

Analiza sortnih tiola u vinima plinskom kromatografijom uz primjenu tehnika derivatizacije i izotopnog razrjeđenja

Viskić, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:677087>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

MARKO VISKIĆ

**ANALIZA SORTNIH TIOLA U VINIMA PLINSKOM
KROMATOGRAFIJOM UZ PRIMJENU TEHNIKA
DERIVATIZACIJE I IZOTOPNOG RAZRJEĐENJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCES

Marko Viskić

**GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS
OF VARIETAL THIOLS IN WINES
WITH APPLICATION OF DERIVATIZATION
AND STABLE ISOTOPE DILUTION ANALYSIS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

MARKO VISKIĆ

**ANALIZA SORTNIH TIOLA U VINIMA PLINSKOM
KROMATOGRAFIJOM UZ PRIMJENU TEHNIKA
DERIVATIZACIJE I IZOTOPNOG RAZRJEĐENJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Luna Maslov Bandić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCES

Marko Viskić

**GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS
OF VARIETAL THIOLS IN WINES
WITH APPLICATION OF DERIVATIZATION
AND STABLE ISOTOPE DILUTION ANALYSIS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Luna Maslov Bandić, Assistant Professor

Zagreb, 2022

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Luni Maslov Bandić, na iznimno zanimljivoj predloženoj temi rada, ogromnom strpljenju i vrijednim savjetima pruženima prilikom izrade rada.

Zahvaljujem mr. sc. Dorothei Leis i prof. dr. sc. Erichu Leitneru s Tehničkog sveučilišta u Grazu na srdačnosti, ugodnoj radnoj atmosferi i ustupljenim instrumentima.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Marku Vincekoviću sa Zavoda za kemiju na pruženoj prilici da budem dio akademske zajednice.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Jeromel sa Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo na ustupljenim uzorcima i enološkim parametrima.

Zahvaljujem dr. sc. Katarini Radolov s Instituta Ruđer Bošković na pomoći i savjetima pruženima prilikom sinteze deuteriranih spojeva.

Zahvaljujem roditeljima na beskrajnoj potpori, na odricanjima i na razumijevanju za sve vikende kada smo htjeli, ali se nismo stigli vidjeti. Hvala babi i didu što su me od najranijih dana vezali za prirodu, selo i život normalniji i smisleniji od gradskog.



*...u koj je vino ko hoću piti
zgoreno u mladosti
teško ud tanina
i viška kiselina.*

Franci Blašković: Tromba Jerihonska eli Carmina Istromalvasiana

Odmak od tehnologije jedan je od preduvjeta zdravorazumskog pogleda na svijet.

Damir Pilić

Sadržaj

SAŽETAK	XV
ABSTRACT	XVII
§ 1. UVOD	1
1.1. Svrha rada.....	3
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Vino i sastav vina	5
2.2. Tioli i reaktivnost tiola u vinu.....	9
2.2.1. <i>Kemijska svojstva i reakcije tiola s komponentama vina</i>	9
2.2.2. <i>Fermentativni tioli</i>	16
2.2.3. <i>Sortni tioli.....</i>	19
2.2.3.1. <i>Biogeneza sortnih tiola.....</i>	22
2.2.4. <i>Ostali tioli u vinu</i>	32
2.3. Sadržaj sortnih tiola u vinu	34
2.4. Utjecaj uzgoja vinove loze i proizvodnje vina na prisutnost sortnih tiola u vinu.....	38
2.4.1. <i>Uzgoj i predfermentacijske operacije</i>	38
2.4.2. <i>Fermentacija.....</i>	40
2.4.3. <i>Očuvanje sortnih tiola u vinu</i>	42
2.5. Priprava uzoraka vina za kromatografsku analizu	45
2.5.1. <i>Ekstrakcija na čvrstoj fazi.....</i>	45
2.5.2. <i>Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi</i>	46
2.5.3. <i>Sorpcijska ekstrakcija miješalom.....</i>	48
2.5.4. <i>Derivatizacijske metode</i>	49
2.6. Kvalitativna i kvantitativna analiza sortnih tiola u vinu	50
2.6.1. <i>Neselektivna ekstrakcija sortnih tiola.....</i>	51
2.6.2. <i>Selektivna ekstrakcija sortnih tiola.....</i>	54
2.6.3. <i>Derivatizacijske metode</i>	58
2.6.4. <i>Utjecaj matrice uzorka u analizi sortnih tiola.....</i>	67
2.6.5. <i>Instrumentna analiza.....</i>	69
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	74
3.1. Spojevi analizirani u ovom radu.....	75
3.2. Opće napomene	75
3.3. Uzorci vina	78
3.4. Sinteza deuteriranih unutarnjih standarda	80

