

Kemijske opasnosti u jakim alkoholnim pićima

Ćurin, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:008271>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Ema Ćurin
0006034717

**KEMIJSKE OPASNOSTI U JAKIM ALKOHOLNIM
PIĆIMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Kemijske opasnosti u jakim alkoholnim pićima

EMA ĆURIN, 0006034714

Sažetak:

Jaka alkoholna pića sadrže, uz etilni alkohol, i brojne druge sastojke koji doprinose aromi i cjelokupnoj kvaliteti pića, ali i mnoge koji u previsokim koncentracijama mogu biti štetni za ljudsko zdravlje. Takvi kemijski spojevi su, primjerice, etil karbamat, cijanovodična kiselina, metanol, viši alkoholi, patulin i ftalati. Zbog opasnosti koju mogu predstavljati, njihove su koncentracije u jakim alkoholnim pićima regulirane zakonom te je važno da se tijekom proizvodnje te propisane granice i poštuju. Kako bi se osiguralo da koncentracije tih spojeva ne prelaze maksimalne razine, mogu se provoditi različiti postupci za snižavanje njihovih koncentracija. Brojnim istraživanjima razvijene su analitičke metode za određivanje koncentracija ovih spojeva čime se može odrediti zadovoljavaju li konačni proizvodi zakonom propisane maksimalne razine. U ovome radu opisani su navedeni kemijski spojevi, zakonska regulativa, metode određivanja njihovih koncentracija te metode redukcije njihove koncentracije u jakim alkoholnim pićima.

Ključne riječi: etil karbamat, cijanovodična kiselina, metanol, patulin, ftalat

Rad sadrži: 27 stranica, 2 slike, 3 tablice, 30 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Komentor:

Pomoć pri izradi:

Datum obrane: 29. lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Chemical dangers in strong alcoholic beverages

Ema Ćurin, 0006034714

Abstract:

Strong alcoholic beverages contain, besides ethyl alcohol, many other components that contribute to the flavour and overall quality of the beverage, but also those that in too high concentrations can be harmful to the human health. Examples of those chemical compounds are ethyl carbamate, hydrocyanic acid, methanol, higher alcohols, patulin and phthalates. Because of the danger they can represent, their concentrations in strong alcoholic beverages are regulated and it is important that during the production those limits are followed. In order to insure that the concentrations of these compounds don't exceed set maximum levels, many different methods and operations can be implemented. Numerous studies have revealed the best ways to detect these compounds whereby it can be determined whether the finished product satisfies legally set maximum limits. In this paper the above mentioned chemical compounds, the legislation, the methods of detection and the method of reduction are described.

Keywords: ethyl carbamate, hydrocyanic acid, methanol, patulin, phthalates

Thesis contains: 27 pages, 2 figures, 3 tables, 30 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Jasna Mrvčić, Full Professor

Co-mentor:

Technical support and assistance:

Thesis defended: June 29, 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA I PODJELA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA.....	2
2.2. KEMIJSKE OPASNOSTI U JAKIM ALKOHOLNIM PIĆIMA	5
2.2.1. ETIL KARBAMAT	5
2.2.2. CIJANOVODIČNA KISELINA	7
2.2.3. METANOL	8
2.2.4. VIŠI ALKOHOLI	11
2.2.5. PATULIN	12
2.2.6. FTALATI.....	13
2.3. ZAKONSKA REGULATIVA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA	14
2.4. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE KEMIJSKI OPASNIH KOMPONENTI U JAKIM ALKOHOLNIM PIĆIMA	18
2.5. METODE SNIŽAVANJA KONCENTRACIJE KEMIJSKI OPASNIH KOMPONENTI U JAKIM ALKOHOLNIM PIĆIMA	22
3. ZAKLJUČCI.....	26
4. POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

Jaka alkoholna pića već su stoljećima dio ljudske svakodnevice te se konzumiraju u različitim prigodama, bilo uz hranu, bilo sama. Početak proizvodnje jakih alkoholnih pića može se pronaći u 11. stoljeću kada je otkriveno da se hlađenjem mogu kondenzirati lakše hlapljivi spojevi. Time je otkriven postupak destilacije koji se smatra primarnim načinom proizvodnje jakih alkoholnih pića. Jaka alkoholna pića popularna su diljem svijeta, no u određenim državama određena pića proizvode se i konzumiraju u većim količinama pa se zato smatraju karakterističnim za tu državu. Tako se, primjerice, uz Meksiko veže tekila, uz Jamajku rum, uz slavenske države šljivovica te uz Rusiju votka. Isto tako, ista vrsta jakih alkoholnih pića može se razlikovati po sadržaju sastojaka od države do države zbog različitih postupaka proizvodnje, sirovina, klimatskih uvjeta, tradicija, zakona i drugih čimbenika koji mogu utjecati na sam proizvod (Grba i Stehlik-Tomas, 2010).

Osim etilnog alkohola, kao glavnog sastojka, jaka alkoholna pića mogu sadržavati brojne druge sastojke, koji mogu potjecati od sirovina, biti nusproizvodi fermentacije, destilacije ili pak nastajati tijekom odležavanja jakih alkoholnih pića. Neki od tih sastojaka mogu doprinosti aromi i organoleptičkim svojstvima te sveukupno pozitivno utjecati na kvalitetu pića, no postoje i sastojci koji u previsokim koncentracijama narušavaju kvalitetu proizvoda te mogu čak biti i štetni za ljudsko zdravlje.

U ovome su radu opisani upravo takvi sastojci, koji, ako se u jakim alkoholnim pićima nađu u previsokim koncentracijama, predstavljaju opasnost za potrošače. Kemijski kontaminanti koji će biti obrađeni su etil karbamat, cijanovodična kiselina, metanol, viši alkoholi, patulin i ftalati. Zbog štete koju mogu uzrokovati za ljudsko zdravlje, izrazito je važno da njihove koncentracije u jakim alkoholnim pićima budu strogo regulirane te da se u gotovim proizvodima provodi analiza njihovih sadržaja kako bi se osiguralo da njihove koncentracije ne prelaze maksimalno dopuštene razine. Sukladno će tome u radu, uz opis samih spojeva, biti opisana i zakonska regulativa u Republici Hrvatskoj, metode određivanja njihovih koncentracija te metode redukcije istih.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija i podjela jakih alkoholnih pića

Prema Pravilniku, jakim alkoholnim pićima mogu se smatrati sva pića koja su namijenjena ljudskoj potrošnji, koja imaju posebna senzorska svojstva, sadrže minimalno 15 % alkohola te su proizvedena ili izravno (destilacijom, maceracijom ili dodavanjem aroma, šećera ili sladila) ili miješanjem jakog alkoholnog pića s drugim alkoholnim pićima (NN 61/2009).

Jaka alkoholna pića mogu biti podijeljena na puno načina, prema različitim kriterijima. Prema Mrvčić i sur. (2012), jaka alkoholna pića mogu se, prema vrsti i načinu proizvodnje, podijeliti na čiste destilate te na likere i miješana pića. Drugi je način podjele, prema Grba i Stehlik-Tomas (2010), na temelju sadržaja alkohola i šećera u konačnom proizvodu te vrsti sirovine i tehnološkog postupka. Tada se jaka alkoholna pića dijele na prirodna jaka alkoholna pića, umjetna jaka alkoholna pića i aromatizirana vina. Prirodna jaka alkoholna pića proizvode se destilacijom fermentiranih sirovina. Ovisno o vrsti sirovine, ona sadrže karakteristične arome te se dijele na voćne, žitne, šećerne i aromatizirane rakije. Voćne rakije najčešće dobivaju svoja imena prema voću koje se koristi kao sirovina za proizvodnju pa tako i postoje šljivovica, jabukovača, kruškovača, lozovača i mnoge druge. Karakteristično za proizvodnju žitnih rakija je upotreba amilolitičkih enzima za hidrolizu škroba, koji je glavni sastojak sirovine žitnih rakija. Time se iz škroba dobivaju monosaharidi i disaharidi, šećeri koje kvasci, za razliku od škroba, mogu fermentirati do etanola. Primjer žitnih rakija su viski, vodka, genever i gin. Šećerne rakije se proizvode iz sirovina kao što su melasa šećerne trske ili šećerne repe, koje sadrže samo saharozu ili glukozu i fruktozu. U ovu skupinu jakih alkoholnih pića spadaju rum i arrack. Aromatizirane rakije, kao travarica, komovica i orahovica, dobivaju se aromatiziranjem rakija različitim dodacima kao što su voće, aromatsko bilje i slično (Grba i Stehlik-Tomas, 2010).

Kao što je već rečeno, karakteristično za sva prirodna jaka alkoholna pića je da se proizvode destilacijom prevrelih komina. To znači da se sirovina prvo fermentira pomoću kvasaca te se dobivena komina zatim destilira. Alkoholna fermentacija je biokemijski proces kojim se fermentabilni šećeri prevode u etanol i CO₂ pomoću kvasaca. Taj proces može biti spontan (odvija se pomoću mikroorganizama prisutnih u sirovinama) ili kontroliran (koriste se kulture mikroorganizama). Najčešće korišteni kvasci u proizvodnji jakih alkoholnih pića su kvasci roda *Saccharomyces*, a pogotovo vrsta *Saccharomyces cerevisiae*.

