksidacijom metionala (Vallet i sur., 2009).



Slika 8. Mehanizam sinteze metionola (Perestrelo i sur., 2006)

Sinteza metionola povezana je s dostupnosti dušika i sumpora. Dodatak anorganskog dušika u obliku diamonijeva hidrogenfosfata (DAP) može smanjiti ukupnu koncentraciju hlapljivih sumpornih spojeva, uključujući i metionol. Metionol se može sintetizirati preko α -keto kiseline nastale tijekom glikolize. Nastala keto kiselina se dekarboksilacijom prevodi u metional. Enzimskom redukcijom metionala nastaje metionol. Osim navedenog metionol se može sintetizirati Ehrlichovim metaboličkim putem. Ovaj metabolički put uključuje deaminaciju aminokiseline metionina u odgovarajuću keto kiselinu koja se potom prevodi u metionol prema gore navedenom mehanizmu. Stoga, dodatak metionina prije alkoholne fermentacije pospješuje sintezu metionola, a njegova konačna koncentracija može se, dakle, kontrolirati početnom koncentracijom metionina te dostupnosti dušika u moštu (Robinson, 2013).

2.3. METODE UKLANJANJA REDUKTIVNE AROME

2.3.1. Dodatak soli

Dodatak diamonijevog fosfata ili drugih dušičnih nutrijenata za rast kvasca rezultira povećanjem dostupnog dušika i samim time se onemogućava sinteza sumporovodika. U prisustvu dovoljne količine dostupnog dušika odvija se sinteza dušičnih prekursora potrebnih za neometanu sintezu aminokiseline sa sumporom (cisteina i metionina). Dodatak amonijeve soli provodi se prije ili na početku alkoholne fermentacije (Smith i sur., 2015).

Tretman vina s metalnim ionima je još jedna popularna metoda uklanjanja ove mane vina. Najčešće se primjenjuje bakrov sulfat koji reagira s tiolima poput sumporovodika i menantiola, ali ne uzrokuje uklanjanje prisutnih disulfida, tioacetata i cikličkih sumpornih spojeva. Također, reagira sa sortnim tiolima pa može i nepovoljno utjecati na kvalitetu vina zbog smanjenja sortnog karaktera. Dodatak bakrovih i srebrovih iona u vino s povišenom

koncentracijom sumporovodika uzrokovat će pojavu taloga (bakrovog i srebrovog sulfida). Bakrov sulfat se može dodati prije punjenja vina u boce u svrhu zaštite vina od naknadnog stvaranja reduktivne arome. Dodaje se u optimalnoj količini jer suvišak bakrovih iona u bocama može potaknuti suprotni efekt i dovesti do naknadnog povećanja koncentracije hlapljivih sumpornih spojeva (Smith i sur., 2015). Zbog navedenog potencijalnog negativnog djelovanja, primjena bakrovog sulfata može se zamijeniti kontroliranom aeracijom, odnosno mikrooksigenacijom.

2.3.2. Mikrooksigenacija

Mikrooksigenacija je postupak u kojem se vino opskrbljuje malom kontroliranom količinom kisika kroz određeni vremenski period. Omogućava stabilizaciju boje crnog vina i stvaranje mekšeg okusa i osjeta u ustima. Važno je odrediti pravovremeno vrijeme i brzinu doziranja kisika (McRae i sur., 2015). Koristi se za stimulaciju dozrijevanja vina u hrastovim bačvama kada se taj postupak provodi u spremnicima od nehrđajućeg čelika. Primjenom tog postupka potiče se formiranje kinona koji se povezuju s tiolima i oksidira ih u sulfide i polisulfide s višim senzorskim pragom osjetljivosti. Pozitivan utjecaj pospešuje se obradom vina smjesom plinova (60 % kisika, 40 % dušika). Ipak u vinu mogu zaostati prekursori koji u određenim uvjetima tijekom starenja u bocama mogu formirati hlapljive sumporne spojeve (Smith i sur., 2015).

Propuštanje zraka tijekom fermentacije uzrokovat će smanjenje metantiola i etantiola, ali neće utjecati na koncentracije dimetil disulfida i dietil disulfida. Koncentracija kisika u vinu u trenutku punjenja utječe na razvoj hlapljivih sumpornih spojeva tijekom starenja. Pritom najveći utjecaj ima na sintezu sumporovodika, metantiola te dimetil sulfida (Smith i sur., 2015).

Kisik, osim direktnog djelovanja na uklanjanje reduktivne arome, stvara povoljne uvjete i za njihovo uklanjanje. Povećava aktivnost kvasaca i rezultira formiranjem sumpornih spojeva većih molekulskih masa s višim senzorskim pragom osjetljivosti (Smith i sur., 2015). Pritom je važno istaknuti kako je kontrolirana aeracija ključna jer prevelika izloženost kisiku dovodi do posmeđivanja bijelog vina te aktivacije bakterija octene kiseline kod crnih vina, odnosno do oksidacije vina (Viviers i sur., 2013).

2.3.3. Postupak dozrijevanja

Koncentracija sumporovodika i metantiola nastalih tijekom alkoholne fermentacije smanjuje se tijekom dozrijevanja u hrastovim bačvama. Smanjenje je značajnije ako se koriste novije

bačve s većom propusnosti kisika i većom koncentracijom elagitanina iz bačve. Enzim sulfid reduktaza, odgovoran za sintezu sumporovodika, aktivan je još četiri tjedna nakon fermentacije i zbog toga dodatak sumporovog dioksida nakon fermentacije može uzrokovati novu sintezu sumporovodika. U slučaju produljenog odležavanja vina na talogu potrebno je taj postupak provoditi u novim hrastovim bačvama ili talog izdvojiti i nakon mjesec dana ponovno dodati u vino. U tom periodu dolazi do inaktivacije sulfid reduktaze i smanjenja mogućnosti nastanka novih hlapljivih sumpornih spojeva. Osim toga, stanice kvasca imaju sposobnost vezanja tiola na svoje manoproteine stanične membrane pri čemu tijekom aeracije dolazi do nastanka disulfidnih veza između cisteina manoproteina membrane kvasca i slobodnih tiola (Rauhut i Kiene, 2019).

2.3.4. Postupci punjenja

Vrsta zatvarača utječe različito na razvoj pojedinih spojeva reduktivne arome vina tijekom starenja u bocama: ne utječe na sintezu dimetil sulfida, metantiola i etantiola, no reduktivni uvjeti starenja potiču hidrolizu tioacetata do pripadajućih tiola. Hidrolizom metil tioacetata nastaje metantiole, a hidrolizom etil tioacetata etantiole (Qian i sur., 2014). Pluteni čepovi najčešće se primjenjuju za zatvaranje vinskih boca te imaju veću propusnost kisika u boce tijekom starenja. Pritom čisti pluteni čepovi imaju veću propusnost kisika od aglomeriranih plutinih čepova, no manju od sintetskih plutinih čepova (Jackson, 2020). S obzirom na to da je metantiole osjetljiv na zrak i jako reaktivan, dolazi do značajnog smanjenja njegove koncentracije u prvih 6 mjeseci dozrijevanja. Posljedično, čepovi koji imaju veću propusnost zraka doprinose manjoj koncentraciji metantiola u vinu. Kroz 12 mjeseci dozrijevanja metantiole se u potpunosti razgradi. Također, takvi čepovi uzrokuju smanjenje sumporovodika u vinu. Najveće smanjenje sumporovodika uočeno je nakon 24 mjeseca starenja vina. S druge strane, navojne zatvarače karakterizira niža propusnost kisika te njihovom upotrebom se potencijalno pogoduje razvoju reduktivnih uvjeta, odnosno sintezi spojeva reduktivne arome (Qian i sur., 2014).

Punjenje vina u boce neprozirnog stakla također umanjuje razvoj reduktivne arome. Tako je onemogućena fotokemijska oksidacija spojeva vina koja uzrokuje nastanak metantiola, dimetil disulfida te sumporovodika (Fracassetti i sur., 2019).

2.3.5. Genetičko inženjerstvo

Primjena genetičkog inženjerstva također ima budućnost u rješavanju problematike reduktivnih aroma. Genetičkim preinakama može se utjecati na metabolizam kvasca, odnosno na smanjenje proizvodnje sumporovodika. Sam princip genetičkog inženjerstva temelji se na inaktivaciji gena uključenih u sulfat reducirajući metabolički put. Enzim sulfit reduktaza, građen je od dvije podjedinice α - i β -. Na α -podjedinicu se djeluje promjenom MET 10 gena, dok na β -podjedinicu promjenom MET 5 gena. Inaktivacija MET 10 gena već se primjenjuje kod proizvodnje pivskog kvasca u svrhu smanjenje proizvodnje sumporovodika i stabilizacije arome. Iako je utvrđeno da je djelovanjem na MET10 gen moguće ostvariti smanjenje proizvedenog sumporovodika, široka primjena ove tehnike u vinarstvu se još uvijek istražuje (Cordente i sur., 2012).

2.4. METODE ODREĐIVANJA REDUKTIVNIH SUMPORNIH SPOJEVA U VINU

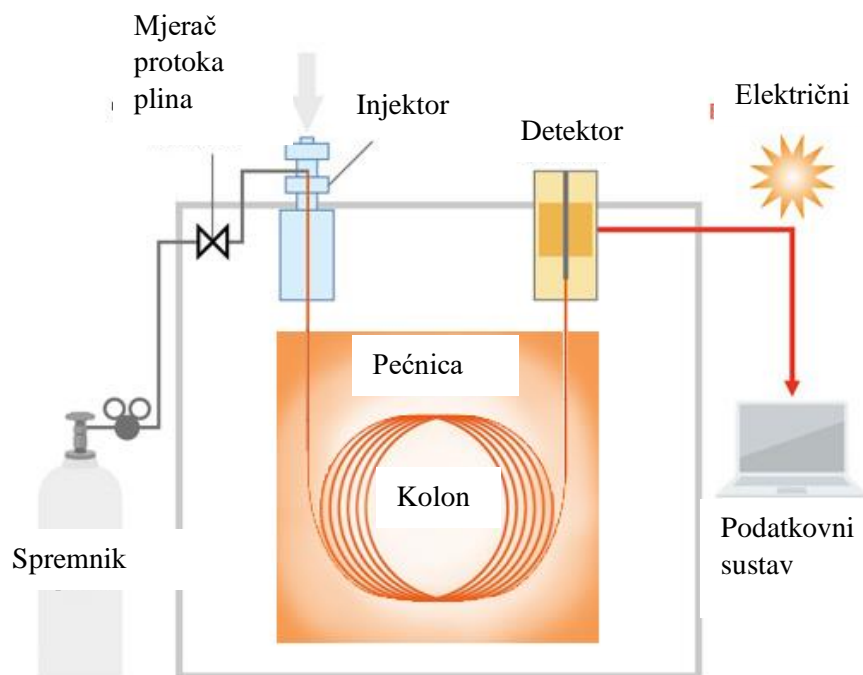
Hlapljivi sumporni spojevi u vinu se nalaze u malim koncentracijama (mg L^{-1} ili $\mu\text{g L}^{-1}$). Osim toga, zbog kompleksnosti sustava vina, njihove fotosenzibilnosti te reaktivnosti s ostacima metala i kisika, detektiranje i proučavanje mehanizma nastanka ovih spojeva je otežano. Razvojem djelotvornijih ekstrakcijskih i preciznijih analitičkih metoda te softiciranih sustava plinske kromatografije s osjetljivim sumpornim detektorima omogućeno je dobivanje više informacija o njihovoj biosintezi i prisutnosti u vinu (Robinson i sur., 2013). Važno je da je primijenjena metoda visoko osjetljiva, specifična i pouzdana.