3.4.1. Priprava parcijalno deuteriranog sortnog tiola [$^2\text{H}_{10}$]-3-SH <u>6</u>	80
3.4.1.1. Priprava etil-(E)-[3,4,4,5,5,6,6,6- $^2\text{H}_8$]heks-2-enoata <u>4</u>	80
3.4.1.2. Priprava etil-3-(acetiltio)[3,4,4,5,5,6,6,6- $^2\text{H}_8$]heksanoata <u>5</u>	81
3.4.1.3. Priprava 3-sulfanil[1,1,3,4,4,5,5,6,6,6- $^2\text{H}_{10}$]heksan-1-ola <u>6</u>	81
3.4.2. Priprava parcijalno deuteriranog sortnog tiola [$^2\text{H}_5$]-3-SHA <u>11</u>	82
3.4.2.1. Priprava etil-(E)-heks-2-enoata <u>8</u>	82
3.4.2.2. Priprava etil-3-(acetiltio)heksanoata <u>9</u>	82
3.4.2.3. Priprava 3-sulfanil[1,1- $^2\text{H}_2$]heksan-1-ola <u>10</u>	83
3.4.2.4. Priprava 3-sulfanil[1,1- $^2\text{H}_2$]heksil-[8,8,8- $^2\text{H}_3$]acetata <u>11</u>	83
3.5. Plinskokromatografska analiza sortnih tiola u vinu	84
3.5.1. Priprava standardnih otopina	84
3.5.2. Probni postupak derivatizacije sortnih tiola pentafluorbenzil-bromidom	84
3.5.3. Probni postupak derivatizacije sortnih tiola etil-propiolatom	85
3.5.4. Postupak derivatizacije etil-propiolatom i ekstrakcije derivatiziranih sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi	86
3.5.5. Postupak mikroekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi iz para iznad otopine.....	86
3.5.6. Postupak mikroekstrakcije ETP-derivata sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi iz para iznad otopine.....	87
3.5.7. Analiza sortnih tiola plinskom kromatografijom uz detekciju tandemnom spektrometrijom masa s trostrukim kvadrupolom.....	87
3.5.8. Analiza sortnih tiola plinskom kromatografijom uz detektor kemiluminescencije sumpora	89
3.5.9. Analiza sortnih tiola sveobuhvatnom plinskom kromatografijom uz detekciju spektrometrijom masa	90
3.5.10. Određivanje aromatskog profila uzoraka eksperimentalnih vina	91
3.6. Statistička obrada rezultata	92
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	93
4.1. Sinteza deuteriranih unutarnjih standarda	95
4.2. Optimiranje derivatizacije i ekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi	96
4.2.1. Izbor derivatizacijskog reagensa.....	97
4.2.2. Utjecaj dodatka različitih baza na ishod derivatizacije sortnih tiola s etil-propiolatom.....	104
4.2.3. Trajanje reakcije derivatizacije sortnih tiola s etil-propiolatom.....	105
4.2.4. Utjecaj aditiva na ishod derivatizacije sortnih tiola s etil-propiolatom	108
4.2.5. Utjecaj eluensa na djelotvornost ekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi.....	109
4.2.6. Izbor sorbensa za ekstrakciju sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi.....	111
4.3. Mikroekstrakcija sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi iz para iznad otopine	112
4.3.1. HS-SPME nederivatiziranih sortnih tiola	112
4.3.2. HS-SPME derivata sortnih tiola.....	116