Destilacija, koja slijedi nakon fermentacije, je proces u kojem se hlapljive komponente tekućine zagrijavanjem prvo prevode u plinovito stanje, a zatim se hlađenjem kondenziraju u destilat. Cilj ovog procesa tijekom proizvodnje jakih alkoholnih pića je izdvajanje etanola u što većem udjelu, zajedno s poželjnim, hlapljivim tvarima arome, kako bi se postigao kvalitetan konačan proizvod. Tradicionalni uređaj za provođenje destilacije je alambik kotao, koji sadrži kotao za zagrijavanje tekućine i hladilo (kondenzator) u kojem se pare ponovo prevode u tekuće stanje te iz kojeg izlazi destilat. Kotao sadrži i „glavu“ koja služi za skupljanje para te „lulu“ za prenošenje para do hladila. Budući da tvari koje nastanu tijekom fermentacije nisu sve poželjne, tijekom destilacije one se nastoje izdvojiti tako da ne narušavaju kvalitetu i okus konačnog destilata. S tim se ciljem destilacija često provodi dvokratno te frakcijski. Prva frakcija koja se hvata naziva se prvijenac te sadrži velik udio etanola, ali i nepoželjnih, štetnih spojeva kao što su aldehidi i metanol. Nakon nje slijedi glavni dio destilata, takozvano srce, koje predstavlja kvalitetnu frakciju s najmanje nepoželjnih supstanci. Zadnja frakcija koja se izdvaja, patoka, sadrži puno viših alkohola i organskih kiselina koji nisu poželjni u konačnom proizvodu jer mu narušavaju kvalitetu. Ako se želi postići posebna čistoća alkohola, kao, primjerice, pri proizvodnji vodke, može se za destilaciju koristiti kotao s kolonom u kojem se provodi rektifikacija. To podrazumijeva višekratni kontakt između pare i tekućine, gdje se na svakom „podu“ kolone dio pare, s teže hlapljivim komponentama, kondenzira, a dio tekućine, s lakše hlapljivim komponentama, isparava. Na taj se način osigura da se veće količine, lakše hlapljivog etanola nađu u destilatu, dok mnogi nepoželjni i teže hlapljivi spojevi zaostanu u kotlu, te se dobije piće veće čistoće, nego kada se koristi klasični alambik kotao.

Umjetna jaka alkoholna pića mogu se proizvesti na više načina. Može se provoditi maceracija sirovina u alkoholu i destilacija macerata, često uz dodatak etilnog alkohola i tvari arome. Alkohol korišten za maceraciju je u pravilu rafinirani etilni alkohol poljoprivrednog porijekla, a macerirati se mogu voće, aromatsko i ljekovito bilje, začini i slične sirovine. Ova pića sadrže svojstva karakteristična za sirovine iz kojih su proizvedena, ali mogu biti i oplemenjena na različite načine. Aromatizirana vina (npr. vermut i bermet) proizvode se pak dodavanjem aromatskih supstanci fermentiranim voćnim sokovima s ili bez dodatka etilnog alkohola i šećera (Grba i Stehlik-Tomas, 2010).

Kako bi se poboljšala kvaliteta konačnog proizvoda, jaka alkoholna pića prolaze kroz jedan zadnji korak obrade, tj. dozrijevanje ili starenje. To je proces kojim se piće oplemenjuje prirodnim putem te se može provoditi u različitim vrstama posuda pa se tako često provodi i u

drvenim bačvama. Ovim postupkom, s vremenom, dolazi do procesa esterifikacije čime se dobivaju različite poželjne tvari arome. Ako proizvod dozrijeva u drvenim bačvama, što je često kod viskija, ruma i vinjaka, dolazi do obogaćivanja proizvoda komponentama iz drva, kao što su različiti fenolni spojevi, laktoni, šećeri i slično. Time se osim arome, mijenjaju i okus i boja pića.

Uz etilni alkohol, gotova jaka alkoholna pića imaju i mnoge druge sastojke koji utječu na njihovu kvalitetu i pojedine značajke. Tako uz etanol i vodu, koja najčešće čini najveći udio proizvoda, mogu se naći i različita sladila te tvari arome i boje, koji se mogu dodavati tijekom proizvodnje. Također, brojne sastojke čine različiti nusproizvodi alkoholne fermentacije, kao što su glicerol, različiti karbonilni spojevi (acetaldehid, diacetil itd.), organske kiseline (octena, mliječna, propionska itd.), viši alkoholi (izoamil alkohol, izobutanol, butanol, propanol itd.), masne kiseline (kapronska, kaprinska itd.), esteri (etil acetat, izobutil acetat itd.), metanol, etil karbamat i mnogi drugi. Kod proizvoda koji se dobivaju destilacijom važno je naglasiti da će, uz etanol, dio gore spomenutih nusproizvoda fermentacije također prijeći u destilat te samom destilacijom mogu čak i nastati neki novi sastojci (npr. aldehidi, etil acetat, furfural...). Kao što je gore već spomenuto, u jakim alkoholnim pićima razni se novi sastojci mogu formirati i tijekom faze dozrijevanja.

Od svih sastojaka koji se nalaze u konačnom proizvodu brojni se smatraju poželjnima jer pozitivno utječu na aromu, okus i cjelokupnu kvalitetu pića, ali su brojni i nepoželjni jer narušavaju kvalitetu pića ili su čak i štetni za ljudsko zdravlje. Često se može dogoditi da su neki sastojci poželjni u niskim koncentracijama i tako, primjerice, poboljšavaju aromu proizvoda, dok su u višim koncentracijama nepoželjni i štetni (npr. etil acetat, acetaldehid, viši alkoholi...).

Različite komponente gotovih jakih alkoholnih pića mogu se smatrati nepoželjnima zato što narušavaju aromu, okus, boju ili općenitu kvalitetu proizvoda, ali one kojima će se ovaj rad baviti također mogu biti i štetne za ljudsko zdravlje te su zato i nazvane kemijskim opasnostima koje se mogu naći u jakim alkoholnim pićima. Postoji mnogo takvih sastojaka, no one na koje je ovaj rad fokusiran su sljedeće: etil karbamat, cijanovodična kiselina, metanol, viši alkoholi, patulin i ftalati. Budući da ti sastojci mogu narušavati ljudsko zdravlje, izrazito je važno da njihove koncentracije u jakim alkoholnim pićima budu pomno praćene i regulirane. Iz tog razloga u većini država postoji zakonska regulativa koja točno određuje dopuštene koncentracije ovih sastojaka u pojedinim pićima.

2.2. Kemijske opasnosti u jakim alkoholnim pićima

U jakim alkoholnim pićima tijekom proizvodnje mogu nastati razne kemijske opasnosti u obliku sastojaka koji, u previsokim koncentracijama, ugrožavaju ljudsko zdravlje. Ti kemijski kontaminanti mogu nastati u različitim fazama proizvodnje, a neki od najčešće zastupljenih i koji se opisuju u ovome radu su etil karbamat, cijanovodična kiselina, metanol, viši alkoholi, patulin i ftalati.

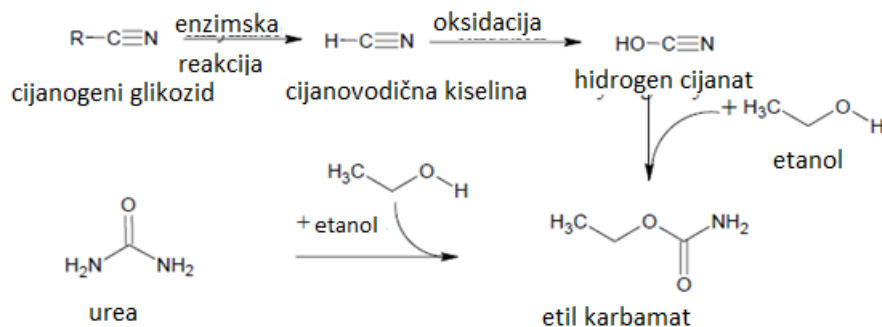
2.2.1. Etil karbamat

Etil karbamat je etilni ester karbaminske kiseline, koji može nastati kao nusproizvod fermentacije i obrade hrane i pića. Zato se naziva i procesnim kontaminantom. Za razliku od hrane, u kojoj se etil karbamat obično nalazi u nižim koncentracijama, alkoholna pića ga mogu često sadržavati u povišenim koncentracijama. Također, iako etil karbamat može nastati na više različitih načina, glavni način nastajanja je reakcijom etanola s različitim tvarima. Iz ovih su razloga većina istraživanja o nastajanju etil karbamata fokusirana na njegovu pojavu u alkoholnim pićima (Abt i sur., 2021).

Provođenjem opsežnih istraživanja pokazalo se da bi etil karbamat mogao biti humani kancerogen. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je 1974. klasificirala etil karbamat kao kancerogen Grupe 2B (mogući kancerogen), a zatim ga je 2007. proglasila kancerogenom Grupe 2A (vjerojatni kancerogen) (EFSA, 2007). Zbog njegovog štetnog, odnosno kancerogenog učinka na ljudski organizam, razvijene su različite analitičke metode za detekciju etil karbamata te redukciju njegove sinteze tijekom proizvodnje jakih alkoholnih pića, ali i drugih proizvoda. Također se, iz istog razloga, javila i potreba za regulacijom njegove koncentracije i određivanjem dopuštenih granica u hrani i pićima (Abt i sur., 2021).

Etil karbamat nastaje u reakciji između etanola i raznih tvari, kao što su cijanovodična kiselina, urea, citrulin, cijanogeni glikozidi i spojevi s funkcionalnom grupom estera karbamata. Sinteza etil karbamata može se katalizirati pomoću topline, pH, UV zračenja, određenih metala i uvjeta skladištenja (Abt i sur., 2021). Prisutnost pojedinih prekursora etil karbamata ovisi o mikroorganizmima koji se koriste tijekom fermentacije. Razgradnjom arginina pomoću kvasaca dobiva se urea, koja reagira s etanolom i daje etil karbamat (slika 1). Česti prekursori etil karbamata su također cijanogeni glikozidi, kao što je, primjerice, amigdalín. Oni nastaju u

košticama plodova košunjicačavog voća, koja se često koriste u proizvodnji jakih alkoholnih pića. Enzimskom hidrolizom cijanogenih glikozida nastaje cijanovodična kiselina (slika 1). Ona se zatim oksidira do hidrogen cijanata koji u reakciji s etanolom stvara etil karbamat (Gowd i sur., 2018). Zbog velike količine cijanogenih glikozida u košticama, jaka alkoholna pića proizvedena iz košunjicačavog voća imaju višu koncentraciju etil karbamata od drugih jakih alkoholnih pića.