Spojevi reduktivne arome vina najčešće se analiziraju upotrebom statičke *headspace* analize mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME, eng. *solid-phase microextraction*) u kombinaciji s plinskom kromatografijom (GC, eng. *gas chromatography*) s primjenom različitih detektora. Moguća je također i primjena dinamičke *headspace* analize (Fracassetti i Vigentini, 2018). Vrlo dobri rezultati dobiveni su upotrebom SPME-GC-MS analize u kojoj su selektivnost i osjetljivost postignuti praćenjem specifičnih iona. Dodatno poboljšanje analize postiže se tandem masenom spektrometrijom te identifikacija spojeva primjenom MRM (eng. *multiple reaction monitoring*) načina rada masenog detektora. Provedbom ove metode uspješno je detektirano 27 hlapljivih sumpornih spojeva vina (Slaghenaufi i sur., 2017).

2.4.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC) je kromatografska metoda separacije i kvalitativne identifikacije hlapljivih sastojaka složenih smjesa. Temelji se na principu raspodjele rasplinjenih sastojaka

smjese između stacionarne i mobilne faze. Mobilna faza je plin, a stacionarna faza može biti tekuća ili kruta tvar vezana na čvrsti nosač kemijskom vezom ili adsorpcijom. S obzirom na stacionarnu fazu plinska kromatografija može biti plinsko-adsorpcijska kromatografija (GSC, eng. *gas-solid chromatography*) s krutim adsorbensom ili plinsko- tekućinska kromatografija (GLC, eng. *gas-liquid chromatography*) s tekućom stacionarnom fazom. Mobilna faza je inertni plin koji ne reagira s molekulama analita i ima funkciju njegovog transporta kroz zagrijanu kolonu. Najčešće se primjenjuje argon, helij ili dušik. Uzorak mora biti stabilan na temperaturama provedbe analize, odnosno na temperaturama potrebnim da se uzorak prevede u hlapljivo stanje. Kromatografski sustav (slika 9) sastoji se od injektora, kolone, detektora, podatkovnog sustava te spremnika plina nosača i regulatora protoka (Feng i sur., 2019).



Slika 9. Sustav plinske kromatografije (Anonymous 4 , 2020)

Princip rada plinske kromatografije sastoji se od injektiranja pripremljenog uzorka u kromatografsku kolonu. Pritom je važno istaknuti kako temperatura kolone mora biti bar 30 °C viša od temperature vrelišta najmanje hlapljivog analita. Na taj način se osigurava trenutno isparavanje uzorka. Mobilna faza (inertni plin) provodi uzorak kroz zagrijanu kolonu gdje se analit raspodjeljuje između plinovite mobilne faze i imobilizirane stacionarne faze ovisno o

svojim fizikalno-kemijskim svojstvima. Na izlasku iz kolone je detektor koji promjene prevodi u električni signal u obliku kromatograma (Barišić, 2017).

Plinska kromatografija ima široku primjenu jer omogućava preciznu analizu brojnih komponenti hrane. Naime, ima visoku osjetljivost, rezoluciju, preciznosti i selektivnost te široki raspon koncentracija. Stoga je postala najčešća tehnika u analitičkim laboratorijima kojom se određuje kvaliteta pojedinog proizvoda. Podložna je inovativnim proširenjima poput multidimenzionalne GC (GC-GC) s većom separacijskom sposobnosti (Feng i sur., 2019).

Priprema uzorka za GC analizu ovisi o karakteristikama samog uzorka, ali i spojeva koji se analiziraju. Pojedine pripreme su jednostavne i uključuju razrjeđivanje analita u odgovarajućem otapalu, no priprema uzorka može biti iznimno složena i uključivati višestruke ekstrakcije. Kvaliteta pripremljenog uzorka ima veliki značaj na konačni rezultat analize (Feng i sur., 2019).

Prednosti i nedostaci analize

Plinska kromatografija ima široku primjenu u analizama prehrambenih proizvoda te u naftnoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Prednost primjene plinske kromatografije je brza, efikasna i precizna metoda analize. Može se provesti u nekoliko minuta. Visoka osjetljivost metode omogućava detekciju spojeva pri vrlo niskim koncentracijama (mg L^{-1} ili $\mu\text{g L}^{-1}$). Za provedbu analize potrebna je mala količina uzorka (uglavnom volumena u μl). Učinkovito razdjeljuje sastojke smjese sa visokom djelotvornošću i preciznošću. U odnosu na druge analize je jednostavnija i relativno jeftinija metoda (Feng i sur., 2019).

Međutim primjena plinske kromatografije ograničena je na analizu hlapljivih spojeva. Maksimalna temperatura kolone je $380\text{ }^{\circ}\text{C}$ i moguća je analiza spojeva koji se u tom temperaturnom rasponu mogu raspliniti te imaju tlak pare veći od 60 Torr. Nije pogodna za analizu termolabilnih spojeva. Također, uzorak mora biti topljiv i ne smije reagirati s kolonom. Pojedine analize iziskuju zahtjevnije i duže pripreme uzorka. Potrebna je spektrometrijska identifikacija pika, a najčešće se za to upotrebljava masena spektrometrija (Feng i sur., 2019).

2.4.1.1. Detektori

Detektori primijenjeni u plinskoj kromatografiji moraju biti zagrijani kako bi se izbjegla kondenzacija eluiranih komponenti. Temperatura detektora je najmanje $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ viša od temperature kromatografske kolone. Detektori mogu biti osjetljivi na masu ili koncentraciju.

Kod detektora osjetljivih na koncentraciju utvrđena je ovisnost o brzini protoka (Feng i sur., 2019).

Veliki broj različitih hlapljivih spojeva u vinu prisutni su u visokim koncentracijama zbog čega se tijekom analize postavlja problem specifičnosti i osjetljivosti analize. Upotrebom detektora specifičnih za spojeve koji se analiziraju taj problem se minimalizira. Za analizu hlapljivih sumpornih spojeva vina primjenjuju se slijedeći detektori: plameno-fotometrijski detektor (FPD, eng. *flame photometric detection*), sumpor kemiluminiscentni detektor (SCD, eng. *sulfur chemiluminescent detection*), pulsirajući plameno-fotometrijski detektor (PFPD, eng. *pulsed flame photometric detection*), atomsko-emisijski detektor (AED, eng. *atomic emission detection*) te maseni detektor (MSD, eng. *mass spectrometry detector*) (Slaghenaufi i sur., 2017).

Plameno-fotometrijski detektor (FPD)

Princip rada plameno-fotometrijskog detektor temelji se na mjerenju promjene boje plamena. Na izlazu iz kolone uzorak sagorijeva u plamenu vodika te se nastala luminiscencija plamena mjeri pomoću fotometrijskog filtera. Spojevi koji ulaze u plamen razgrađuju se na energetske radikale. Gubitkom njihove energije emitira se svjetlost koju detektira fotomultiplikator. Sumporni spojevi se u plamenu razgrađuju na S_2 radikal koji emitira energiju u UV spektru (De Coning i Swinley, 2019).

Emisija sumpornih spojeva je pri valnoj duljini 394 nm. S obzirom na to da se pri ovoj valnoj duljini javlja i emisija pojedinih ugljikovodika, smanjuje se selektivnost i osjetljivost na sumporne spojeve. Utvrđeno je nekoliko emisija valnih duljina sumpora u UV području, ali sve su blizu valne duljine ugljikovodika. Te emisije smanjuju signal pogotovo u kompleksnim matricama poput vina te mogu dovesti do nepouzdanih rezultata. Osim toga, za jedan S_2 radikal potrebna su dva atoma sumpora, pa detektor pokazuje kvadratni odgovor prema sumporu. Nelinearni odgovor na sumpor otežava njegovu kvantifikaciju (De Coning i Swinley, 2019).

Pulsirajući plameno-fotometrijski detektor (pFPD)

Pulsirajući plameno-fotometrijski detektor temelji se na pulsiranju detektora pri čemu se detekcija odvija u četiri faze (punjenje, paljenje, širenje te emisija) u kojima dolazi do razgradnje sumpornih spojeva do radikala i emisije. Princip detekcije je sličan FPD-u detektoru no zbog dodatka vremenske dimenzije povećava se osjetljivost detektora i rezultira čistim kromatogramom (Davis i Qian, 2019; Ullrich i sur., 2017). Nakon faze paljenja nastali radikali uzrokuju emisiju. Pozadinska emisija je kratkotrajna (svega tri do četiri milisekunde) dok se

emisija sumpora nastavlja kroz duže vrijeme. S obzirom na to da detektor mjeri signal nekoliko milisekundi kasnije, eliminira se emisija iz pozadine koja je uglavnom posljedica razgradnje ugljikovodika (De Coning i Swinley, 2019).

Usmjeravanjem signala poboljšava se selektivnost i osjetljivost za sumporne spojeve u odnosu na FPD detektor (De Coning i Swinley, 2019). Također, početni i operativni troškovi su niži te je jednostavnija izvedba uređaja u odnosu na primjenu masenog ili sumpor kemiluminiscentnog detektor (Ullrich i sur., 2017).

S druge strane, detektor pulsira na frekvenciji od 4 Hz i ne pokazuje pouzdane informacije o veličini pika čija je širina veća od 0,5 sekundi. Također, poput FPD detektora njegov odziv prema sumporu nije linearan. Iako eliminira pozadinsku emisiju ugljikovodika, kod detekcije uzoraka s velikom koncentracijom ugljikovodika smanjuje se njegov odziv (De Coning i Swinley, 2019).

Sumpor kemiluminiscentni detektor (SCD)

Sumpor kemiluminiscentni detektor je specifični sumpor-osjetljivi detektor korišten za analizu sumpornih spojeva u kompleksnim organskim sustavima poput vina (Hersage i sur., 2011). Princip rada se bazira na tome da uzorak na izlazu iz kolone sagorijeva na visokoj temperaturi (1800 °C) pri čemu nastaje sumporov monoksid (SO) koji reagira s ozonom (O₃). Emisija svjetla nastala zbog kemiluminiscencije mjeri se pomoću fotometra (De Coning i Swinley, 2019).

Ovaj detektor je pokazao najbolje rezultate za selektivnost sumpornih spojeva i ima široku primjenu u plinskoj kromatografiji te superkritičnoj fluidnoj kromatografiji. Za razliku od pFPD i FPD detektora ima linearan odgovor na sumporne spojeve te se može primijeniti na kompleksne sustave jer ima manju interferenciju ostalih spojeva uzorka (De Coning i Swinley, 2019). Upotrebom SCD-a bez plamena povećava se efikasnost i smanjuje ograničenje osjetljivosti, selektivnosti i stabilnosti detektora (Herzsage i Ebeler, 2011). Nedostaci su češće održavanje zbog rada pri sniženom tlaku te skuplja oprema i teže rukovanje. Osim toga, nosač plina te vodik i ozon moraju biti visoke čistoće (De Coning i Swinley, 2019).

Maseni detektor (MSD)

Plinska kromatografija s masenim detektorom (GC-MS) je široko primijenjena instrumentalna analitička tehnika za određivanje kvalitete prehrambenih proizvoda. Vezani sustav GC-MS

omogućava istovremeno odjeljivanje, identifikaciju te kvantifikaciju analita u uzorku (Feng i sur., 2019).

Masena spektrometrija temelji se na generiranju iona iz molekula te analizi na temelju omjera njihove mase i naboja. Analiziraju se ioni u plinovitoj fazi, pa je jedino moguća analiza molekula koje se mogu ionizirati. Maseni spektrometar je instrument koji ionizira molekule do iona i sastoji se od četiri dijela: ionizatora, akceleratora, analizatora te detektora. Ionizator provodi ionizaciju molekula do iona, potom pozitivno nabijene čestice se u akceleratoru djelovanjem električnog polja ubrzavaju. Nastale ione analizator razdvaja na osnovi omjera njihove mase i naboja (m/z) te tako razdvojeni ioni dolaze na detektor koji električni signal prevodi u maseni spektar. Tijekom ionizacije molekula nastaje molekulski ion koji se može pregraditi ili fragmentirati. S obzirom na to da je energija ionizacije većine organskih molekula 7-10 eV, nastali molekulski ion posjeduje višak energije što rezultira fragmentacijom karakterističnom za svaki pojedini spoj. Tako nastali specifični maseni fragmenti omogućavaju identifikaciju spojeva u usporedbi sa standardnim masenim spektrom (Feng i sur., 2019; Vinas i Campillo, 2019).