4.4. Kvantifikacija sortnih tiola u vinu primjenom SPE i GC-MS/MS (QqQ)-analize.....	120
4.4.1. <i>Stabilnost ETP-derivata sortnih tiola</i>	<i>120</i>
4.4.2. <i>Razvoj MS/MS-metode za određivanje sortnih tiola praćenjem višestrukih reakcija</i>	<i>121</i>
4.4.3. <i>Linearnost odziva tandemnog spektrometra masa i granice detekcije i određivanja sortnih tiola u vinu.....</i>	<i>129</i>
4.4.4. <i>Djelotvornost ekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi</i>	<i>133</i>
4.4.5. <i>Sadržaj sortnih tiola u uzorcima eksperimentalnih vina.....</i>	<i>136</i>
4.4.6. <i>Sadržaj sortnih tiola u uzorcima komercijalnih vina.....</i>	<i>141</i>
4.5. Kvantifikacija sortnih tiola u vinu primjenom HS-SPME i GC-SCD-analize	144
4.5.1. <i>Linearnost odziva detektora kemiluminescencije sumpora i granice detekcije i određivanja sortnih tiola u vinu</i>	<i>144</i>
4.5.2. <i>Djelotvornost mikroekstrakcije sortnih tiola iz eksperimentalnih vina na čvrstoj fazi</i>	<i>147</i>
4.5.3. <i>Sadržaj sortnih tiola u uzorcima eksperimentalnih vina.....</i>	<i>150</i>
4.6. Identifikacija sortnih tiola u vinu metodom GCxGC-MS	154
4.7. Aromatski profil uzoraka eksperimentalnih vina	156
§ 5. ZAKLJUČAK.....	158
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	162
§ 7. LITERATURNI IZVORI	167
§ 8. DODATAK	XIX
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXXII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ANALIZA SORTNIH TIOLA U VINIMA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM UZ PRIMJENU TEHNIKA DERIVATIZACIJE I IZOTOPNOG RAZRJEĐENJA

Marko Viskiće

Zavod za kemiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb

Razvijene su metode analize sortnih tiola u vinu. Sortni tioli i njihovi derivati akumulirani su ekstrakcijom na čvrstoj fazi i mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi iz para iznad otopine. Optimirani su uvjeti derivatizacije etil-propiolatom i ekstrakcije sortnih tiola. Kalibracija je provedena tehnikom dodatka standarda u kombinaciji s tehnikom izotopnog razrjeđenja deuteriranim izotopomerima kao unutarnjim standardima. Kvalitativna i kvantitativna analiza sortnih tiola provedena je vezanim sustavom plinski kromatograf i tandemni spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom uz praćenje višestrukih reakcija. Analiti su kvantificirani i detektorom kemiluminescencije sumpora te detektirani vezanim sustavom sveobuhvatne plinske kromatografije - spektrometrije masa. Po prvi puta određene su masene koncentracije sortnih tiola u hrvatskim vinima sorte Sauvignon bijeli, koje su bile u rasponu od $6,1 \text{ ng L}^{-1}$ do $135,0 \text{ ng L}^{-1}$. Istražen je utjecaj dodatka antioksidansa prilikom vinifikacije na koncentraciju sortnih tiola i očuvanje arome vina. Zastupljenost sortnih tiola bila je najviša kod tretmana vina kombinacijom kalijeva metabisulfita, askorbinske kiseline i galotanina, dok su najniže koncentracije izmjerene u vinima sumporenima dvostruko nižom dozom kalijeva metabisulfita u odnosu na kontrolu. Kombinacija antioksidansa potvrđuje sinergistički utjecaj askorbinske kiseline i sumporenja vina na očuvanje sortnih tiola radi sprječavanja reakcije tiola s kinonima.

(XXXVII + 187 stranica, 87 slika, 38 tablica, 378 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb, i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ekstrakcija na čvrstoj fazi / izotopno razrjeđenje / mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine / sortni tioli / 3-sulfanilheksan-1-ol / 3-sulfanilheksil-acetat / vino

Mentor: doc. dr. sc. Luna Maslov Bandić

Ocjenitelji: 1. Prof. dr. sc. Predrag Novak
2. Dr. sc. Vlasta Drevenkar, znan. savj. i nasl. red. prof.
3. Prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Rad prihvaćen: 2. ožujka 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF VARIETAL THIOLS IN WINES WITH APPLICATION OF DERIVATIZATION AND STABLE ISOTOPE DILUTION ANALYSIS

Marko Viskić

Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Svetošimunska 25, HR-10000 Zagreb, Croatia

Methods for the analysis of varietal thiols in wines were developed and validated. Optimization conditions for the derivatization and extraction of varietal thiols was performed. Varietal thiols or derivatives thereof were extracted by solid-phase extraction or headspace solid-phase microextraction. Calibration was performed by standard addition combined with stable isotope dilution analysis with internal standards. The developed method was used for quantification of varietal thiols in wines by gas chromatography – tandem mass spectrometry with triple quadrupole and multiple reaction monitoring, by gas chromatography – sulfur chemiluminescence detector and for detection by comprehensive gas chromatography – mass spectrometry. For the first time, the mass concentration of varietal thiols in Croatian Sauvignon Blanc wines was determined, ranging from 6,1 ng L⁻¹ to 135,0 ng L⁻¹. The influence of addition of various antioxidants during the vinification step on the preservation of varietal thiols was investigated. The concentrations of thiols were highest in wines treated with a blend of potassium metabisulfite, ascorbic acid and gallotannins, while being lowest for the 50 % reduced sulfurization treatment. Synergistic effect of ascorbic acid and wine sulfurization on preservation of varietal thiols and inhibition of reaction with quinones was thereby confirmed.