Slika 1. Sinteza etil karbamata iz etanola i hidrogen cijanata (gore) ili iz etanola i uree (dolje) (prema EFSA, 2007)

Kao što je već spomenuto, etil karbamat je proglašen kancerogenim spojem te je iz tog razloga Europska komisija zatražila od Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) da procijene koliki rizik za zdravlje potrošača predstavljaju etil karbamat i cijanovodična kiselina, kao prekursor etil karbamata, u hrani i pićima, a specifično u alkoholnim pićima. EFSA je provela istraživanje u kojemu su ispitivali koncentracije etil karbamata i cijanovodične kiseline u uzorcima hrane i pića podnesenih od strane velikog broja država diljem svijeta. Tako su sedam zemalja članica Europske unije, Odbor za kontrolu alkoholnih pića u Ontariju te Vinski institut Kalifornije podnijeli rezultate analiza etil karbamata iz vremenskog razdoblja od 1998. do 2006. godine. Tri zemlje članice EU podnijele su i podatke o cijanovodičnoj kiselini u alkoholnim pićima. EFSA je primila preko 33 000 rezultata analize alkoholnih pića. Od toga su za 93 % uzoraka piva, 42 % uzoraka vina i manje od 15 % uzoraka jakih alkoholnih pića podneseni rezultati etil karbamata bili ispod razine detekcije. Izračunati medijan razine etil karbamata je iznosio do 5 µg/L za pivo i vino, 21 µg/L za jaka alkoholna pića, izuzev voćnih rakija, te 260 µg/L za voćne rakije. Od svih podnesenih uzoraka najviše razine etil karbamata

imale su voćne rakije, pogotovo one proizvedene od košunjčavog voća. 68.9 % rezultata iz voćnih rakija bilo je iznad 100 µg/kg, 20.2 % iznad 1000 µg/kg i sedam rezultata iznad 10 000 µg/kg. Kod ostalih jakih alkoholnih pića 10.4 % uzoraka imalo je vrijednosti etil karbamata iznad 100 µg/kg, a samo 0.7 % iznad 1000 µg/kg.

Na temelju rezultata ovog istraživanja procijenjena je izloženost potrošača etil karbamatu te njegov prosječni dnevni unos. Zaključeno je da procijenjeni dnevni unos etil karbamata samo kroz hranu ne predstavlja veliki rizik. Međutim, kada je procijenjen dnevni unos kroz hranu i alkoholna pića zajedno, zaključeno je da etil karbamat predstavlja opasnost za zdravlje potrošača, s naglaskom na jaka alkoholna pića proizvedena iz košunjčavog voća. Iz tog je razloga potrebno regulirati njegove koncentracije u raznim proizvodima, pa tako i jakim alkoholnim pićima, te je potrebno provesti razne mjere kako bi se njegove koncentracije tijekom proizvodnje također reducirale (EFSA, 2007).

2.2.2. Cijanovodična kiselina

Cijanovodična kiselina, često zvana i hidrojeni cijanid, je slaba kiselina koja, kao što je već ranije opisano, nastaje enzimskom hidrolizom cijanogenih glikozida. Sami cijanogeni glikozidi, kao što su amigdalini i prunazini, prirodni su i relativno netoksični sastojci raznih biljaka, uključujući i košunjčavo voće. Oni se nalaze u košticama tog voća te su u samoj stanici fizički odvojeni od specifičnih enzima, β-glukozidaza, koje kataliziraju njihovu razgradnju. To znači da opasna cijanovodična kiselina ne će nastajati sve dok se koristi cijelo, neuništeno voće. Samim procesom obrade voća, njegovim gnječenjem i mljevenjem dolazi do razbijanja koštica te iniciranja enzimske hidrolize cijanogenih glikozida (Balcerek i Szopa, 2012). Cijanovodična kiselina može se osloboditi i iz neoštećenih koštica tijekom dugotrajnog skladištenja prevrele komine. Vrijedno je naglasiti da se tijekom destilacije koncentracija cijanovodične kiseline može povisiti u svim frakcijama (EU, 2016).

Cijanovodična kiselina, odnosno cijanidi sami su po sebi toksični za ljude, ali glavni razlog regulacije njihovih koncentracija je, kao što je već spomenuto, činjenica da je cijanovodična kiselina jedan od glavnih prekursora za sintezu etil karbamata, poznatog kancerogena. Iz tog je razloga kod proizvodnje jakih alkoholnih pića potrebno ukloniti koštice prije obrade voća kako bi se koncentracije cijanovodične kiseline zadržale ispod granica. Neki proizvođači ipak ne uklanjaju koštice iz voća, zato što time može doći do promjene aromatskog profila pića te

oni preskakanjem ovog koraka štede na vremenu i novcu tijekom proizvodnje. Posljedica toga može biti povišena koncentracija cijanovodične kiseline, a time i kancerogenog etil karbamata u proizvodu. Ova pojava je česta u državama u kojima je popularna domaća proizvodnja kod koje ne postoji stroga kontrola. U takvim državama u Europi, kao što su Mađarska, Litva, Poljska, Rusija i Ukrajina, provedena su istraživanja koja su pokazala da su razine etil karbamata prešle dozvoljene granice. Osim u koštunjičavom voću, cijanogeni glikozidi mogu se naći i u drugim sirovinama korištenim za proizvodnju jakih alkoholnih pića, kao što su žitarice, šećerna trska i manioka (Abt i sur., 2021).

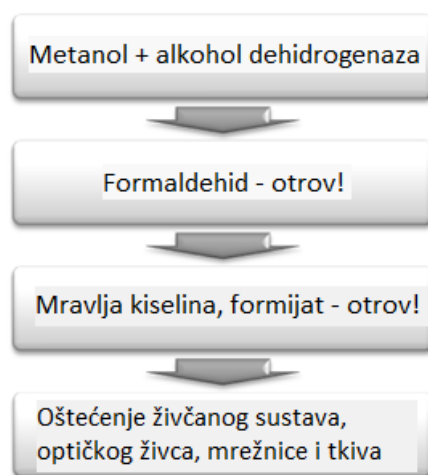
U istraživanju koje je Europska agencija za sigurnost hrane provela na zahtjev Europske komisije kako bi se utvrdio rizik koji etil karbamat i cijanovodična kiselina predstavljaju za zdravlje potrošača, i o kojem je riječ već bila u poglavlju o etil karbamat, ispitana je koncentracija cijanovodične kiseline u određenom broju uzoraka. Od 716 analiziranih uzoraka njih 685 bilo je od voćnih rakija, koje inače pokazuju više razine cijanovodične kiseline. U ispitanim uzorcima razine cijanovodične kiseline bile su raznolike. Tako je u jednom uzorku viskija koncentracija bila 13 µg/kg, u jednom uzorku vina 149 µg/kg, u jednom uzorku cachace 300 µg/kg, u osam uzoraka vinjaka između 130 – 880 µg/kg, u četiri uzoraka destilata 120 – 5000 µg/kg i u voćnim rakijama 25 – 70 000 µg/kg. U dva uzorka, odnosno 0.3 % ispitanih uzoraka razina cijanovodične kiseline bila je viša od trenutno maksimalno dozvoljene. Na temelju ovih rezultata te budući da je cijanovodična kiselina jedan od prekursora kancerogenog etil karbamata, zaključeno je da je i njene razine potrebno regulirati s ciljem održavanja kvalitete i sigurnosti jakih alkoholnih pića (EFSA, 2007).

2.2.3. Metanol

Metanol je najjednostavniji alifatski alkohol koji tijekom proizvodnje jakih alkoholnih pića nastaje prirodnim putem, ali je u višim koncentracijama, zbog svoje toksičnosti, nepoželjan. Konzumiranjem 10 mL čistog metanola može doći do trajne sljepoće, dok konzumiranje 30 mL može dovesti do smrti (Pang i sur., 2017). Simptomi trovanja metanolom su gubitak svijesti, vrtoglavica, slabost i poteškoće u disanju, zamućeni vid i sljepoća, gubitak težine, glavobolja, bolovi u abdomenu, mučnina, dijareja i povraćanje. U većini jakih alkoholnih pića metanol je prisutan u niskim koncentracijama i ne izaziva nikakve probleme u zdravlju ljudi, ali se iz različitih razloga ta koncentracija može povisiti i uzrokovati razne poteškoće pa čak i

smrt. Zato je potrebno provoditi kontinuiranu kontrolu proizvodnje jakih alkoholnih pića kako bi koncentracija metanola ostala unutar dozvoljenih granica (Ohimain, 2016).

U ljudskom se organizmu razgradnjom metanola dobivaju toksični metaboliti, formaldehid, mravlja kiselina i formijat (slika 2). Djelovanjem enzima alkohol dehidrogenaze iz metanola nastaje formaldehid te zatim pomoću aldehyd dehidrogenaze iz njega nastaje mravlja kiselina (Destanoğlu i Ateş, 2019). Ovi su metaboliti jako opasni, pogotovo za živčani sustav te optički živac i tkiva. Oni mogu dovesti do oštećenja optičkog živca, zatajenja dišnog sustava, kome, cerebralnog edema ili smrti (Vaskova, 2014).