Kvadrupolni analizator mase najčešće se primjenjuje u sustavu plinske kromatografije s masenim detektorom. Sastoji se od četiri paralelne metalne šipke različitih naboja koje djeluju kao filteri, a promjenom napona se utječe na putanju iona. Ioni s odgovarajućim omjerom mase i naboja (m/z) prolaze kroz kvadrupolni filter i dolaze na detektor, a ostali ioni su izbačeni (Djaković, 2017).

Jednostavna kvantifikacija postiže se upotrebom SIM (eng., *selected ion monitoring*) tehnike u kojoj se prate ioni karakteristične vrijednosti omjera mase i naboja (m/z). Praćenjem odabranih m/z vrijednosti povećava se selektivnost i snižava granica detekcije ciljanih analita u usporedbi sa punim spektrom (Vinas i Campillo, 2019).

Dodatno povećanje selektivnosti postiže se praćenjem dva ili više iona karakterističnih vrijednosti m/z , odnosno primjenom MRM tehnike i tandem masene spektrometrije (MS/MS) s tzv. *triple*-kvadrupolnim analizatorom (Vinas i Campillo, 2019). MRM tehnika temelji se na odabiru jednog iona-prekursora te dva ili više iona-produkata. Ioni su karakteristični za pojedine analite. U prvom kvadrupolu selektivno se izdvaja prekursor ion određene m/z vrijednosti te se odvodi u drugi kvadrupol (kolizijsku ćeliju) gdje se odvija fragmentacija iona i dobivanje dva ili više produkt iona. Potom se ponovno provodi selekcija u trećem kvadrupolu i odgovarajući produkt ion odlazi na detektor (Xian i sur., 2015; Yao i sur., 2013). MRM

tehnika povećava selektivnost i olakšava odvajanje željenih pikova od ostalih eluiranih spojeva. Posljedično se smanjuje potreba za visoko djelotvornim razdvajanjem te se ubrzava rad vezanog sustava GC-MS/MS (Slaghenaufi i sur., 2018).

Nedostaci masenog detektora su visoki troškovi instrumentalne aparature i same analize. Rukovanje zahtjeva visoku stručnost operatera i primjenjuje se samo u namjenskim analizama (Ullrich i sur., 2017).

2.4.2. Metode koncentriranja

Prije same detekcije i kvantifikacije, hlapljive sumporne spojeve potrebno je, na adekvatan način, izdvojiti iz uzroka. Vino je kompleksan matriks i sadrži brojne spojeve koje je potrebno ukloniti kako ne bi uzrokovali zasićenje i kontaminaciju kolone. Pritom je važno istaknuti alkohol koji otežava ekstrakciju i koncentriranje sumpornih spojeva (Davis i Qian, 2019).

Ekstrakcije tekuće-tekuće

Ekstrakcija hlapljivih sumpornih spojeva provodi se primjenom odgovarajućeg otapala. Za proširenje polarnog raspona otapala upotrebljavaju se azotropna smjesa otapala, a efikasnost ekstrakcije povećava se dodatkom soli. Najbolja svojstva ekstrakcije pokazala je smjesa pentadikolormetana i etil acetata (Mestres i sur., 2000).

Ova tehnika ekstrakcije može se primijeniti samo za spojeve sa višom točkom vrelišta jer kod ekstrakcije lako hlapljivih spojeva dolazi do njihovog gubitka isparavanjem tijekom same pripreme uzorka. Osim toga, koriste se velike količine otapala koje imaju negativan utjecaj na čovjeka i okoliš (Davis i Qian, 2019).

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi je tehnika uvedena 80-ih godina prošlog stoljeća. Koristi se kao alternativa tradicionalnim metodama koncentriranja ekstrakcije hlapljivih spojeva. Metoda se zasniva na upotrebi specifičnog vlakna prekrivenog odgovarajućim polimerima. Vlakno se uroni u tekući ili plinoviti uzorak. Pritom se lako hlapljive komponente apsorbiraju na vlakno iznad uzorka smještenog u zatvorenoj i zagrijanoj bočici. U ovoj tehnici analize postiže se ravnoteža između tekuće i plinovite faze te koncentriranje željenog analita na vlakno. Danas su na tržištu dostupna vlakna različitog sastava i debljine prilagođene pojedinim analizama (Fracassetti i Vigentini, 2018; Nguyen i sur., 2014).

S obzirom na prethodno opisane tehnike, SPME tehnika je pokazala najbolje rezultate i ima brojne prednosti:

- omogućava brzu, jednostavnu i relativno jeftinu ekstrakciju,
- priprema uzorka ne uključuje upotrebu otapala,
- omogućava efikasnu ekstrakciju i koncentriranje spojeva arome uz visoku osjetljivost,
- pogodno je za analizu malog volumena uzorka,
- lako se povezuje sa sustavom plinske kromatografije i masne spektrometrije,
- ekstrakcija se odvija u zatvorenoj bičici (viali) stoga je gubitak lako hlapljivih spojeva poput sumporovodika i metantiola onemogućen,
- njihovo raspadanje je minimalizirano (Davis i Qian, 2019; Panighel i Flamini, 2014).

Ipak, kompleksni matriks vina utječe na učinkovitost SPME ekstrakcije željenih spojeva. Naime, etanol i drugi hlapljivi spojevi otežavaju ekstrakciju. Etanol ima ulogu otapala za pojedine sumporne hlapljive komponente te smanjuje njihovu sposobnost nakupljanja u *headspace* prostoru viala. Zbog ograničenog apsorpcijskog kapaciteta SPME vlakna može doći do gubitka osjetljivosti. (Davis i Qian, 2019).

Za razvoj SPME metode za ekstrakciju specifičnih hlapljivih sumpornih spojeva vina potrebno je optimizirati sljedeće parametre: ekstrakcijsko vrijeme, temperatura ekstrakcije, ionska jakost, način miješanja te vrsta SPME vlakna (Tufariello i sur., 2019). Odabir optimalnih parametara analize ovisi o svojstvima spoja koji se analizira, npr. temperaturi vrelišta. Dodatak soli magnezijeva sulfata ili natrijeva klorida povećava ionsku jakost i poboljšava iskorištenje ekstrakcije (Fracassetti i Vigentini, 2018).

Za hlapljive sumporne spojeve nastale tijekom alkoholne fermentacije koriste se dvije vrste SPME vlakana: CAR-PDMS (eng. *carboxen/polydimethylsiloxane*) te CAR-PDMS-DVB (eng. *divinylbenzene /carboxen /polydimethylsiloxane*). Osim same stacionarne faze vlakna, bitan faktor pri odabiru je i njegova debljina. Pritom je utvrđeno kako tanje vlakno karakterizira dobra ponovljivost i reproducibilnost (Fracassetti i Vigentini, 2018).

U dosadašnjim istraživanjima je utvrđena dobra reproducibilnost i veliki kapacitet CAR-PDMS vlakna za ekstrakciju hlapljivih sumpornih spojeva male molekulske mase poput metantiola i dimetil sulfida iz uzoraka vina te drugih prehrambenih proizvoda. Općenito, ovo vlakno

karakterizirano je boljom apsorpcijom malih molekula u svoje mikropore (Davis i Qian, 2019). Također, prednost CAR-PDMS vlakna je bolja apsorpcija sumpornih spojeva s nižom temperaturom vrelišta. Nedostatak ovog vlakna je manja učinkovitost za druge hlapljive sumporne spojeve te je utvrđena kompeticija analita za mjesto apsorpcije na vlakno (Fracassetti i Vigentini, 2018).

CAR-PDMS-DVB vlakno ima najbolje ekstrakcijsko iskorištenje uz optimalne analitičke uvjete. Vlakno ima višestruka mjesta apsorpcije čime je minimizirana kompeticija različitih analita. Međutim, utvrđena je velika ovisnost efikasnosti ekstrakcije o postavljenom uvjetima, npr. temperaturi uzorka, ionskoj jakosti i trajanju same ekstrakcije (Fracassetti i Vigentini, 2018; Herszage i Ebeler, 2011).

2.4.3. Problematika analize reduktivnih sumpornih spojeva

Glavni nedostatak analize hlapljivih sumpornih spojeva je njihova velika osjetljivost na kisik. Potpuna eliminacija prisustva kisika nije moguća, ali ju je potrebno svesti na minimum. Primjer takvog pristupa je upotreba tzv. *glove box* spremnika, odnosno spremnika s rukavicama u kojem je razina kisika manja od 1 mg L^{-1} . Unutar spremnika uzorci se pripremaju u atmosferi inertnog plina, najčešće argona ili helija. Također, zbog velike hlapljivosti spojeva koristi se laboratorijsko posuđe sa zatvaračima koje se prethodno propuhuje u struji inertnog plina i pohranjuje u hladnjaku na temperaturama ispod $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Slaghenaufi i sur., 2017). Pripremljene otopine standarda mogu se skladištiti pri $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz period od maksimalno dva tjedna. Na stabilnost sumpornih spojeva može utjecati tip viala koji se koristi, uvjeti skladištenja, otapalo te koncentracija (Franco-Luesma i sur., 2014a).

Fotosenzibilnost i nestabilnost merkaptana na zraku te visoka hlapljivost disulfida otežavaju pripremu uzoraka i kvantitativnu analizu, ali i kalibraciju i standardizaciju metode. Oksidacija merkaptana i sumporovodika uzrokuje njihovo povezivanje u disulfide i polisulfide, a dodatak sintetskih antioksidansa (butil-hidroksianisola i butil-hidroksitoluena) ne djeluje na smanjenje njihova nastanka. Pojedini spojevi reduktivne arome mogu stupati u komplekse s ionima metala. Stoga su ovi spojevi u vinu prisutni u tri različita oblika: u slobodnom obliku, u kompleksu s ionima metala te u oksidiranom obliku. Negativnoj aromi doprinose samo oni u slobodnom obliku, no zbog reverzibilnosti kompleksa u određenim uvjetima ponovno se mogu osloboditi u početni oblik s negativnim utjecajem na kvalitetu vina. Dakle, potrebno je provesti analizu navedenih spojeva u njihovom slobodnom obliku te vezanih u kompleks (Culleré i sur., 2019).

Metode analize spojeva u slobodnom i vezanom obliku provode se uz njihovo prethodno oslobađanje iz kompleksa. Postupak se sastoji od razrjeđivanja vina u slanoj otopinu u omjeru 1:10 ili direktnim dodatkom natrijeva klorida (NaCl) u uzorak uz povišenje temperature. Dodani kloridni anioni tvore komplekse sa kationima bakra i oslobađaju iz kompleksa hlapljive sumporne spojeve koji se potom analiziraju (Culleré i sur., 2019).

Određivanje spojeva samo u slobodnom obliku provodi se tako da ne dolazi do pomaka ravnoteže. Postupke promjene pH vrijednosti, ionske jakosti i koncentriranja upotrebom SPME je potrebno izbjegavati jer mogu uzrokovati pomak ravnoteže. Pritom se provodi analiza hlapljivih sumpornih spojeva nepromijenjenog i nerazrijeđenog uzorka vina. Ovakav pristup je rijedak (Culleré i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Uzorci, odnosno različite koncentracije standarda sumpornih spojeva, pripremljeni su u model otopini vina (12 % etanol (v/v), 5 g L⁻¹ vinske kiseline, pH=3,2).