(XXXVII + 187 pages, 87 figures, 38 tables, 378 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Chemical Library, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia, and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: headspace solid-phase microextraction / solid-phase extraction / stable isotope dilution analysis / 3-sulfanylhexan-1-ol / 3-sulfanylhexyl acetate / varietal thiols / wine

Supervisor: Dr. Luna Maslov Bandić, Assistant Professor

Reviewers: 1. Dr. Predrag Novak, Professor
2. Dr. Vlasta Drevenkar, Senior Scientist and Professor
3. Dr. Danijela Ašperger, Professor

Thesis accepted: March the 2nd 2022

§ 1. UVOD

Vino je proizvod dobiven potpunom ili djelomičnom alkoholnom fermentacijom (**lat.** *fervere*, vrijeti) masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa (*Vitis vinifera*, *Vitis labruscana* i dr.). Od sredine 19. stoljeća poznavanje sastava vina i njegovih kemijskih i biokemijskih promjena razvija se napretkom temeljnih znanstvenih disciplina, kemije, biokemije i mikrobiologije, kojima je omogućena bolja kontrola vinifikacije. Primjena analitičke kemije, posebice razvoj tehnika pripreme uzorka i instrumentnih metoda utjecali su na rasvjetljavanje sastava i poboljšanje kvalitete vina.^{1,2} Suvremena enologija prati najnovija znanstvena i tehnička dostignuća. Identifikacija spojeva odgovornih za senzorna svojstva poželjna je radi boljeg razumijevanja utjecaja klime, uvjeta uzgoja vinove loze i koraka proizvodnje na odlike proizvedenog vina.

Sortne arome su spojevi koji potječu iz grožđa isključivo određenih sorti. Među ovim se spojevima ističu sortni tioli, a najvažniji su 3-sulfanilheksan-1-ol (3-SH), 3-sulfanilheksilacetat (3-SHA) i 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on (4-MSP), odgovorni za reske voćne note, uglavnom ribizla, pasiflore i grejpa u bijelim, ali i nekim crnim vinima, kao što su vina sorti Sauvignon bijeli, Rizling, Traminac, Chardonnay, Verdejo i Carmenere. Pretpostavlja se da su sortni tioli u manjoj mjeri sadržani i u vinima sorti Silvanac, Malvazija i Pinot sivi.³

Zbog vrlo niskog mirisnog praga detekcije, prisutnost sortnih tiola u vinu lako se potvrđuje senzornim testovima. Kvantitativnom analizom sortnih tiola dokazan je izražen utjecaj zemljopisnog porijekla, postupka vinifikacije, upotrijebljenog soja kvasca i uvjeta starenja na njihovu zastupljenost i međusobni omjer u vinima.⁴

Kvantifikacija tiola u realnim uzorcima analitički je zahtjevna. Većina sumporovih spojeva sadržana je u uzorcima u vrlo niskim koncentracijama, u matricama koje su često kompleksne. Matrice složenih uzoraka mogu uzrokovati interferencije među glavnim i manje zastupljenim komponentama. Nadalje, središnji problem analize predstavlja reaktivna priroda većine sumporovih spojeva, jer prilikom analize često dolazi do njihove adsorpcije, oksidacije u disulfide, fotooksidacije i metalima katalizirane degradacije, pregradnje, dimerizacije ili reakcija s polifenolima pri pH-vrijednosti vina. Oprez je nužan u svim fazama analize tiola, od uzorkovanja, čuvanja uzorka, ukoncentriravanja, ekstrakcije, sve do kromatografske

separacije. Ključan je izbor detektora visoke selektivnosti za sumporove spojeve u odnosu na ostale organske tvari u vinu kao što su alkoholi, heterociklički spojevi dušika i dr.^{5,6}