Slika 2. Proces konverzije metanola u ljudskom tijelu (prema Vaskova, 2014)

Najčešći izvor metanola u jakim alkoholnim pićima je sirovina koja se koristi u proizvodnji. Metanol nastaje iz pektina, koji je sastavni dio voća, pa kada je u voću prisutna veća količina pektina dobiva se i veća količina metanola u konačnom proizvodu. Pektini su heterogeni polisaharidi koji se javljaju u unutarstaničnim regijama te staničnim stijenkama u većini voća i povrća. Posebno velike količine pektina prisutne su u citrusima, kao što su naranče, grožđe, limeta i limun. Djelovanjem pektolitičkih enzima dolazi do razgradnje pektina, pri čemu pektolitičke enzime možemo razdvojiti na esteraze i depolimeraze (liaze i hidrolaze). Razgradnjom pektina pomoću liaza nastaju oligo- i monogalakturonati, dok su pektinska kiselina i metanol produkti hidrolize pektina pomoću esteraza, kao što je pektin metil esteraza (PME). Pektolitički enzimi nalaze se u samom voću te se s vremenom, kako voće sve više sazrijeva, oni aktiviraju te djelovanjem pektin metil esteraze dolazi do hidrolize pektina i

nastajanja metanola. Ako se kao sirovina koristi prezrelo voće povećana je šansa za razgradnjom pektina pektolitičkim enzimima prirodno prisutnim u voću i povišenom koncentracijom metanola. Pektolitičke enzime, osim samih biljaka, proizvode i mikroorganizmi. Ti su enzimi prisutni u većini patogenih i saprofitnih bakterija i gljiva pa tako i kvasaca koji se koriste tijekom fermentacije. Iz tog je razloga moguće da će se metanol razviti kao nusproizvod fermentacije djelovanjem kulture mikroorganizama koja se koristi za dobivanje etanola. Na proizvodnju metanola može utjecati količina i starost sirovina, temperatura sterilizacije, sadržaj pektina te aktivnost pektolitičkih enzima, odnosno, najvažnije, aktivnost pektin metil esteraze (Ohimain, 2016).

Metanol može u jakim alkoholnim pićima biti prisutan u višim koncentracijama i kada se fermentacija provodi pomoću mješovite kulture, koja uz kvasac *Saccharomyces cerevisiae* sadrži i druge mikroorganizme. Oni dovode do sinteze više koncentracije različitih nusproizvoda fermentacije, kao što je primjerice metanol. Također je nakon provedenih istraživanja ustanovljeno da određeni sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* imaju malo drugačiji metabolizam te proizvode metanol u većim količinama (Ohimain, 2016).

Dodatan problem u vezi metanola, koji se događa tijekom proizvodnje, je činjenica da je metanol jako hlapljiv te ima nižu temperaturu vrenja (65 °C) od etanola (78 °C). Zbog toga se mora posebno paziti tijekom provođenja destilacije kako bi se metanol što više odvojio od etanola, budući da će se metanol koncentrirati i zato u destilatu nalaziti u previsokoj koncentraciji za ljudsku potrošnju (Ohimain, 2016).

Mrvčić i sur. (2021) proveli su istraživanje u kojem su analizirali kemijska i senzorska svojstva 47 voćnih rakija s područja jugoistočne Europe. Oni su, uz sadržaj viših alkohola i estera, analizirali i sadržaj metanola. Prikupljeni uzorci su bili iz pet država jugoistočne Europe (Hrvatska, Srbija, Bosna i Hercegovina, Slovenija i Crna Gora) te ih je 12 bilo proizvedeno u industrijskim postrojenjima, a 35 u malim destilerijama. Koncentracija metanola je u svim uzorcima bila ispod maksimalno dopuštene razine postavljene u Europskoj uniji, a tako i u Republici Hrvatskoj. Prosječna koncentracija metanola u svim je uzorcima, uz neke iznimke, bila između 400-650 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola). Najveće odstupanje od te prosječne koncentracije metanola pokazivale su rakije od kruške viljamovke. Njene prosječne koncentracije bile su u rasponu 777.72-1271.38 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola), što je i dalje ispod maksimalne razine koja je zakonom propisana na 1350 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola). Osim nekih iznimki, rezultati ovog istraživanja odgovarali su podacima

u literaturi i iz drugih istraživanja na tržištu. To ukazuje na činjenicu da su na tržištu uglavnom prisutni proizvodi dobre kvalitete u kojima se koncentracije metanola održavaju ispod granica, no to ne znači da treba popustiti oprez prilikom proizvodnje jakih alkoholnih pića. Vrlo je važno da se tijekom proizvodnje kontinuirano vodi računa o mogućim opasnostima te da se reguliraju koncentracije opasnih spojeva kao što je metanol.

2.2.4. Viši alkoholi

Alkoholna fermentacija, osim etanola kao glavnog proizvoda, ima mnoge nusproizvode. Između ostalih tako nastaju i viši alkoholi. Kao i drugi nusproizvodi, viši alkoholi imaju veliki utjecaj na aromu jakih alkoholnih pića te su oni zato nužni sastojci. Koliko su važni može se vidjeti i po tome da u nekim državama postoje minimumi sadržaja viših alkohola u jakim alkoholnim pićima. Viši alkoholi su zapravo svi alkoholi koji imaju više od dva ugljikova atoma, a u jakim alkoholnim pićima najčešće su prisutni propanol, butanol, izobutanol i izoamil alkohol (Pang i sur., 2017).

Dok u niskim koncentracijama viši alkoholi mogu biti poželjne tvari arome, u višim koncentracijama oni mogu imati toksično djelovanje te biti štetni za zdravlje ljudi. Viši alkoholi uzrokuju glavobolje, žeđ i druge simptome nakon konzumiranja jakih alkoholnih pića (Sun i sur., 2021). Također, visoke koncentracije viših alkohola u jakim alkoholnim pićima mogu uzrokovati povećano oštećenje jetre (Lachenmeier i sur., 2008).

Viši su alkoholi, kao nusproizvodi alkoholne fermentacije, istraživani i proučavani već stoljećima. Isprva se mislilo da oni nastaju kao metaboliti zbog bakterijske kontaminacije jakih alkoholnih pića. Kasnije, početkom 20. stoljeća, Ehrlich je ustanovio da su viši alkoholi prirodni metaboliti kvasaca proizvedeni iz aminokiselina (Lachenmeier i sur., 2008). Daljnjim je istraživanjima utvrđeno da se viši alkoholi sintetiziraju različitim metaboličkim putevima. Potvrđeno je Ehrlichovo otkriće da se viši alkoholi sintetiziraju kataboličkim putem iz aminokiselina, ali je utvrđeno da se sintetiziraju i anaboličkim putem, kao nusproizvodi sinteze aminokiselina iz piruvata. Koncentracije viših alkohola koje će biti proizvedene tijekom alkoholne fermentacije ovise o mnogo faktora. To su vrsta sirovine, soj kvasca, volumen inokuluma, temperatura, razne tvari koje se dodaju hranjivoj podlozi, kao što su minerali, vitamini, masne kiseline i aminokiseline, te mnogi drugi (Pietruszka i sur., 2010).

Iako viši alkoholi, kada su u jakim alkoholnim pićima prisutni u višim koncentracijama,

predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi, u nižim koncentracijama oni su poželjni jer doprinose ukupnoj aromi tako da joj daju poželjne, voćne note. Također treba naglasiti da uz štetu na zdravlje u višim koncentracijama oni daju neugodnu aromu na otapalo.

Lachenmeier i suradnici (2008) proveli su istraživanje na europskom tržištu te su analizirali 290 uzoraka iz svih grupa jakih alkoholnih pića karakterističnih za to područje. Određivanjem koncentracije viših alkohola ustanovili su da ona u prosjeku iznosi 400 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola) te da u većini slučajeva ne prelazi 1000 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola), što po njima predstavlja odgovarajući maksimum koncentracije viših alkohola u jakim alkoholnim pićima. Od svih uzoraka samo je njih pet prelazilo taj maksimum od 1000 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola). Iz tih podataka oni su zaključili da viši alkoholi u jakim alkoholnim pićima u pravilu ne predstavljaju opasnost, budući da njihove koncentracije uglavnom ne prelaze maksimalnu granicu. Naravno, unatoč tome i dalje postoji potreba za strogom kontrolom jakih alkoholnih pića tijekom proizvodnje te regulacijom koncentracije viših alkohola, kao i drugih kontaminanata.

2.2.5. Patulin

Mikotoksini su sekundarni metaboliti koje proizvode organizmi iz carstva *Fungi* te koji mogu predstavljati opasnost za zdravlje ljudi i životinja. Patulin je mikotoksin kojeg najčešće proizvode plijesni rodova *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssoclamys*. On se može naći na plodovima različitog voća, kao što su jabuke, kruške, grožđe i glog, koje se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića te tako uzrokovati njihovu kontaminaciju (Pang i sur., 2017).

Nakon njegovog otkrića u 1940-ima, patulin se isprva smatrao potencijalnim antibiotikom jer je inhibitorno djelovao na rast gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Tek je 60-ih godina 20. stoljeća otkriveno da je on toksičan i za životinjske i biljne stanice, a ne samo za bakterijske, te je zato proglašen mikotoksinom. On može uzrokovati razne neurološke, imunološke i gastrointestinalne poremećaje i bolesti. Kao i za ostale kemijske kontaminante jakih alkoholnih pića, i za patulin su regulatorne agencije postavile maksimalne dopuštene koncentracije te se u proizvodnji provode različite metode redukcije koncentracije patulina. Unatoč tome, u jakim alkoholnim pićima patulin je i dalje često prisutan u koncentracijama koje prelaze dopuštene granice (Ioi i sur., 2017) .

Golge i sur. (2021) su u periodu od 2018. do 2020. godine s područja Turske sakupili 120

uzoraka jakih alkoholnih pića i 40 uzoraka sokova od jabuke te ih analizirali kako bi odredili koncentraciju patulina u njima. U 26.7 % uzoraka sokova od jabuke koncentracija patulina bila je određena u rasponu od 5.8-66.4 µg/L te je samo jedan uzorak imao razinu patulina iznad maksimalno dopuštene. Koncentracija patulina je bila određena do 42.6 µg/L za 11 od 25 uzoraka konjaka, 5 od 40 uzoraka likera, i 1 od 10 uzoraka viskija, dok ni u jednom uzorku vodke patulin nije bio detektiran. Kao što se iz rezultata može vidjeti, u dijelu uzoraka svih pića, osim vodke, patulin je bio detektiran te iako te koncentracije nisu jako visoke niti se nalaze u svim uzorcima, sama prisutnost patulina u nekima ukazuje na potrebu njegove regulacije radi zaštite zdravlja svih potrošača.