3.1.2. Kemikalije

- Metanol, HPLC grade (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Etanol, HPLC grade (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Natrijev klorid, p.a. (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska)
- Vinska kiselina, p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Metionol, > 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Dimetil disulfid, > 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Dimetil trisulfid, > 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Etantiol, > 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

3.1.3. Instrumenti i pomoćni pribor

- Plinski kromatograf (GC) 8890 s tandem masenim spektrometrom (MS/MS) 7000D TQ (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- Termoblok s magnetskom miješalicom (Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971, Rockford, SAD)
- SPME vlakno Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, SAD)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 40 H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka)
- Nomasense P6000 (Nomacorc, Thimister-Clermont, Belgija)
- Analitička vaga (Metler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Mikropipete od 100 µL i 1000 µL (Eppendorf, Hauppauge, SAD)
- Tikvice od 25 mL i 50 mL
- Pipeta od 10 mL
- Viale od 20 mL

3.2. METODA

Preliminarna analiza nekoliko sumpornih spojeva (etantiol, dimetil disulfid, dimetil trisulfid i metionol) provedena je primjenom plinske kromatografije s tandem masenom spektrometrijom (GC-MS/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME). Identifikacija prethodno spomenutih spojeva provedena je MRM načinom rada masenog detektora (Slaghenaufi i sur., 2017).

Samo istraživanje provedeno je u nekoliko koraka:

- (i) analiza pojedinačnih standarda s ciljem utvrđivanja retencijskih vremena,
- (ii) utvrđivanje optimalnog temperaturnog programa – povećanje početne temperature,
- (iii) injektiranje kombinacije standarda (mix otopine) u rastućim koncentracijama s ciljem izrade baždarne krivulje, odnosno s ciljem utvrđivanja linearnosti metode.

3.2.1. Kromatografski uvjeti analize

Kolona korištena za analizu: CP-Wax 52 CB, dimenzije 30 m × 250 μm, i.d. 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC-MS/MS):

- Temperatura injektora: 250 °C
- „Splitless mode“ injektiranja
- Temperaturni program:
 - Faza (i): 35 °C, 1 min → 150 °C, 10 °C min⁻¹ → 240 °C, 20 °C min⁻¹
 - Faza (ii) i (iii): 40 °C, 1 min → 150 °C, 10 °C min⁻¹ → 240 °C, 20 °C min⁻¹, 5 min
- Plin nosioc: Helij (He)
- Protok plina nosioca: 1,5 mL min⁻¹
- Temperatura AUX: 250 °C
- Temperatura ionskog izvora: 250 °C
- Temperatura kvadrupola: 150 °C
- Rad masenog detektora: MRM MODE (uvjeti prikazani u tablici 2)

Tablica 2. Uvjeti MRM snimanja masenog spektra

| Spoj | Prekursor ion (<i>m/z</i>) | Kolizijska energija (-V) | Produkt ion (<i>m/z</i>) |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Etantiol | 62 | 15 | 29 |
| | 62 | 10 | 47 |
| Dimetil disulfid | 94 | 15 | 79 |
| | 94 | 25 | 64 |
| Dimetil trisulfid | 126 | 15 | 79 |
| | 126 | 10 | 64 |
| Metionol | 106 | 5 | 88 |
| | 106 | 10 | 57 |

3.2.2. Priprema uzoraka

Sama priprema uzoraka predstavlja ključan korak u analizi sumpornih spojeva, obzirom da su ovi spojevi izuzetno osjetljivi na prisutnost kisika. Drugim riječima, u uvjetima s prisutnim kisikom dolazi do njihove oksidacije, odnosno smanjenja koncentracije (Jonsson, 2017; López i sur., 2007). Upravo zbog toga je ključno najprije definirati mehanizam same pripreme.

U ovom istraživanju su sva korištena otapala najprije odzračena u ultrazvučnoj kupelji (30 min), te potom propuhana strujom argona. Standardi sumpornih spojeva najprije su vagani i otopljeni u čistom metanolu, dok su sva kasnija razrjeđenja pripremljena u model otopini vina (12 % etanol (v/v), 5 g L⁻¹ vinske kiseline, pH=3,2). Važno je istaknuti kako je svako daljnje razrjeđenje provedeno pipetiranjem određenog pojedinog standarda u struji argona, čime se također minimalizirao negativan utjecaj kisika. Kontrola samog kisika provedena je primjenom uređaja za mjerenje kisika (Nomasense P6000), pri čemu je udio kisika tijekom cijelog postupka priprema održavan ispod 1 %. Nadalje, s obzirom na to da se radi o iznimno osjetljivim spojevima, razrjeđenja pripremljena u metanolu čuvana su na temperaturi -20 °C, dok su ona pripremljena u model otopini vina čuvana na temperaturi od 4 °C, što je također minimaliziralo stupanj degradacije. U konačnici, s obzirom da su pojedini sumporni spojevi i fotoosjetljivi, svi pripremljeni uzorci su zaštićeni aluminijskom folijom čime se eliminirao negativan utjecaj svjetla.

Priprema uzoraka za SPME analizu sastojala se od pipetiranja 10 mL otopine standarda (ili kombinacije standarda) željene koncentracije u vialu od 20 mL u koju je prethodno odvagano 3,5 g NaCl i stavljen magnet. Nakon toga je viala zatvorena te stavljena na termoblok. SPME ekstrakcija provedena je pri temperaturi od 40 °C i konstantnom miješanju kroz 20 min. Nakon toga SPME vlakno je preneseno u injektor plinskog kromatografa gdje se vršila desorpcija kroz 5 min.

3.2.3. Utvrđivanje retencijskih vremena

Pojedinačne otopine standarda su pripremljene u određenim koncentracijama, nakon čega je provedena SPME ekstrakcija te GC-MS/MS analiza, prema uvjetima opisanim u prethodnim poglavljima. Koncentracije standarda prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Koncentracije standarda korištene za utvrđivanje retencijskog vremena

| Standard | Koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|-------------------|--|
| Etantiol | 2 |
| Dimetil disulfid | 30 |
| Dimetil trisulfid | 50 |
| Metionol | 500 |

3.2.4. Odabir temperaturnog programa

Cilj ove faze istraživanja bio je korigirati temperaturni program GC-MS/MS analize, obzirom da je početna preporučena temperatura pećnice (Slaghenaufi i sur., 2017) iznosila 35 °C. Navedena temperatura je relativno niska i potencijalno predstavlja problem hlađenja pećnice nakon završene analize uzorka, prvenstveno u ljetnim, toplim mjesecima, što za posljedicu ima znatno duže trajanje same analize i nepotreban gubitak vremena. Zbog navedenih razloga, početna temperatura pećnice je podignuta za 5 °C i iznosi 40 °C.

Pripremljene otopine standarda analizirane u prethodnom koraku su zatim analizirane primjenom korigiranog temperaturnog programa (cjeloviti temperaturni programi prikazani u poglavlju 3.2.1. Kromatografski uvjeti analize). Koncentracije pojedinih standarda, korištene za pripremu uzorka su prikazane u tablici 3.

3.2.5. Utvrđivanje linearnosti metode

Treća faza ovog istraživanja obuhvatila je utvrđivanje linearnosti primijenjene metode, odnosno izradu baždarnih krivulja za svaki pojedini standard. Pritom su pripremljene mix otopine standarda u rastućim koncentracijama te injektirane u duplikatu. Korištene koncentracije pojedinih sumpornih spojeva su prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Koncentracije sumpornih spojeva u pojedinom stupnju kalibracije

| Standard | Koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | |
|-------------------|--|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Etantiol | 1 | 2 | 3 |
| Dimetil disulfid | 15 | 30 | 45 |
| Dimetil trisulfid | 25 | 50 | 75 |
| Metionol | 250 | 500 | 750 |

3.2.6. Obrada dobivenih rezultata

Identifikacija pojedinih spojeva provedena je u programu MassHunter WorkStation - Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD), dok je kvantitativna analiza, odnosno izrada baždarnih krivulja provedena u programu MassHunter WorkStation - QQQ Quantitative Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu preliminarnog istraživanja provedeno je nekoliko faza koje uključuju identifikaciju i kvantifikaciju sumpornih spojeva. Uspješno je razvijena metoda na plinskom kromatografu s tandem masenim detektorom (GC-MS/MS) za kvantitativno i kvalitativno određivanje etantiola, dimetil disulfida, dimetil trisulfida i metionola u model otopini vina. Prema dobivenim rezultatima cjelokupni postupak pripreme uzoraka te postupak SPME ekstrakcije koji su prethodili analizi primjenom GC-MS/MS tehnike pokazali su se adekvatnim i nije nastupila oksidacija ili fotodegradacija spojeva. Hladnim skladištenjem standardnih otopina, pripremom uzoraka u struji argona te odzračivanjem i propuhivanjem korištenih otopina i otapala degradacija spojeva svedena je na minimum.

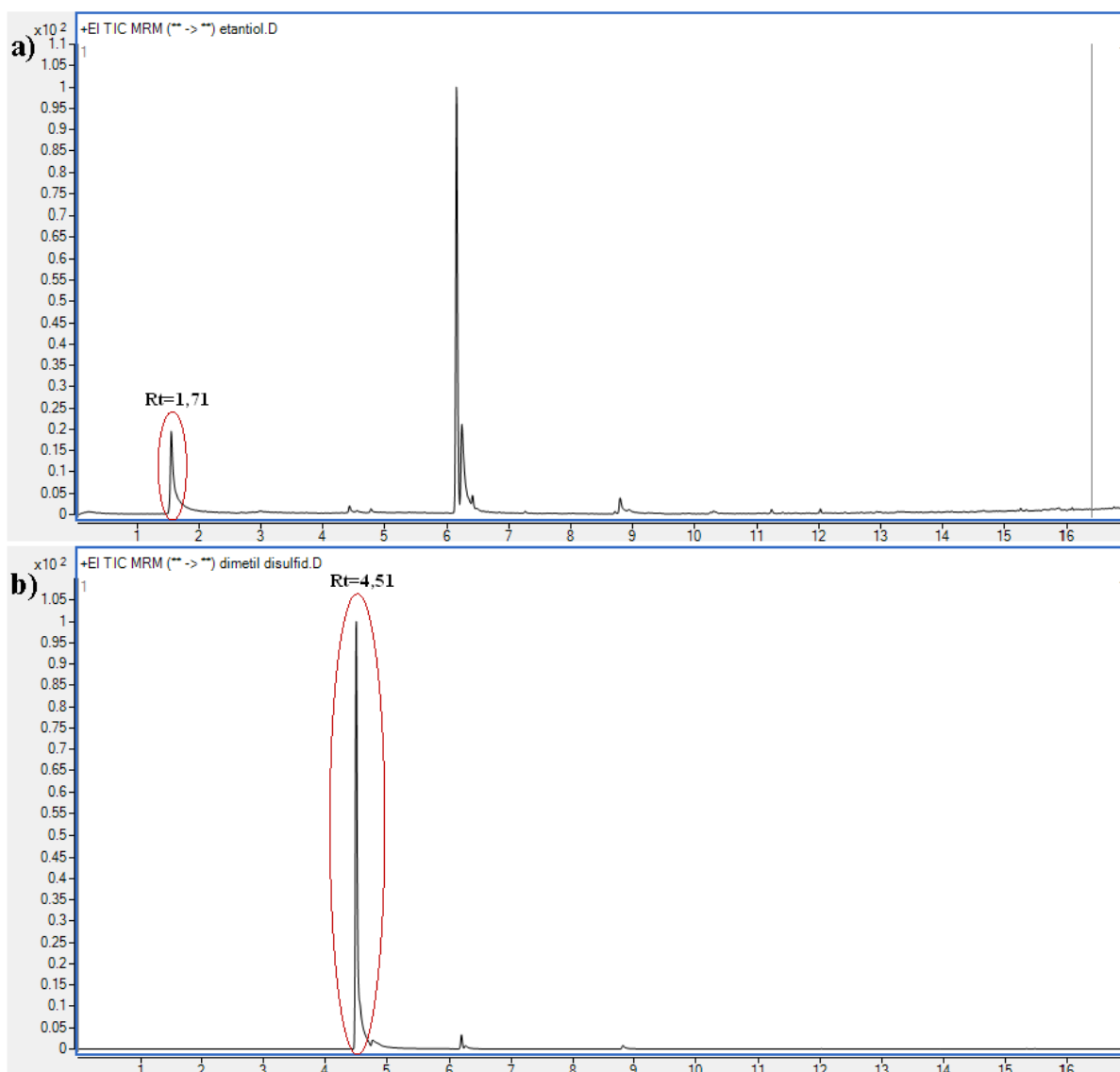
Ukupno su korištena četiri standarda sumpornih spojeva, pri čemu je utvrđen temperaturni program za njihovu analizu, retencijska vremena zadržavanja ovih spojeva te područje linearnosti kroz izradu baždarnih krivulja.

Preliminarni rezultati podijeljeni su u tri faze, kako se sam razvoj metode i odvijao: (i) utvrđivanje retencijskih vremena, (ii) utvrđivanje optimalnog temperaturnog programa te (iii) izrada baždarnih krivulja.

4.1. RETENCIJSKA VREMENA

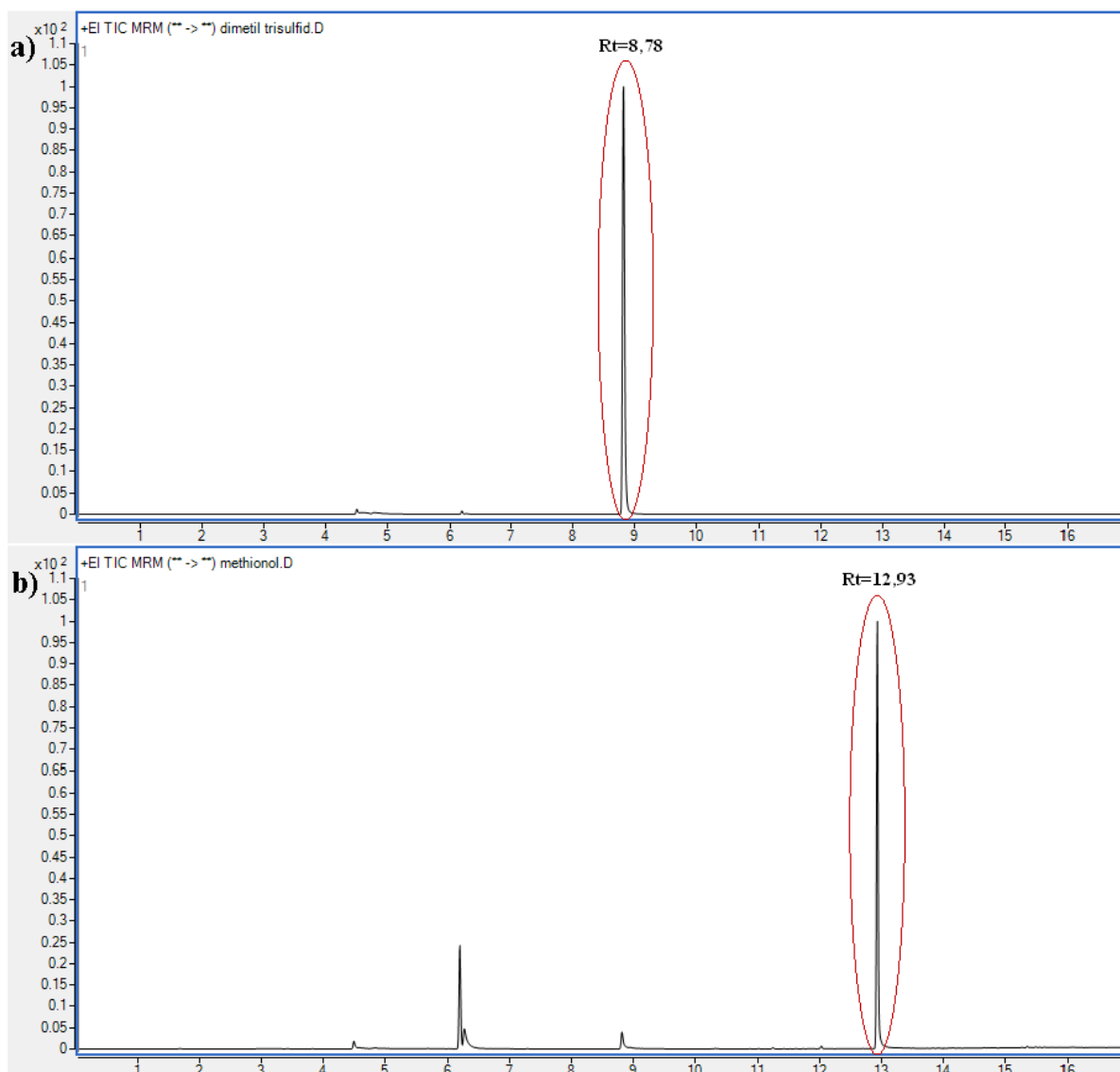
Retencijsko vrijeme se odnosi na vremenski period od trenutka injektiranja pojedinog analita u sustav do njegove pojave na kromatogramu, odnosno do njegove detekcije. Retencijska vremena su, u ovom istraživanju, utvrđena MRM analizom odnosno specifičnim cijepanjem prekursora iona u točno definirane produkt ione. Navedeni ioni odabrani su na temelju dostupnih literaturnih podataka (Slaghenaufi i sur., 2017).

Za detekciju etantiola odabrani prekursor ion bio je 62 (m/z), dok su produkt ioni 29 (m/z) i 47 (m/z). Injektiranjem pripremljene otopine etantiola utvrđeno je njegovo retencijsko vrijeme od 1,71 min, kao što je prikazano i na slici 10a. Nadalje, utvrđeno retencijsko vrijeme dimetil disulfida je 4,51 min, kao što je prikazano na slici 10b. Pritom je odabrani prekursor ion iznosio 94 (m/z), a produkt ioni 79 (m/z) i 64 (m/z).



Slika 10. Kromatogrami analiziranih standarda sumpornih spojeva: a) etantiol i b) dimetil disulfid.

Retencijsko vrijeme dimetil trisulfida utvrđeno je na isti način kao i prethodna dva spoja: injektiranjem određene koncentracije čistog standarda te MRM načinom rada detektora. Pritom su odabrani ioni (m/z) bili sljedeći: prekursor ion 126 te produkt ioni 79 i 64. Rezultati su prikazani na slici 11a, gdje je vidljivo kako je retencijsko vrijeme ovog spoja 8,78 min. U konačnici, utvrđeno retencijsko vrijeme metionola je 12,93 min (slika 11b), a odabrani ioni (m/z) korišteni za njegovu identifikaciju su: prekursor ion 106, te produkt ioni 88 i 57.



Slika 11. Kromatogrami analiziranih standarda sumpornih spojeva: a) dimetil trisulfid i b) metionol.

4.2. ODABIR TEMPERATURNOG PROGRAMA

Temperaturni program predstavlja jedan od ključnih segmenata GC-MS metode, jer uvelike utječe na razdvajanje pojedinačnih spojeva analiziranog analita. Početna temperatura ovisi o spoju koji se eluira (u složenom uzorku ovisi o prvom spoju koji se eluira), primijenjenom otapalu te načinu injektiranja. Temperatura mora biti 10-15 °C ispod temperature vrelišta otapala. Takav pristup omogućava odvajanje oštrog pika spoja od pika otapala. Povišenjem temperature povećava se tlak pare analita te smanjuje retencijsko vrijeme zadržavanja. Posljedično nastaju oštriji vrhovi pikova. Optimiranje temperaturnog programa primjenjuje se za postizanje oštrog i viših pikova uz poželjno razdvajanje spojeva. Pri niskoj temperaturi dobro

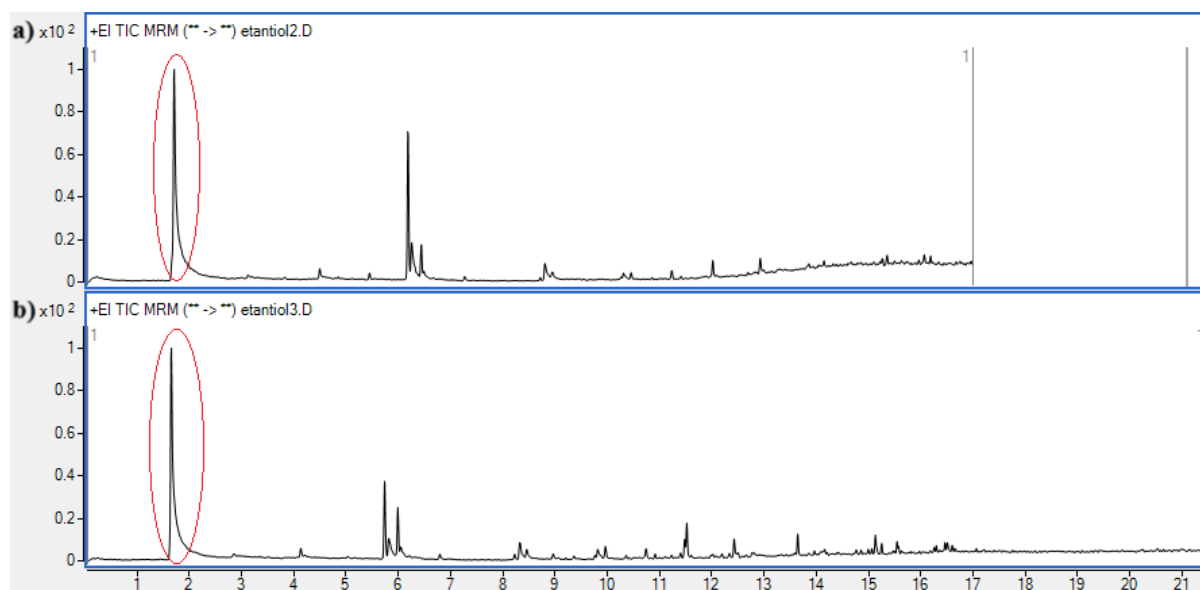
se razdvajaju spojevi nižeg vrelišta, dok spojevi više temperature vrelišta se sporije eluiraju. Stoga, niska početna temperatura kolone produžava vrijeme i povećava troškove analize. S druge strane previsoka temperatura uzrokuje izdvajanje spoja s višom temperaturom vrelišta u obliku oštrog pika dok drugi spojevi nižeg vrelišta se eluiraju bez separacije, odnosno razdvajanja. Programiranim termostatiranjem kolone temperatura se tijekom separacije kontinuirano povisuje i omogućava kontinuirani proces odjeljivanja sastojaka smjese. Temperaturni program se uglavnom sastoji od povećanja temperature za 4-20 °C min⁻¹, no on ovisi o broju analiziranih spojeva te blizini njihovog eluiranja. Povećanje je usporeno kod eluiranja spojeva sličnih temperatura vrelišta i ponovno ubrzano pri eluiranju spojeva s različitim temperaturama vrelišta. Ipak to usporeno podizanje ne smije biti presporo jer dovodi do produženja analize i povećanja troškova (Sparkman i sur., 2011; Rouessac i Rouessac, 2007). U preliminarnom istraživanju početna temperatura analize je povišena s 35 °C na 40 °C u cilju utvrđivanja mogućnosti separacije na povišenoj početnoj temperaturi, a sve s ciljem smanjenja vremena potrebnog za hlađenje sustava između dvije analize, odnosno s ciljem skraćivanja same metode analize.