2.2.6. Ftalati

Ftalati su esteri ftalne kiseline i alifatskih alkohola. Oni su sintetičkog porijekla te se dodaju plastici kako bi se poboljšala njena mehanička svojstva, kao što su mekoća, savitljivost i rastezljivost. Često se mogu naći u proizvodima za općenitu uporabu, primjerice u igračkama, različitim otapalima, ljepilima, pesticidima, plastičnim pakiranjima za hranu i piće te mnogim drugima.

Mnoga su istraživanja pokazala da ftalati imaju štetno djelovanje na ljudsko zdravlje, posebice na reproduktivni sustav te razvoj ljudi. Ftalati mogu uzrokovati poremećaje endokrinog sustava, zastoje u plodnosti, poremećaje fetalnog razvoja te povećani rizik od astme, alergija te tumora (Karačonji i sur., 2017). Iz tih su razloga različite međunarodne zdravstvene organizacije klasificirale ftalate među prioritetna zagađivala. Tako su, primjerice, dibutil ftalat (DBP), benzil butil ftalat (BBP) te bis(2-etilheksil)ftalat (DEHP), od strane Europske unije, stavljeni na listu spojeva s negativnim utjecajem na endokrini sustav (Jurica i sur., 2013).

Ftalati se ne vežu kemijski za plastiku, stoga lako prelaze iz plastike u okoliš pa tako i u hranu i piće, posebice onu s visokim udjelom masti i alkohola. Uz plastična pakiranja proizvoda, česti izvori kontaminacije ftalatima u jakim alkoholnim pićima, ali i u drugim pićima te hrani, su cijevi, pumpe, tankovi, sintetički čepovi i drugi plastični i gumeni dijelovi opreme korišteni u proizvodnji. Još jedan izvor kontaminacije ftalatima koji valja spomenuti su jaka alkoholna pića domaće i ilegalne proizvodnje u kojima se dietil ftalat dodaje za denaturaciju etilnog alkohola.

Budući da ftalati lakše prelaze u pića s visokim udjelom etanola, jaka alkoholna pića često

imaju više koncentracije ovih kontaminanata u odnosu na vodu i bezalkoholna pića. Iz tog je razloga posebice važno da se razine ftalata u jakim alkoholnim pićima prate i strogo reguliraju (Karačonji i sur., 2017).

Tijekom godina provedena su razna istraživanja s ciljem detekcije ftalata u jakim alkoholnim pićima. Tako su u 20 uzoraka šljivovice s područja središnje i istočne Europe detektirani dietil ftalat (DEP), diizobutil ftalat (DIBP), DBP, BBP i DEHP, dok dimetil ftalat (DMP) i dioktil ftalat (DOP) nisu detektirani u tim uzorcima. DEP je detektiran u koncentraciji od 16.7 µg/L, DIBP 38.3 µg/L, DBP 414.5 µg/L, BBP 78.9 µg/L, a DEHP 423.8 µg/L. Iz rezultata se vidi da su najviše koncentracije imala dva i inače najzastupljenija ftalata, DBP i DEHP (Karačonji i sur., 2017). Zbog prisutnosti raznih ftalata u jakim alkoholnim pićima, kao što ova studija i pokazuje, potrebno je u proces proizvodnje jakih alkoholnih pića uvesti metode koje će njihove koncentracije sniziti te nastaviti strogu kontrolu proizvoda prije puštanja na tržište.

2.3. Zakonska regulativa jakih alkoholnih pića

Jaka alkoholna pića sadrže velik broj različitih sastojaka, od kojih su većina potrebni za postizanje željene kvalitete konačnog proizvoda. Međutim, određeni sastojci, kao, primjerice, oni spomenuti u ovome radu, kada su prisutni u višim koncentracijama, mogu negativno utjecati na ljudsko zdravlje. Iz tog se razloga razvila potreba za reguliranjem koncentracija tih sastojaka, odnosno kemijskih kontaminanata, pomoću različitih zakona i uredbi. Diljem svijeta različite države i internacionalne organizacije postavile su svoje standarde i maksimalne razine za pojedine kontaminante te se one često međusobno razlikuju. To je zato što se od države do države razlikuje i sam proces proizvodnje, sirovine, svojstva proizvoda te količina potrošnje u prehrani potrošača.

Određeni standardi i granice, koji se mogu primjenjivati na internacionalnoj razini, postavljeni su od strane Komisije Codex Alimentarius, internacionalnog tijela zajednički osnovanog od strane Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). U Europskoj uniji koncentracije kemijskih kontaminanata u jakim alkoholnim pićima regulirane su različitim uredbama i propisima, koji su uvedeni uz pomoć Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA). U Sjedinjenim Američkim Državama za ovaj aspekt zakona odgovorna je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA), dok je u Kanadi za

to odgovorno regulatorno tijelo Health Canada te Kanadska agencija za inspekciju hrane (CFIA). Na području Australije i Novog Zelanda djeluje zajedničko regulatorno tijelo Standardi hrane Australije i Novog Zelanda (FSANZ) (Pang i sur., 2017).

Kao članici Europske unije, zakoni i propisi Republike Hrvatske na temu regulacije sadržaja kemijskih kontaminanata u jakim alkoholnim pićima usklađeni su s onima u Europskoj uniji. Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009) određuje maksimalne razine nekih kemijskih kontaminanata spomenutih u ovome radu te se taj Pravilnik nadovezuje na Uredbu (EZ) br. 110/2008 Europskog parlamenta i Vijeća. Iako je Uredba (EZ) br. 110/2008 stavljena izvan snage nakon uvođenja nove Uredbe (EU) br. 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća, sam Pravilnik o jakim alkoholnim pićima nije mijenjan. Međutim, maksimalne dopuštene količine spojeva o kojima se govori u ovome radu ne razlikuju se u ove dvije navedene uredbe. Za Republiku Hrvatsku je tako u Pravilniku određen niz granica za kemijske kontaminante u jakim alkoholnim pićima. Za sam etilni alkohol poljoprivrednog porijekla (96 % vol.), koji se može koristiti u proizvodnji, određena je maksimalna razina metanola, koja iznosi 30 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola), te viših alkohola (izraženih kao 2-metilpropan-1-ol), koja iznosi 0,5 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola).

Maksimalna razina metanola određena je Pravilnikom, pri čemu su za različite vrste pića postavljene različite granice (tablica 1). Tako London gin smije sadržavati samo 5 g metanola/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola), vodka 10 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola), rakija od vina i brandy 200 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola), rakija od voćne komine 1500 g/hL (preračunato na 100 % vol. alkohola) te komovica, rakija od jabučnog vina, rakija od kruškovog vina i rakija od voća smiju sadržavati samo 1000 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola). Kod rakija od voća postoje dvije iznimke od propisanih 1000 g/hL, a to su maksimalna razina metanola od 1200 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola) za rakije od šljiva, mirabela, plavih šljiva, jabuka, krušaka (osim viljamovke), malina, kupina, marelica i breskvi te maksimalna razina metanola od 1350 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola) za rakije od krušaka viljamovki, crvenih i crnih ribiza, oskoruša, bazgi, dunja i borovica.

U Pravilniku je također postavljena maksimalna razina cijanovodične kiseline od 7 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola) za rakije od voćne komine te rakije od voća, ako se kao sirovina koristi koštunjčavo voće (tablica 3).

U Republici Hrvatskoj te Europskoj uniji nema postavljenih maksimalnih razina viših alkohola u jakim alkoholnim pićima (osim već spomenute granice za više alkohole u etilnom alkoholu

poljoprivrednog porijekla). Dapače, na temelju Pravilnika o jakim alkoholnim pićima za neka pića postoje minimalne koncentracije hlapljivih spojeva, a njih najvećim dijelom i čine viši alkoholi (tablica 2). U rumu se mora nalaziti minimalno 225 g hlapljivih spojeva/hL (preračunato na 100% vol. alkohola), u voćnim rakijama, rakijama od voćne komine, od jabučnog vina te od kruškovog vina 200 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola), u komovici 140 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola), a u rakiji od vina i brandyu 125 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola) (NN 61/2009).

Europska unija, a tako onda i Republika Hrvatska, trenutno nema određenu maksimalnu razinu etil karbamata u jakim alkoholnim pićima. No neke države članice te države izvan Europske unije ipak su odredile maksimalne razine etil karbamata (tablica 3). Tako primjerice Češka i Francuska imaju postavljeni maksimum na 150 µg/L za destilirana jaka alkoholna pića, dok za voćne rakije Češka ima granicu na 400 µg/L, Francuska na 1000 µg/L, a Njemačka na 800 µg/L (EFSA, 2007). Također je važno naglasiti da je Europska komisija donijela preporuku da se provode razne mjere snižavanja koncentracije etil karbamata s ciljem postizanja najniže moguće razine etil karbamata od 1 mg/L (EU, 2016).

Prisutnost patulina u hrani i pićima sve se više detektira te se zato razvila i potreba za postavljanjem granica kako bi se zaštitilo zdravlje potrošača. Europska je komisija 2006. godine donijela Uredbu (EZ) br. 1881/2006 kojom je postavila maksimalne razine određenih kontaminanata te je njome odredila 10 µg/kg kao maksimalnu razinu patulina u soku od jabuke te 50 µg/kg kao maksimalnu razinu patulina u jakim alkoholnim pićima, jabučnim vinima i ostalim fermentiranim pićima dobivenim od jabuka (tablica 3) (EC, 2006).

Kao ni za etil karbamat, ni za ftalate trenutno nije određena maksimalna razina u jakim alkoholnim pićima na području Europske unije (tablica 3). Međutim, njihove koncentracije u jakim alkoholnim pićima mogu se indirektno ograničavati propisima i uredbama za materijale koji dolaze u kontakt s hranom i pićima, budući da tako ftalati prelaze u sve proizvode. Tako je Europska komisija Uredbom (EU) br. 10/2011 postavila granice specifične migracije (SML) za neke ftalate. Primjerice, za dibutil ftalat (DBP) granica specifične migracije je 0,3 mg/kg, za benzil butil ftalat (BBP) je 30 mg/kg, a za bis(2-etilheksil)ftalat (DEHP) je 1,5 mg/kg (EC, 2011).