Nakon provedene analize sumpornih spojeva primjenom novog temperaturnog programa, utvrđena su retencijska vremena za svaki pojedini spoj, a rezultati su prikazani u tablici 5. Također, u istoj tablici su navedena i retencijska vremena, utvrđena u prethodnom koraku istraživanja (metoda 1 s početnom temperaturom 35 °C), a s ciljem lakše usporedbe. Jasno je vidljivo kako je došlo do blagih promjena u retencijskim vremenima svakog pojedinog spoja te da ne dolazi do nikakvih preklapanja pikova. Slijedom navedenog, temperaturni program s višom početnom temperaturom od 40 °C (metoda 2) je adekvatan za analizu ovih sumpornih spojeva, te će se upravo ovaj temperaturni program koristiti u trećoj fazi istraživanja.

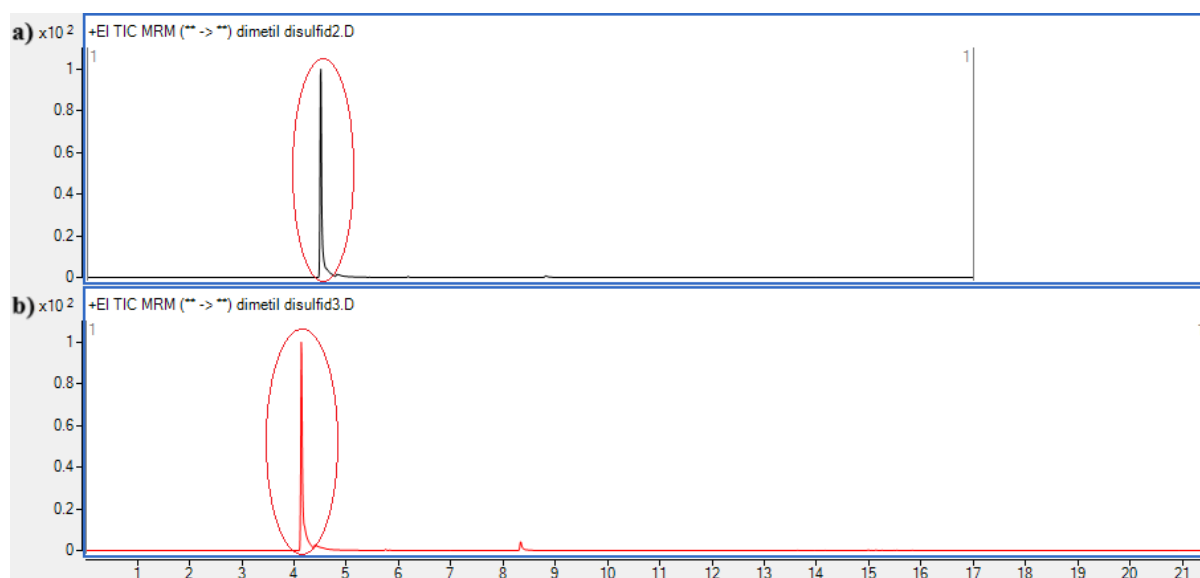
Tablica 5. Retencijska vremena analiziranih spojeva

| Spoj | Retencijsko vrijeme (min) | |
|-------------------|---------------------------|------------------|
| | Metoda 1 (35 °C) | Metoda 2 (40 °C) |
| Etantiol | 1,71 | 1,70 |
| Dimetil disulfid | 4,51 | 4,15 |
| Dimetil trisulfid | 8,78 | 8,45 |
| Metionol | 12,93 | 12,51 |

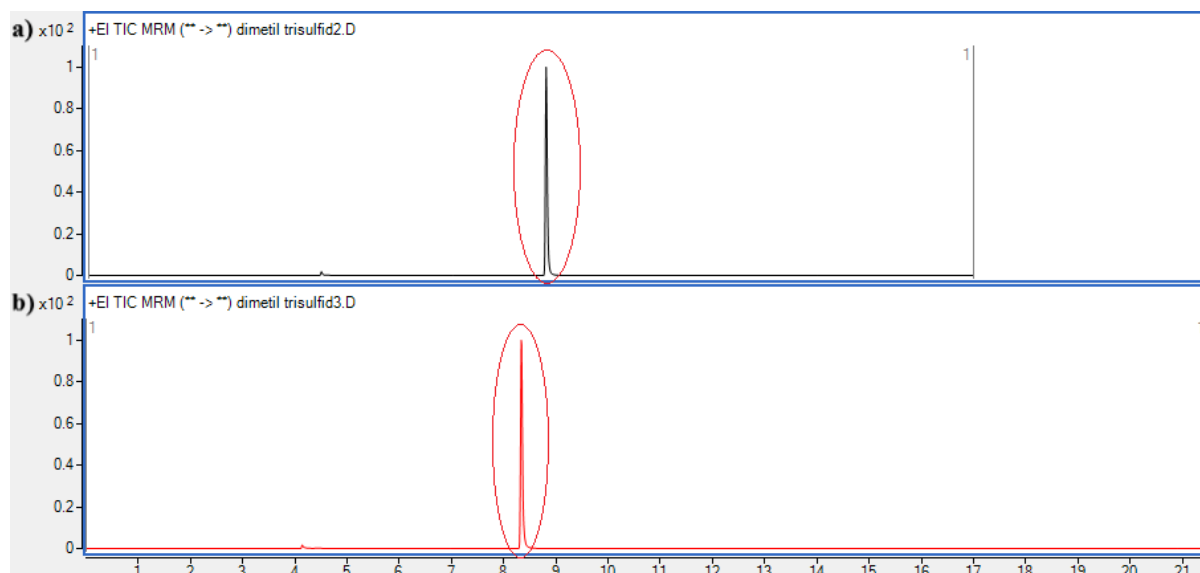
Nadalje, kao dodatna potvrda prethodno navedenim stavkama, prikazani su kromatogrami pojedinih sumpornih spojeva (slika 12-15) analiziranih primjenom obje ispitivane metode (niža i viša početna temperatura).



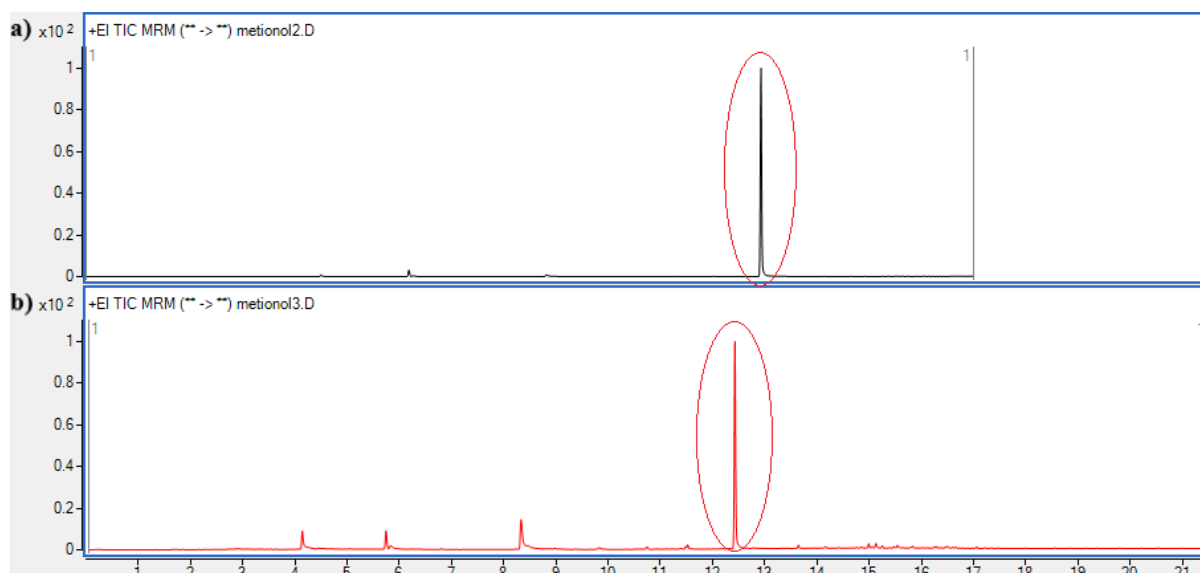
Slika 12. Usporedba dva temperaturna programa: (a) metoda 1 i (b) metoda 2 za analizu etantiola



Slika 13. Usporedba dva temperaturna programa: (a) metoda 1 i (b) metoda 2 za analizu dimetil disulfida



Slika 14. Usporedba dva temperaturna programa: (a) metoda 1 i (b) metoda 2 za analizu dimetil trisulfida



Slika 15. Usporedba dva temperaturna programa: (a) metoda 1 i (b) metoda 2 za analizu metionola

4.3. IZRADA KALIBRACIJSKIH KRIVULJA

U istraživanju je važno uspostaviti kalibracijsku krivulju za kvantifikaciju uzorka. Metodom najmanjeg kvadrata dobiva se ovisnost poznate koncentracije standarda i odziva instrumenta, odnosno kalibracijska krivulja. Koncentracija je nezavisna varijabla, a odziv zavisna. Utvrđeni

odnos omogućava određivanje nepoznate koncentracije analita u kompleksnom uzorku. Linearnost krivulje značajno utječe na kvalitetu kvantifikacije (Moosavi i Ghassabian, 2018).

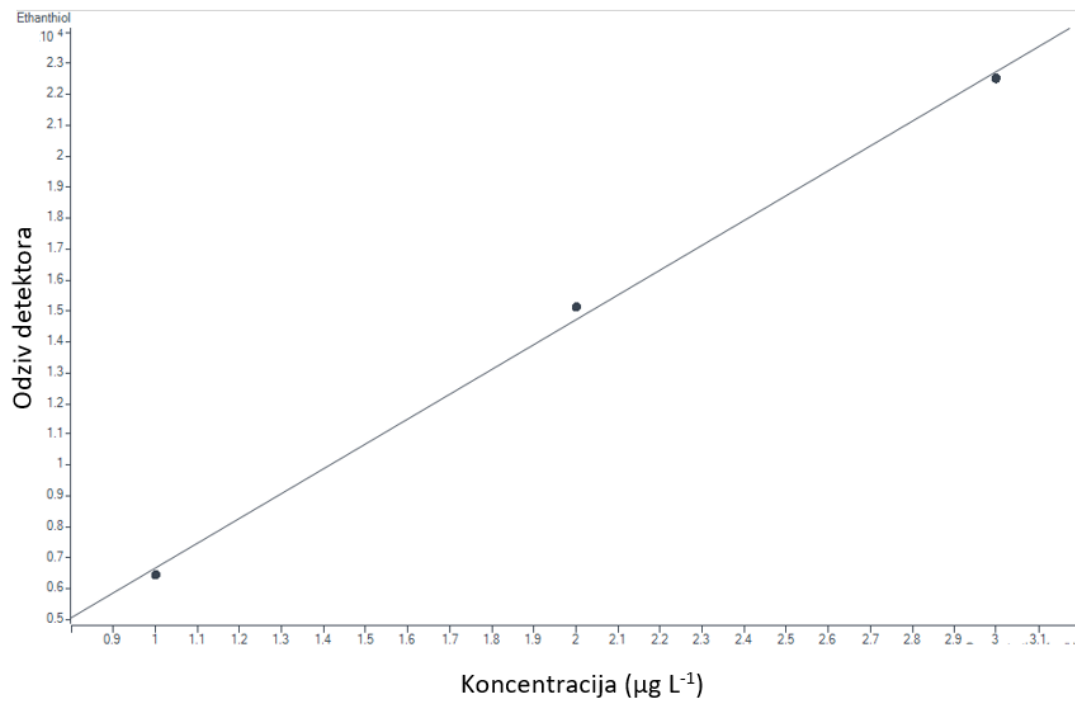
Nakon uspostave kalibracijske krivulje potrebno je odrediti granicu detekcije (LOD, eng. *limit of detection*) te granicu kvantifikacije (LOQ, eng. *limit of quantitation*). Granicu detekcije čini najmanja koncentracija analita koja se može detektirati pri poznatom intervalu pouzdanosti. Granica kvantifikacije predstavlja granicu iznad koje se može izmjeriti koncentracija analita sa statističkom sigurnošću (Harvey, 2016).

Hlapljivi sumporni spojevi većinom imaju niski senzorski prag osjetljivosti (mg L^{-1} ili $\mu\text{g L}^{-1}$) i ovisno o koncentraciji u kojoj su prisutni doprinose pozitivno ili negativno aromi vina. U koncentracijama iznad svojeg senzorskog praga osjetljivosti doprinose negativnoj aromi vina po kuhanom povrću, luku, jajima, no ako se nalaze u koncentracijama blizu njihovog praga osjetljivosti mogu pozitivno doprinijeti kompleksnosti arome vina. U koncentracijama nižim od svojeg senzorskog praga osjetljivosti ne utječu na kvalitetu vina. Ipak u naknadnim fazama proizvodnje mogu se sintetizirati iz prekursora do graničnih koncentracija ili prevoditi u druge hlapljive spojeve s nižim pragom osjetljivosti (Franco-Luesma i Ferreira, 2014b).

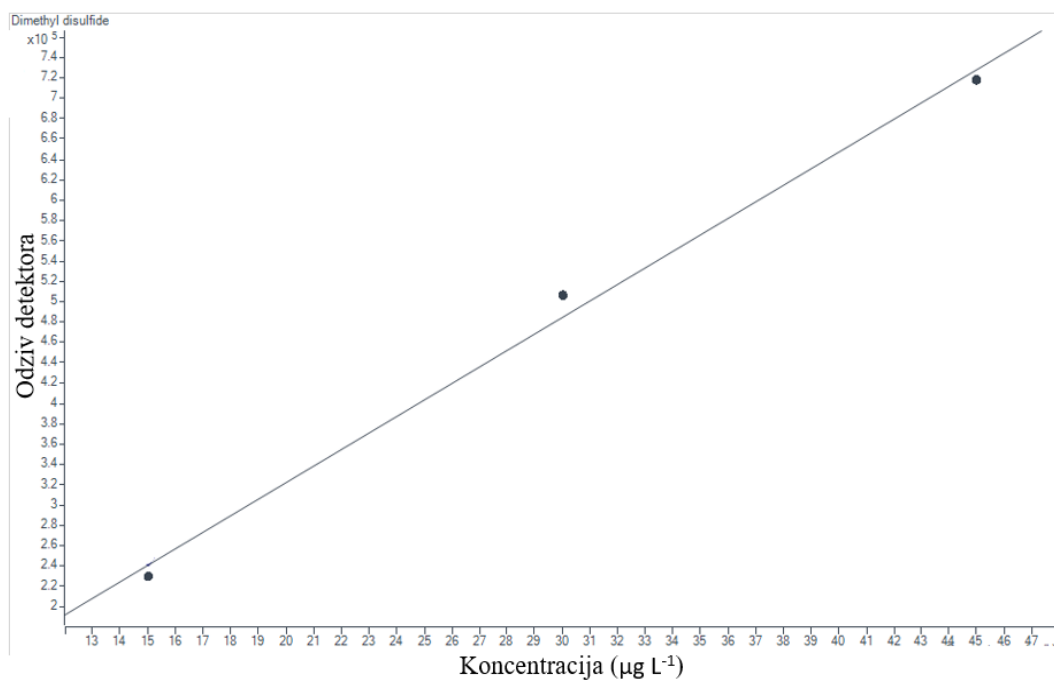
S obzirom na to da se radi o fazi preliminarnog istraživanja, samo tri točke kalibracije su provedene. Cilj ove faze bio je utvrditi linearnost same metode analize, prvenstveno ekstrakcije na SPME vlakno i njegov kapacitet vezanja ovih spojeva. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6 gdje su navedene jednadžbe linearnih pravaca te koeficijent determinacije za svaki ispitivani spoj, kao i na slikama 16–19 gdje su prikazani linearni kalibracijski pravci.

Tablica 6. Linearna jednadžba pravca ($y=ax + b$) i koeficijenti determinacije (R^2) za svaki spoj

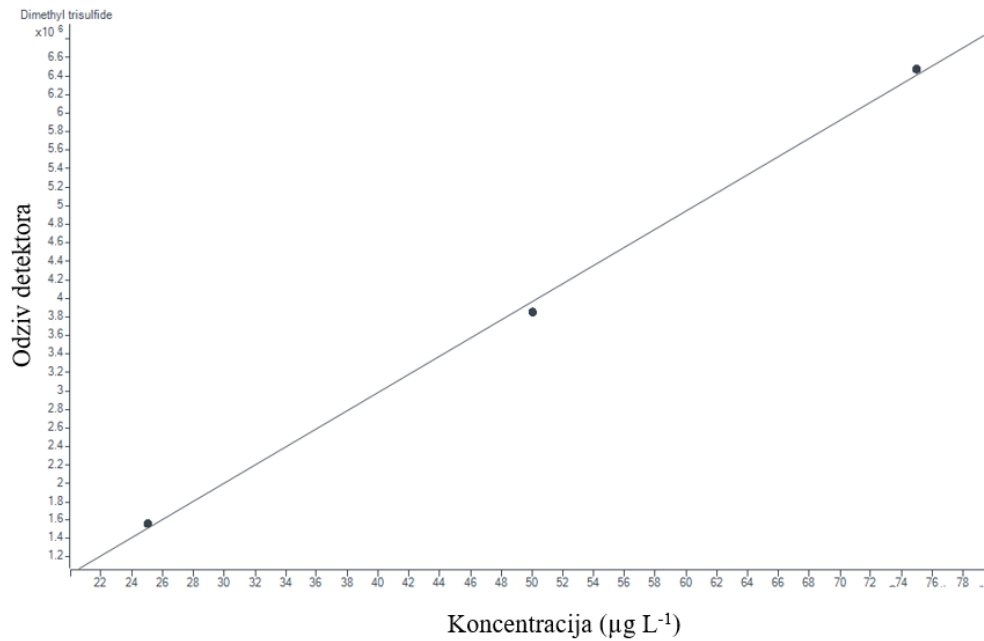
| Spoj | a | B | R² |
|-------------------|----------|------------|----------------------|
| Etantiol | 8030,09 | -346,45 | 0,998 |
| Dimetil disulfid | 16245,09 | -2737,31 | 0,994 |
| Dimetil trisulfid | 97949,29 | -936514,65 | 0,998 |
| Metionol | 21,59 | -2301,29 | 0,971 |



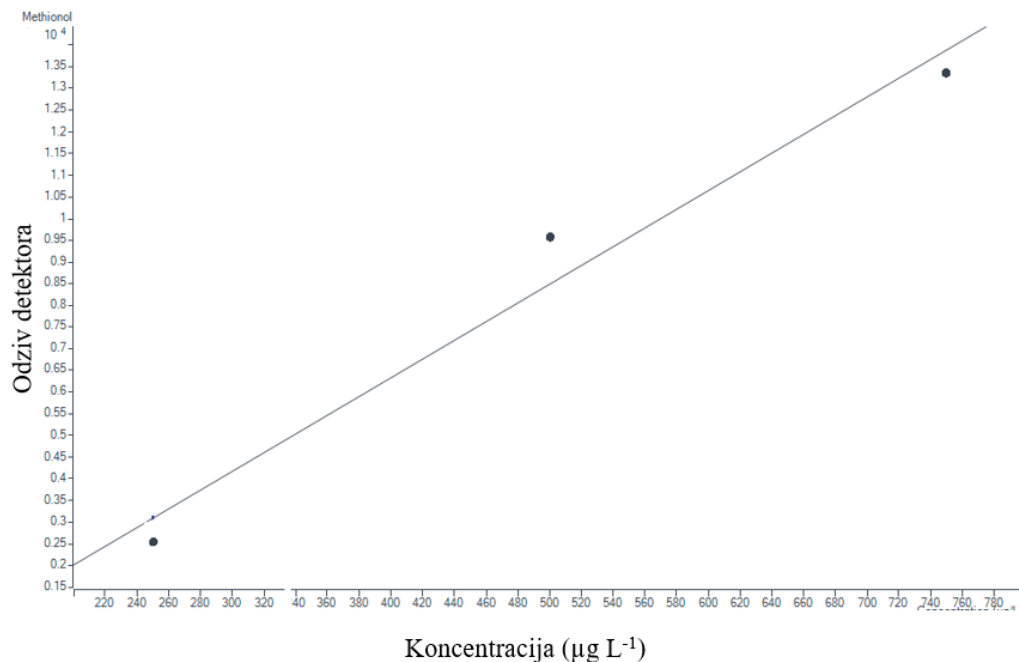
Slika 16. Kalibracijska krivulja etantiola



Slika 17. Kalibracijska krivulja dimetil disulfida



Slika 18. Kalibracijska krivulja dimetil trisulfida



Slika 19. Kalibracijska krivulja metionola

Koeficijent determinacije jednak je kvadratu koeficijenta korelacije. Što je njegova vrijednost bliža 1 prilagodba linearnog modela je bolja. Ako je njegova vrijednost 0 onda nema povezanosti između koncentracije i odziva instrumenta. Iako definira odstupanje pravca od

linearnosti ne može se koristiti kao mjera linearnosti krivulje. Linearnost je potrebno utvrditi statističkim metodama, a analiza koeficijenta može pridonijeti određivanju linearnosti. (Moosavi i Ghassabian, 2018).

Utvrđena je linearnost metode izradom baždarnih krivulja u tri kalibracijske razine standardnih otopina u rastućim koncentracijama etantiola, dimetil disulfida, dimetil trisulfida te metionola s najmanje dva mjerenja po kalibracijskoj razini. Koeficijent determinacije za etantiol i dimetil trisulfid je 0,998 (tablica 6) i najbliže je vrijednosti 1. Koeficijent determinacije metionola je 0,971 i najudaljeniji je od 1, što je i vidljivo iz krivulje na slici 19 jer dobivene vrijednosti najviše odstupaju od pravca.

Jedan od načina unaprjeđenja kalibracijskih tehnika je korištenje metode internog (unutarnjeg) standarda. Pritom unutarnji standard predstavlja kemijski spoj koji se dodaje u jednakoj količini u sve uzorke i utječe na linearnost krivulje. Njegova koncentracija je poznata i konstantna te mora imati slična fizikalno-kemijska svojstva kao i sam spoj koji se analizira. Uvođenjem unutarnjeg standarda ispravljaju se gubici analita tijekom pripreme uzorka, transporta, adsorpcije, hlapljenja te zbog promjene u volumenu injektiranja. Stoga, ovom metodom se smanjuje mjerna nesigurnost i često se primjenjuje u analitičkim metodama (Moosavi i Ghassabian, 2018). U daljnjem istraživanju određivat će se utjecaj unutarnjeg standarda na analizu i linearnost kalibracijskih krivulja. Također potrebno je provesti istraživanja u kojim se postupci provode u stvarnim sustavima, odnosno na uzorcima vina.

5. ZAKLJUČAK

1. Uspješno je razvijena metoda na plinskom kromatografu s tandem masenim detektorom (GC-MS/MS) za kvantitativno i kvalitativno određivanje etantiola, dimetil disulfida, dimetil trisulfida i metionola u model otopini vina.
2. Postupak pripreme uzoraka i SPME ekstrakcije koje je prethodilo analizi minimizirao je degradaciju hlapljivih sumpornih spojeva.
3. Temperaturni program s višom početnom temperaturom (40 °C) je prikladan za analizu ovih spojeva.
4. Utvrđena je dobra linearnost metode u tri kalibracijske razine standardnih otopina u rastućim koncentracijama.
5. Nužno je proširiti daljnje istraživanje na upotrebu unutarnjih standarda te primjenu parametara metode na realne uzorke, odnosno vino.

6. LITERATURA

ACS (2015) Hydrogen sulfide. ACS – American Chemical Society, Washington, <<https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/h/hydrogen-sulfide.html>>. Pristupljeno 12. svibnja 2020.