Tablica 1. Maksimalne razine metanola u jakim alkoholnim pićima prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009)

KATEGORIJE JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA	MAKSIMALNA RAZINA METANOLA (g/hL preračunato na 100% vol. alkohola)
London gin	5
Vodka	10
Rakija od vina i brandy	200
Rakija od voćne komine	1500
Komovica, rakija od jabučnog vina, rakija od kruškovog vina i rakija od voća	1000
Iznimke: šljiva (<i>Prunus domestica</i> L.), mirabel (šljiva žutica, <i>Prunus domestica</i> L. subsp. <i>syriaca</i> (Borkh) Janch. Ex. Mansf.), plava šljiva (<i>Prunus domestica</i> L.), jabuka (<i>Malus domestica</i> Borkh.), kruška (<i>Pyrus communis</i> L.), malina (<i>Rubus ideaus</i> L.), kupina (<i>Rubus fruticosus</i> auct. Aggr.), marelica (<i>Prunus armeniaca</i> L.), breskva (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch)	1200
Iznimke: dunja (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.), borovica (<i>Juniperus communis</i> L.), kruška sorte Williams (<i>Pyrus communis</i> L. cv „Williams“), crni ribiz (<i>Ribes nigrum</i> L.), crveni ribiz (<i>Ribes rubrum</i> L.), bobice bazge (<i>Sambucus nigra</i> L.), oskoruša (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	1350

Tablica 2. Maksimalne i minimalne razine viših alkohola u jakim alkoholnim pićima prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009)

KATEGORIJE JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA	MAKSIMALNA RAZINA VIŠIH ALKOHOLA (g/hL preračunato na 100% vol. alkohola)	MINIMALNA RAZINA VIŠIH ALKOHOLA (g/hL preračunato na 100% vol. alkohola)
Rakija od vina i brandy	-	125
Komovica	-	140
Rakije od voćne komine, od jabučnog i kruškovog vina, voćne rakije	-	200
Rum	-	225

Tablica 3. Maksimalne razine etil karbamata, cijanovodične kiseline, patulina i ftalata u jakim alkoholnim pićima na području Republike Hrvatske i Europske unije

VRSTA KONTAMINANTA	MAKSIMALNA RAZINA
Etil karbamat	EU i RH: - (Češka i Francuska za destilirana JAP: 150 µg/L, za voćne rakije Češka: 400 µg/L, Francuska: 1000 µg/L i Njemačka: 800 µg/L)
Cijanovodična kiselina	7 g/hL (preračunato na 100% vol. alkohola)
Patulin	50 µg/kg
Ftalati	-

2.4. Metode određivanja koncentracije kemijski opasnih komponenti u jakim alkoholnim pićima

Za kvalitetu konačnog proizvoda te zdravlje potrošača iznimno je važno da se koncentracije kemijskih opasnosti u jakim alkoholnim pićima strogo reguliraju. Iz tih su razloga određene maksimalne razine pojedinih kontaminanata, a kako bi se osiguralo da su njihove koncentracije u konačnim proizvodima ispod tih granica, važno je i da se proizvodi prije puštanja na tržište analiziraju te da se ispituju sadržaji kemijskih kontaminanata u njima. Za to je, naravno, potrebno poznavati analitičke metode za određivanje tih spojeva u jakim alkoholnim pićima.

Za određivanje etil karbamata u jakim alkoholnim pićima, kao i drugim proizvodima, postoji velik niz različitih metoda. Najčešće korištena analitička metoda je plinska kromatografija (GC). Ona se može koristiti u kombinaciji sa sustavima za detekciju kao što su plameno-ionizacijski detektor (FID), detektor elektrolitičke vodljivosti (ECD) i maseni spektrometar (MS) (Ryu i sur., 2015).

Najpopularnija metoda, i službena AOAC International metoda, je GC-MS. Ova metoda ima prednost pred drugima zbog svoje robusnosti te mogućnosti detekcije etil karbamata ne samo u jakim alkoholnim pićima, već i u drugim pićima i hrani. Granica detekcije etil karbamata u

jakim alkoholnim pićima za ovu metodu je 50 µg/L. Prije provođenja same GC-MS analize potrebno je ekstrahirati i pripremiti uzorak, što se najčešće radi pomoću ekstrakcije u čvrstoj fazi (SPE). Ovaj način pripreme uzorka je dugotrajan i predstavlja jedan od nedostataka ove metode detekcije etil karbamata. Iz tog se razloga često koristi mikroekstrakcija u čvrstoj fazi (SPME), koja znatno smanjuje vrijeme pripreme uzorka. Osjetljivost i specifičnost GC-MS metode nastoji se konstantno poboljšati. Uporabom tandem masene spektrometrije (GC-MS/MS) postignuta je veća osjetljivost, selektivnost i pouzdanija identifikacija analita (Abt i sur., 2021).

Osim plinske kromatografije, za detekciju etil karbamata može se koristiti i tekućinska kromatografija u kombinaciji s detekcijom fluorescencije ili s MS-om. Ona zahtjeva kraće vrijeme pripreme uzorka što joj daje određenu prednost na plinskom kromatografijom (Abt i sur., 2021). Često korištena metoda je i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), zbog svoje jednostavnosti, niske vremenske zahtjevnosti te jeftinosti (Gowd i sur., 2018).

Kako bi se odredila koncentracija cijanovodične kiseline u jakim alkoholnim pićima, može se koristiti kemijska metoda u kojoj cijanovodična kiselina i cijanidi formiraju cijanogene kloride nakon reakcije s kloraminom T. Nastali cijanogeni kloridi mogu reagirati s barbiturnom kiselinom i piridinom te nastaje crveno-ljubičasto obojenje koje se može detektirati apsorpcijskom spektroskopijom na valnoj duljini od 570 nm. Ova metoda ima neke nedostatke, kao što su potreba da kloramin T bude star bar 1 sat prije korištenja te potreba da barbiturna kiselina bude svježja i da se mora pohranjivati u smeđim bocama, budući da inače tijekom skladištenja pokazuje smečkasto obojenje. Također je jako važno da se pri formiranju konačnog obojenja cijela reakcijska smjesa dobro miješa (Brereton i sur., 2003). Cijanogeni kloridi, nastali reakcijom cijanida i kloramina T, mogu dalje reagirati i s mješavinom piridina i pirazolona. Time nastaje plavo obojenje koje se detektira spektrofotometrom pri 490 nm. Ukupna koncentracija cijanovodične kiseline, dakle koncentracija slobodne i vezane cijanovodične kiseline zajedno, može se dobiti oslobađanjem vezane cijanovodične kiseline kiselom hidrolizom (Balcerek i Szopa, 2012).

Koncentracija metanola u jakim alkoholnim pićima može se odrediti na puno načina s različitim učestalostima korištenja. Koriste se metode kao što su kolorimetrijska metoda s

kromotropnom kiselinom (CA), titrimetrijska metoda, enzimska metoda, biosenzorna detekcija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), NIR spektroskopija i plinska kromatografija (GC) (Wang i sur., 2004).

Za plinsku kromatografiju može se reći da je standardna metoda koja je među najčešćima u uporabi. Prilikom određivanja metanola plinskom kromatografijom za detekciju se može koristiti masena spektrometrija (MS), detektor toplinske vodljivosti (TCD) i plameno-ionizacijski detektor (FID) (Destanoğlu i Ateş, 2019; Tulashie i sur., 2017; Vaskova, 2014). Nažalost, ova metoda ima neke nedostatke, kao što je njena visoka cijena te potreba za velikim znanjem i iskustvom prilikom upotrebe. Iz tog su razloga razvijene neke jeftinije i jednostavnije metode, kao, primjerice, modifikacija kolorimetrijske metode s kromotropnom kiselinom. Ovom se metodom na jednostavan način može odrediti relativan odnos metanola i etanola, što ne daje informaciju o samoj koncentraciji metanola, ali daje važnu informaciju o toksičnosti nekoga pića. To je moguće budući da toksičnost pića pri konstantnoj koncentraciji metanola raste smanjivanjem koncentracije etanola (etanol u jetri ima veći afinitet za vezanje na enzim alkohol dehidrogenazu, čime se sprječava metabolizam metanola) (Zamani i sur., 2019).

Zbog svoje brzine, jednostavnosti i jeftinosti, često su korištene i različite spektroskopske metode. S vremenom se sve više, umjesto jednodimenzionalne spektroskopije, koristi dvodimenzionalna korelacijska spektroskopija, koja ima visoku rezoluciju, u sklopu NIR, IR, Raman i drugih spektroskopskih tehnika (Yang i sur., 2016).

Zbog njihove jako hlapljive prirode, najpopularnije metode za određivanje koncentracije viših alkohola iste su kao i kod drugih hlapljivih organskih spojeva (VOC), kao što su metanol, acetaldehid i slični. Jedna takva metoda je plinska kromatografija (GC) najčešće u kombinaciji s masenom spektrometrijom (MS) ili s plameno-ionizacijskim detektorom (FID). Uzorak alkoholnog pića može se direktno injektirati u plinski kromatograf, ali postoje i druge metode za ekstrakciju koje se mogu primjenjivati prije same detekcije viših alkohola. Tako se može prvo provoditi ekstrakcija tekućina-tekućina (LLE), mikroekstrakcija u čvrstoj fazi (SPME), destilacija te dinamičko i statičko headspace uzorkovanje (Chung i sur., 2015). Navedena metoda direktnog injektiranja uzorka u plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) je također opisana kao referentna metoda za analizu jakih alkoholnih pića u uredbi Europske komisije (EC 2000).