Anonymous 1 (2020) Methanethiol, <<https://enacademic.com/dic.nsf/enwiki/151773>>. Pristupljeno 12. svibnja 2020.

Anonymous 2 (2020) Dimethyl Disulfide, <<https://www.tcichemicals.com/HK/en/p/D0714>>. Pristupljeno 12. svibnja 2020.

Anonymous 3 (2020) Dimethyl trisulfide, <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w327506?lang=en®ion=HR>>. Pristupljeno 12. svibnja 2020.

Anonymous 4 (2020) Gas Chromatography (GC), <<https://www.shimadzu.com/an/gc/support/fundamentals/gc.html>>. Pristupljeno 12. svibnja 2020.

Barišić, L. (2017) Plinska kromatografija, Nastavni materijal, PBF- Prehrambeno-biothenološki fakultet, Zagreb.

Bakker, J., Clarke, R., J. (2012) Wine Flavour Chemistry, 2. izd., Wiley-Blackwell, Chichester, str. 219-225.

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Moreno-Arribas, V., M. (2017) Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* **22**, 189-218.

Bekker, M., Z., Smith, M., E., Smith, P., A., Wilkes, E., N. (2016) Formation of Hydrogen Sulfide in Wine: Interactions between Copper and Sulfur Dioxide. *Molecules* **21**, 1214-1231.

Bekker, M., Z., Wilkes, E., N., Smith, P., A. (2018) Evaluation of putative precursors of key 'reductive' compounds in wines post-bottling. *Food Chem.* **245**, 676–686.

Clark, C. (2018) Dimethyl Sulfide. GCES- Gulf Coast Environmental Systems, <<http://www.gcesystems.com/dimethyl-sulfide/>>. Pristupljeno 12. svibnja 2020.

- Culleré, L., López, R., Ferreira, V. (2019) The Instrumental Analysis of Aroma-Active Compounds for Explaining the Flavor of Red Wines. U: Red Wine Technology, (Morata, A., ured.), Academic Press, Madrid, str. 283-307.
- Cordente, A., G., Curtin, C., D., Varela, C., Pretorius, I., S. (2012) Flavour-active wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 601–618.
- Davis, M., P., Qian, M., C. (2019) Effect of Wine Matrix Composition on the Quantification of Volatile Sulfur Compounds by Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Pulsed Flame Photometric Detection. *Molecules* **24**, 3320-3334.
- De Coning, P., Swinley, J. (2019) A Practical Guide to Gas Analysis by Gas Chromatography, Elsevier, London, str. 247–290.
- Djaković, S. (2017) Masena spektrometrija, Nastavni materijal. PBF- Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Feng, T., Sun, M., Song, S., Zhuang, H., Yao, L. (2019) Gas chromatography for food quality evaluation. U: Evaluation Technologies for Food Quality, (Zhong, J., Wang, X., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 219-265.
- Fracassetti, D., Vigentini, I. (2018) Occurrence and Analysis of Sulfur Compounds in Wine. U: Grapes and Wines: Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization, (Jordão, A., M., Cosme, F., ured.), InTech, Rijeka, str. 225-250.
- Fracassetti, D., Limbo, S., Pellegrino, L., Tirelli, A. (2019) Light-induced reactions of methionine and riboflavin in model wine: Effects of hydrolysable tannins and sulfur dioxide. *Food Chem.* **98**, 1249- 1252.
- Franco-Luesma, E., Culleré, L., Ruiz, D., Escudero, A., Cacho J., Ferreira, V. (2014a) Problems in the Analysis of VSCs and in the Work with “Oxygen-Free” Atmospheres. U: Flavour Science, (Ferreira, V., Lopez, R. ured.), Academic Press, San Diego, str. 441-445.
- Franco-Luesma, E., Ferreira, V. (2014b) Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compounds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. *J. Chromatogr. A* **1359**, 8–15.
- Franco-Luesma, E., Ferreira, V. (2016a) Reductive off-odors in wines: Formation and release of H₂S and methanethiol during the accelerated anoxic storage of wines. *Food Chem.* **199**, 42–50.

Franco-Luesma, E., Ferreira, V. (2016b) Formation and Release of H₂S, Methanethiol, and Dimethylsulfide during the Anoxic Storage of Wines at Room Temperature. *J. Agric. Food Chem.* **16**, 6317-6326.

Harvey, D., T. (2016) Davis Thomas Harvey, Ph. D. – Home Page, <http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.1.html>. Pristupljeno 10. svibnja 2020.

Herszage, J., Ebeler, S., E. (2011) Analysis of Volatile Organic Sulfur Compounds in Wine Using Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography with Sulfur Chemiluminescence Detection. *Am. J. Enol. Vitic.* **62**, 1-8.

Huang, C., W., Walker, M., E., Fedrizzi, B., Gardner, R., C., Jiranek, V. (2017) Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a winemaking context. *FEMS Yeast Res.* **17**, 1-10.

Jackson, R., S. (2020) Wine Science: Principles and Applications, 5. izd., Academic Press, London, str. 637-642.

Jastrzemski, J., A., Allison, R., B., Friedberg, E., Sacks, G., L. (2017) The role of elemental sulfur in forming latent precursors of H₂S in wine. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1-34.

Jonsson, S. (2017) Method Development for Quantification of Total Reduced Sulfur Compounds in Liquid Matrices (Bachelor Thesis), Faculty of Science and Technology, Umeå University, Umeå.

Kinzurik, M., I., Herbst- Johnstone, M., Gardner, R., Fedrizzi, B. (2015) Evolution of Volatile Sulfur Compounds during Wine Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8017-8024.

Kinzurik, M., I., Herbst- Johnstone, M., Gardner, R., Fedrizzi, B. (2016) Hydrogen sulfide production during yeast fermentation causes the accumulation of ethanethiol, S-ethyl thioacetate and diethyl disulfide. *Food Chem.* **209**, 341-347.

Kinzurik, M., I., Deed, R., C., Herbst-Johnstone, M., Slaghenaufi, D., Guzzon, R., Gardner, R., C., Larcher, R., Fedrizzi, B. (2020) Addition of volatile sulfur compounds to yeast at the early stages of fermentation reveals distinct biological and chemical pathways for aroma formation. *Food Microbiol.* **89**, 1-8.

- López, R., Lapena, A., C., Cacho, J., Ferreira, V. (2007). Quantitative determination of wine highly volatile sulfur compounds by using automated headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection: Critical study and optimization of a new procedure. *J. Chromatogr. A* **1143**, 8-15.
- Lytra, G., Tempere, S., Marchand, S., Revel, G., Barbe, J., C. (2016) How do esters and dimethyl sulphide concentrations affect fruity aroma perception of red wine? Demonstration by dynamic sensory profile evaluation. *Food Chem.* **94**, 196-200.
- McRae, J., M., Day, M., P., Bindon, K., A., Kassara, S., A., Schmidt, S., A., Schulkin, A., Kolouchova, R., Smith, P., A. (2015) Effect of early oxygen exposure on red wine colour and tannins. *Tetrahedron* **71**, 3131-3137.
- Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. (2000) Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J. Chromatogr. A* **881**, 569–581.
- Moosavi, S., M., Ghassabian, S. (2018) Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. U: Calibration and Validation of Analytical Methods, (Stauffer, M., ured.), InTech, Rijeka, str. 109-127.
- Nguyen, D., Nicolau, L., Kilmartin, P., A. (2014) Application of an Automated Headspace Solid Phase Micro-Extraction for the GC-MS Detection and Quantification of Reductive Sulfur Compounds in Wines. U: Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications, (Salih, B., Çelikbıçak, O., ured.), InTech, Rijeka, str. 171-194.
- Panighel, A., Flamini, R. (2014) Applications of Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) in the Study of Grape and Wine Volatile Compounds. *Molecules* **19**, 21291-21309.
- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F., F., Marques, J., C., Câmara, J., S. (2006) Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Anal. Chim. Acta* **563**, 154- 164.
- Ugliano, M., Henschke, P., A., Waters, E., J. (2012) Fermentation and Post-Fermentation Factors Affecting Odor-Active Sulfur Compounds during Wine Bottle Storage. U: Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages, (Qian, M., Shellhammer, T., H., ured.), American Chemical Society, Washington DC, str. 189-200.

- Ugliano, M. (2013) Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6125-6136.
- Ullrich, S., Neef, S., K., Schmarr, H. (2017) Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis of low-molecular-weight sulfur volatiles with pulsed flame photometric detection and quantification by a stable isotope dilution assay. *J. Sep. Sci.* **1520**, 1-11.
- Vallet, A., Santarelli, X., Lonvaud- Funel, A., de Revel, G., Cabanne, C. (2009) Purification of an alcohol dehydrogenase involved in the conversion of methional to methionol in *Oenococcus oeni* IOEB 8406. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 87–94.
- Vela, E., Hernandez-Orte, P., Franco-Luesma, E., Ferreira, V. (2017) Micro-oxygenation does not eliminate hydrogen sulfide and mercaptans from wine; it simply shifts redox and complex-related equilibria to reversible oxidized species and complexed forms. *Food Chem.* **243**, 222–230.
- Vinas, P., Campillo, N. (2019) Gas Chromatography: Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods. U: Polyphenols in Plants, (Watson, R., R., ured.) Academic Press, London, str. 285-316.
- Viviers, M., Z., Smith, M., E., Wilkes, E., Smith, P. (2013) Effects of Five Metals on the Evolution of Hydrogen Sulfide, Methanethiol, and Dimethyl Sulfide during Anaerobic Storage of Chardonnay and Shiraz Wines. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 12385–12396.
- Rauhut, D., Kiene, F. (2019) Aromatic Compounds in Red Varieties. U: Red Wine Technology, (Morata, A., ured.), Academic Press, Madrid, str. 273-282.
- Robinson, A., L., Boss, P., K., Solomon, P., S., Trengove, R., D., Heymann, H., Ebeler, S., E. (2013) Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am. J. Enol. Vitic.* **65**, 1-24.
- Rouessac, F., Rouessac, A. (2007) Chemical Analysis, 2. izd., John Wiley, Chichester.
- Slaghenaufi, D., Tonidandel, L., Moser, S., Villegas, T., R., Larcher, R. (2017) Rapid Analysis of 27 Volatile Sulfur Compounds in Wine by Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* **10**, 3706–3715.

Smith, M., E. Bekker, M., Z., Smith, P., A., Wilkes, E., N. (2015) Sources of volatile sulfur compounds in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **21**, 705–712.

Sparkman, D., O., Penton, Z., E., Kitson, F., G. (2011) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, Academic Press, London, str. 15-83.

Tufariello, M., Pati, S., D'Amico, L., Bleve, G., Losito, I., Grieco, F. (2019) Quantitative issues related to the headspace-SPME-GC/MS analysis of volatile compounds in wines: the case of Maresco sparkling wine. *LWT - Food Sci. Technol.* **108**, 268-276.

Yao, X., McShane, A., J., Castillo, M., J. (2013) Quantitative Proteomics in Development of Disease Protein Biomarkers. U: *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*, (Issaq, H., J., Veenstra, T., D., ured.), Academic Press, London, str. 259-272.

Ye, D., Y., Zheng, X., T., Xu, X., Wang, Y., H., Duan, C., D., Liu, Y., L. (2016) Evolutions of volatile sulfur compounds of Cabernet Sauvignon wines during aging in different oak barrels. *Food Chem.* **202**, 236-246.

Xian, F., Li, S., Liu, S. (2015) Rapid Biosynthesis of Stable Isotope-Labeled Peptides from a Reconstituted In Vitro Translation System for Targeted Proteomics. *Method Enzymol.* **565**, 347-366.

Qian, M., C., He, J., Peck, J., Sole, R. (2014) Comparison of Screw Cap and Cork Closure Effect on Volatile Sulfur Development during Post Bottle Ageing. U: *Flavour Science*, (Ferreira, V., Lopez, R. ured.), Academic Press, San Diego, str. 267-271.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj

izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Darija Đukić

Ime i prezime studenta