Patulin se može identificirati i kvantificirati na razne načine te ne postoji niti jedan službeni, no metoda koja je često korištena i na temelju koje se razvijaju razne nove je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV detektor ili detektor s nizom dioda (DAD). Prije same analize patulin se najčešće ekstrahira ekstrakcijom tekućina-tekućina (LLE) pomoću otapala, kao što je etil acetat. Nedostatak ove metode ekstrakcije je potrošnja velike količine organskog otapala te količina vremena potrebna za pripremu uzorka. Alternativno se mogu koristiti ultrazvučna tehnika te disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (DLLME). Ako je uzorak zamućen može doći do vezanja patulina na proteine prisutne u čvrstim česticama uzorka te se time gubi velik dio patulina tijekom analize. Kako bi se to spriječilo, poželjno je hidrolizirati pektin enzimom pektinazom prije ekstrakcije te se time prinos patulina povećava. Uz HPLC metodu sve se više razvijaju i koriste metode kao što su plinska i tekućinska kromatografija uz masenu spektrometriju (GC-MS i LC-MS) te metoda molekularno otisnutih polimera (MIP). MIP metoda koristi posebne polimere na kojima je tijekom njihovog formiranja „otisnuto“ vezno mjesto za patulin te se oni tako selektivno vežu na patulin u uzorku (Notardonato i sur., 2021).

Kao i kod mnogih drugih do sad spomenutih kemijskih kontaminanata, i ftalati se mogu detektirati i kvantificirati korištenjem plinske kromatografije uz masenu spektrometriju (GC-MS). Ekstrakcija ftalata iz alkoholnih pića, potrebna za provođenje analize, može se izvršiti pomoću organskih otapala, ekstrakcijom u čvrstoj fazi ili mikroekstrakcijom. Za kalibraciju tijekom kvantifikacije ftalata najčešće se koristi standardna adicijska metoda, no ona je vremenski zahtjevna jer je potrebna kalibracijska krivulja za svaki uzorak. Umjesto ove metode može se koristiti metoda internog standarda u kojoj se koristi standard označen izotopom. Time se povećava preciznost i točnost metode, budući da ti označeni standardi imaju ista fizikalna i kemijska svojstva kao njihovi analozi u uzorku (Karačonji i sur., 2017).

Lv i sur. (2013) identificirali su i kvantificirali ftalate u uzorcima jakih alkoholnih pića korištenjem GC-MS metode, pri čemu su ovu metodu optimizirali izdvajanjem etanola prije ekstrakcije ftalata organskih otapalom, točnije n-heksanom. Budući da su ftalati jako topljivi u etilnom alkoholu, korištenjem organskog otapala ekstrakcija ne bi bila jako učinkovita. Uklanjanjem dijela etanola prije ekstrakcije povećavaju se njeni prinosi. Ova je metoda jako osjetljiva, točna, jednostavna i brza te se iz tih razloga često koristi.

Druge metode koje se znaju koristiti za određivanje ftalata su plinska kromatografija uz

plameno-ionizacijski detektor (GC-FID) te UV-VIS i NMR spektroskopija. Također je važno naglasiti potrebu za oprezom tijekom analize kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka ftalatima prisutnima u laboratorijima za analizu (Karačonji i sur., 2017).

2.5. Metode snižavanja koncentracije kemijski opasnih komponenti u jakim alkoholnim pićima

Sve kemijske tvari spomenute u ovome radu u previsokim koncentracijama predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. Iz tog su razloga zakonom uvedene granice, odnosno maksimalno dopuštene koncentracije ovih tvari u jakim alkoholnim pićima. Sukladno time, tijekom proizvodnje izrazito je važno da se koncentracije tih tvari zadrže unutar zadanih granica te su se zato razvile različite metode te postupci dobre proizvođačke prakse koji se trebaju slijediti kako ne bi došlo do ugrožavanja potrošača.

Postoje različite metode za snižavanje koncentracije etil karbamata u jakim alkoholnim pićima, a one se često fokusiraju na snižavanje koncentracija prekursora etil karbamata, primarno uree i cijanovodične kiseline (o njoj će riječ biti kasnije). Jedna od metoda je enzimska razgradnja, bilo samog etil karbamata, bilo njegovih prekursora. Enzim ureaza često se koristi jer katalizira razgradnju uree na CO₂ i amonijak i time sprječava sintezu etil karbamata. Enzim uretanaza se pak može koristiti za direktnu razgradnju etil karbamata na etanol i amonijak. Korištenje enzima za regulaciju etil karbamata je jako pogodno i učinkovito, ali može biti skupo te ovisi o uvjetima okoline, kao što je primjerice pH, koji utječu na aktivnost enzima (Gowd i sur., 2018).

Osim enzimске metode, moguće je i korištenje genetički modificiranih kvasaca čiji su metabolički putevi optimizirani te je time sinteza etil karbamata i njegovih prekursora snižena. Pažljivim provođenjem destilacije te prakticiranjem frakcioniranja također je moguće sniziti koncentraciju etil karbamata. Budući da se najviše koncentracije etil karbamata nalazi u prvoj i zadnjoj frakciji (prvijenac i patoka), srednja frakcija (srce) trebala bi se jako pažljivo odvajati kako bi što manje etil karbamata prešlo u nju. Također, višekratno destiliranje može biti poželjno kako bi se povećala čistoća destilata. Metoda regulacije etil karbamata koju je važno spomenuti je kontroliranje uvjeta skladištenja, budući da na sintezu etil karbamata utječu visoke temperature te izloženost svjetlu i UV zračenju (Abt i sur., 2021).

Kako bi se snizila koncentracija cijanovodične kiseline u konačnom proizvodu, a time i etil karbamata, čiji je ona prekursor, može se provoditi niz postupaka i slijediti niz preporuka tijekom proizvodnje. Sirovine, odnosno u ovom kontekstu koštunjičavo voće, koje se koristi te način njihove obrade trebao bi biti takav da dolazi do minimalnog oslobađanja cijanovodične kiseline. To znači da voće treba biti visoke kvalitete, mehanički neoštećeno te mikrobiološki nekontaminirano. Poželjno bi bilo da su koštice uklonjene, a ako nisu da se voće nježno gnječi kako bi se spriječilo razbijanje koštica. Fermentirani masulj trebao bi se prije destilacije skladištiti što kraće da ne bi došlo do otpuštanja cijanovodične kiseline iz neoštećenih koštica. Destilacija bi se trebala provoditi tako da što manje cijanovodične kiselina prijeđe u destilat. Također bi se tijekom destilacije trebali koristiti bakreni katalitički konverteri ili bi se u fermentirani masulj trebali dodavati bakreni spojevi zato što oni vežu cijanovodičnu kiselinu i sprječavaju njen prijelaz u destilat (EU, 2016). Tretiranjem voćnog masulja prije fermentacije visokim tlakom ili toplinom također se može smanjiti koncentracija cijanovodične kiseline. To je zato što se ovim postupkom inaktiviraju enzimi koji kataliziraju razgradnju cijanogenih glikozida iz kojih se dobiva cijanovodična kiselina (Pang i sur., 2017).

Sadržaj metanola u jakim alkoholnim pićima mora se održavati ispod dopuštenih granica kako bi se osigurala sigurnost potrošača te se to može raditi na niz načina. Mogu se koristiti manje količine sirovina, kao što je voće, koje imaju povišene količine pektina, glavnog izvora metanola. Uvjeti skladištenja (npr. pH, temperatura, vlažnost) trebali bi se strogo kontrolirati kako bi se spriječilo kvarenje voća te spontana razgradnja pektina. Zakiseljavanjem komine inhibiraju se pektolitički enzimi te se inhibira rast mikroorganizama kvarenja koji bi taj enzim mogli sintetizirati. Također, sterilizacijom komine, dakle djelovanjem viših temperatura može doći do denaturacije i tako inaktivacije pektolitičkih enzima. Isto tako, pažljivom kontrolom temperature može se tijekom fermentacije regulirati aktivnost pektolitičkih enzima, a tako i koncentracije metanola. Odvijanjem fermentacije na nižim temperaturama može se reducirati sinteza metanola jer se povišenjem temperatura povećava i aktivnost enzima sve do temperature na kojoj kreće njihova denaturacija. Smanjivanje vremena trajanja fermentacije te vremena skladištenja komine između fermentacije i destilacije jedan je od najefektivnijih postupaka redukcije koncentracije metanola (Blumenthal i sur., 2021; Pang i sur., 2017).

Kao što je ranije već spomenuto, metanol ima nižu temperaturu vrenja od etanola te stoga tijekom destilacije izlazi u prvoj frakciji, odnosno prvijencu. Pažljivim provođenjem destilacije

poželjno je onda ukloniti što više metanola iz konačnog destilata (Pang i sur., 2017).

Kako bi se snizila koncentracija metanola, mogu se primijeniti i mikrobiološke metode. To znači provođenje kontrolirane fermentacije, gdje se inokulira čistim, komercijalnim starter kulturama, kako bi se spriječilo nastajanje metanola kao nusproizvoda kod spontane fermentacije. Također se mogu koristiti i metilotrofni kvasci (npr. *Pichia methanolica*, *Candida boidinii*) koji mogu asimilirati pektin i metanol te tako ne će doći do njegova nakupljanja (Ohimain, 2016).

Koncentracije viših alkohola mogu se regulirati, kako ne bi postale toksične, strogom kontrolom procesa fermentacije. Mnogo čimbenika može utjecati na nastajanje viših alkohola tijekom fermentacije pa se tako njihovom kontrolom viši alkoholi mogu održati ispod zadanih granica. To znači pažljivi izbor sirovina (s niskim sadržajem proteina), kvasaca (s niskom aktivnošću enzima proteaza) i volumena inokuluma (budući da povećanjem volumena inokuluma raste i koncentracija viših alkohola), kontrola temperature tijekom fermentacije te kontrola sadržaja različitih suplemenata hranjive podloge. Povišenje, odnosno sniženje koncentracija određenih minerala, vitamina i drugih suplemenata može dovesti do redukcije sinteze viših alkohola. Tako, primjerice, dodavanjem anorganskog dušika ili mješavine minerala, kao što su amonijev i magnezijev sulfat te magnezijev hidrogenfosfat, kao i dodavanjem vitamina piridoksina te inhibitora rasta kvasaca, može se smanjiti sadržaj viših alkohola. S druge strane, dodavanjem vitamina tiamina te određenih aminokiselina dolazi do stimulacije sinteze viših alkohola pa je zato potrebno održavati niske koncentracije ovih tvari kako bi se i koncentracije viših alkohola održale ispod granica (Pang i sur., 2017; Pietruszka i sur., 2010).

Tijekom cijelog postupka proizvodnje jakih alkoholnih pića mogu se poduzimati različiti koraci kako bi se koncentracija patulina snizila na zadovoljavajuću razinu. Prevencija rasta plijesni koje proizvode patulin jako je važan korak te se stoga preporučuje korištenje fungicida te skladištenje sirovina, na kojima ta plijesan raste, u odgovarajućim uvjetima (temperatura manja od 10 °C ili skladištenje u periodu manjem od 48 sati). Također se preporučuje fizičko uklanjanje plijesni i patulina, bilo odvajanjem oštećenog voća, bilo njegovim pranjem, budući da je patulin topljiv u vodi. Mogu se koristiti i postupci kao što su filtracija, pasterizacija i destilacija te samom fermentacijom dolazi do razgradnje patulina.

Nijedna od navedenih metoda sama za sebe nije u potpunosti učinkovita te je potrebna kombinacija niza metoda kako bi se razina patulina u konačnom proizvodu zadržala ispod granica. Također, uz navedene klasične metode regulacije, sve se više novih, modernih metoda istražuje i razvija s ciljem što bolje prevencije kontaminacije proizvoda patulinom. Razvijaju se različite biološke (korištenje mikroorganizama), kemijske (korištenje kemikalija, kao što su askorbinska kiselina, amonijak, ozon i slične) i fizičke metode (UV zračenje, pulsirajuće svjetlo, visoki hidrostatski tlak). Iako još možda nisu u potpunosti istražene, one pokazuju veliki potencijal i mogućnost zamjene tradicionalnih metoda (Ioi i sur., 2017).

Zbog štetnog djelovanja ftalata na ljudski organizam važno je regulirati njegove koncentracije u jakim alkoholnim pićima. Budući da on prelazi u piće iz plastične ambalaže ili drugih oblika plastične opreme koja se koristi u proizvodnji, preporučuje se korištenje alternativnih materijala koji ne sadrže ftalate kako bi se smanjio rizik (Karačonji i sur., 2017).

3. ZAKLJUČCI

1. Jaka alkoholna pića sadrže velik broj sastojaka, od kojih neki mogu u previsokim koncentracijama biti opasni po zdravlje potrošača.
2. Najčešći kemijski kontaminanti u jakim alkoholnim pićima su etil karbamat, cijanovodična kiselina, metanol, viši alkoholi, patulin i ftalati.
3. Zbog opasnosti koju predstavljaju za zdravlje potrošača, njihove koncentracije moraju biti regulirane zakonima i propisima te je potrebno provoditi određene mjere kako bi se njihove koncentracije u konačnom proizvodu snizile.
4. Maksimalne razine kemijskih kontaminanata u jakim alkoholnim pićima na internacionalnoj razini rijetko su jednake te se uglavnom razlikuju od države do države zbog razlika u proizvodnji te razlika u ukupnoj potrošnji jakih alkoholnih pića u pojedinim državama.
5. Metode za snižavanje koncentracije kemijskih kontaminanata u jakim alkoholnim pićima specifične su za svaki spoj te se mogu koncentrirati na različite aspekte proizvodnje ovisno o tome u kojoj fazi proizvodnje taj spoj najviše nastaje.
6. Kako bi se osiguralo da su koncentracije tih kontaminanata ispod zadanih granica, potrebno je provoditi strogu kontrolu procesa proizvodnje.
7. Također je potrebno analizirati dobivene proizvode, odnosno određivati koncentracije kontaminanata u njima s ciljem osiguranja kvalitete proizvoda prije puštanja na tržište.

4. POPIS LITERATURE

Abt E, Incorvati V, Robin LP, Redan BW (2021) Occurrence of Ethyl Carbamate in Foods and Beverages: Review of the Formation Mechanisms, Advances in Analytical Methods, and Mitigation Strategies. *J Food Prot* **84**, 2195-2212

Balcerek M, Szopa J (2012) Ethanol biosynthesis and hydrocyanic acid liberation during fruit mashes fermentation. *Czech J Food Sci* **30**, 144–152

Blumenthal P, Steger MC, Einfalt D, Rieke-Zapp J, Quintanilla Bellucci A, Sommerfeld K, i sur. (2021) Methanol Mitigation during Manufacturing of Fruit Spirits with Special Consideration of Novel Coffee Cherry Spirits. *Molecules* **26**, 2585

Brereton P, Hasnip S, Bertrand A, Wittkowski R, Guillou C (2003) Analytical methods for the determination of spirit drinks. *Trends Anal Chem* **22**, 19-25

Chung H, Yoon MK, Han J, Kim Y-S (2015) Evaluation of volatile organic compounds in alcoholic beverages consumed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **58**, 423–432

Destanoğlu O, Ateş IS (2019) Determination and evaluation of methanol, ethanol and higher alcohols in legally and illegally produced alcoholic beverages. *J Turk Chem Soc, A: Chem* **6**, 21-28

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) (2007) Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants. *The EFSA J* **551**, 1-44

Europska komisija (EC) (2000) Commission Regulation (EC) No 2870/2000 of 19 December 2000 laying down community reference methods for the analysis of spirits drinks. *Off J Eur Comm* L333, 20–46

Europska komisija (EC) (2006) Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Comm* L364, 5-

Europska komisija (EC) (2011) Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on Plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Off J Eur Comm* L12, 1-89

Europska unija (EU) (2016) Commission Recommendation (EU) 2016/22 of 7 January 2016 on the prevention and reduction of ethyl carbamate contamination in stone fruit spirits and stone fruit marc spirits, repealing Recommendation 2010/133/EU. *Off J Eur Comm* L6, 8-12

Golge O, Yenisehirlioglu E, Kabak B (2022) A preliminary study on patulin contamination in spirit drinks. *Food Addit Contam: B* 15, 1-6

Gowd V, Su H, Karlovsky P, Chen W (2018) Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant. *Food Chem* **248**, 312–321

Grba S, Stehlik-Tomas V (2010) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, U: Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, 1. izd., Ranić, I., ur., Plejada d.o.o., Zagreb, str. 229-264

Ioi JD, Zhou T, Tsao R, F Marcone M (2017) Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins* **9**, 157

Jurica K, Uršulin-Trstenjak N, Vukić Lušić D, Lušić D, Smit Z (2013) Izloženost ftalatima i njihova pojavnost u alkoholnim pićima. *Arh Hig Rada Toksikol* **64**, 131-139

Karačonji IB, Jurica SA, Lasić D, Jurica K (2017) Facts about phthalate toxicity in humans and their occurrence in alcoholic beverages. *Arh Hig Rada Toksikol* **68**, 81-92

Lachenmeier DW, Haupt S, Schulz K (2008) Defining maximum levels of higher alcohols in alcoholic beverages and surrogate alcohol products. *Reg Toxicol Pharm* **50**, 313-321

Lv J, Liang L, Huebschmann H-J (2013) Determination of phthalates in liquor beverages by

single quadrupole GC-MS. Thermo Fisher Scientific, Beijing, China

Mrvčić J, Trontel A, Hanousek Čiča K, Vahčić N, Nikićević N, Spaho N, i sur. (2021) Chemical and sensorial characteristics of traditional fruit spirits from Southeast Europe. *Glas Zašt Bilja* **44**, 80-89

Notardonato I, Gianfagna S, Castoria R, Ianiri G, De Curtis F, Russo MV, Avino P (2021) Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices. *Rev Anal Chem* **40**, 144-160

Ohimain EI (2016) Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. *SpringerPlus* **5**, 1607

Pang XN, Li ZJ, Chen JY, Gao LJ, Han BZ (2017) A Comprehensive Review of Spirit Drink Safety Standards and Regulations from an International Perspective. *J Food Prot* **80**, 431-442

Pietruszka M, Pielech-Przybylska K, Szopa J (2010) Synthesis of higher alcohols during alcoholic fermentation of rye mashes. *Food Chem Biotechnol* **74**

Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (2009)

Narodne novine **61** (NN 61/2009)

Ryu D, Choi B, Kim E, Park S, Paeng H, Kim CI, i sur. (2015) Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Fermented Foods Sold in Korea. *Toxicol Res* **31**, 289–297

Sun Z, Liu L, Wang Y, Wang X, Xiao D (2021) Higher alcohols metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: a mini review. *Chin J Biotechnol* **37**, 429-447

Tulashie SK, Appiah AP, Torku GD, Darko AY, Wiredu A (2017) Determination of methanol and ethanol concentrations in local and foreign alcoholic drinks and food products (Banku, Ga kenkey, Fante kenkey and Hausa koko) in Ghana. *Int J Food Contam* **4**, 1-5

Vaskova H (2014) Spectroscopic determination of methanol content in alcoholic drinks. *Int J Biol Biomed* **8**, 27-34

Wang M, Wang J, Choong Y (2004) A rapid and accurate method for determination of methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography. *J Food Compost Anal* **17**, 187-196

Yang Y, Ren Y, Dong G, Yang R, Liu H, Du YH, i sur. (2016) Determination of Methanol in Alcoholic Beverages by Two-Dimensional Near-Infrared Correlation Spectroscopy. *Anal Lett* **49**, 2279 - 2289

Zamani N, Rafizadeh A, Hassanian-Moghaddam H, Akhavan-Tavakoli A, Ghorbani-Samin M, Akhgari M, i sur. (2019) Evaluation of methanol content of illegal beverages using GC and an easier modified Chromotropic acid method; a cross sectional study. *Subst Abuse Treat Prev Policy* **14**

Izjava o izvornosti

Ja Ema Ćurin izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ema Ćurin

Vlastoručni potpis