1.1. Svrha rada

Svrha ovog istraživanja bila je razvoj i validacija metoda istodobnog određivanja sortnih tiola 3-SH i 3-SHA u vinu vezanim sustavom plinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa s trostrukim kvadrupolom [**engl.** *Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Triple Quadrupole*, GC-MS/MS (QqQ)], vezanim sustavom plinske kromatografije i detektora kemiluminescencije sumpora (**engl.** *Gas Chromatography-Sulfur Chemiluminescence Detector*, GC-SCD) i vezanim sustavom sveobuhvatne plinske kromatografije i spektrometrije masa (**engl.** *Comprehensive Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GCxGC-MS). Cilj je bio optimirati reakcije derivatizacija sortnih tiola s etil-propiolatom (ETP) i pentafluorbenzil-bromidom (PFBBBr) te usporediti dvije tehnike akumulacije derivata, ekstrakciju na čvrstoj fazi (**engl.** *Solid-Phase Extraction*, SPE) i mikroekstrakciju na čvrstoj fazi iz para iznad otopine (**engl.** *Headspace Solid-Phase Microextraction*, HS-SPME). Analizom istog ekstrakta različitim kromatografskim tehnikama smanjena je varijabilnost i olakšana usporedba korištenih tehnika. Primjenom tehnike izotopnog razrjeđenja (**engl.** *Stable Isotope Dilution Analysis*, SIDA) s deuteriranim izotopomerima sortnih tiola i razvojem metode za praćenje višestrukih reakcija (**engl.** *Multiple Reaction Monitoring*, MRM) spektrometrom masa željelo se smanjiti utjecaj matrice što je više moguće i postići granicu detekcije i određivanja individualnih sortnih tiola nižu od njihovog mirisnog praga detekcije. Ovaj uvjet mora biti ispunjen da bi se metoda kvantifikacije spojeva koji doprinose aromi proizvoda smatrala uspješnom. Analizom eksperimentalnih vina sorte Sauvignon bijeli željelo se utvrditi zastupljenost sortnih tiola, o čemu nema ranijih istraživanja u slučaju hrvatskih vina, i proširiti saznanja o utjecaju različitih vrsta antioksidansa dodanih prilikom vinifikacije na sastav i očuvanje sortnih tiola tijekom starenja vina.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vino i sastav vina

Osnovne komponente vina su voda i etanol, nakon kojih po zastupljenosti slijede šećeri, kiseline, ostali alkoholi i fenoli, koji se određuju relativno jednostavno. Navedeni spojevi važni su u nekoliko aspekata osjetilnih svojstava vina: utječu na slatkoću, kiselost, oporost, gorčinu i boju. Sljedeća skupina spojeva zastupljena je u mnogo nižim koncentracijama, teže se određuje i čine ju hlapljivi esteri i acetali. Često se analiziraju jer doprinose kvaliteti vina. Složenu skupinu još nižih koncentracija čine glikozilirani fenoli, preteče okusa koje se razlažu djelovanjem enzima tijekom konzumacije vina. Prisutne su i mineralne komponente u različitim koncentracijama, koje također doprinose svojstvima vina. Najzastupljenije organske tvari u vinu navedene su u **Tablici 2.1**. Navedene su prosječne masene koncentracije u zbirnoj klasifikaciji vina, dok vrijednosti među različitim vrstama vina variraju. Nekim je tvarima raspon koncentracija zadan zakonskim propisima i pravilnicima poput Zakona o vinu i Pravilnika o vinu, u prvom redu kako bi se izbjeglo patvorenje ili puštanje u promet proizvoda opasnih po zdravlje.^{7,8}

Tablica 2.1. Raspon ili prosječne vrijednosti masenih koncentracija najvažnijih organskih spojeva u vinu; vrijednosti izražene u mg L⁻¹ osim gdje je drugačije naznačeno²

Heksoze i disaharidi		Kiseline	
Glukoza	2 g L ⁻¹ – >50 g L ⁻¹	Vinska	3–11
Fruktoza	2 g L ⁻¹ – 55 g L ⁻¹	Jabučna	1–6
Saharoza	tragovi	Limunska	0–6
Pentoze		Jantarna	0–0,5
Arabinoza	0,8–2,0	Mliječna	0,5–1,5
Ramnoza	0,5–1,0	Galakturonska	0,19
Riboza	0,04	Octena	0,2–5
Ksilozna	0,2–0,4	Mravlja	0,3–0,5
Galaktoza	0,13	Glioksilna	0,0012
Manoza	0,04	Mezoksalna	0,001–0,003
Fukoza	0,005	Glicerinska	tragovi
Inozitol	0,3–0,5	Glukarna	tragovi
Pektin	tragovi	Kininska	tragovi
Alkoholi i ketoni		Šikiminska	tragovi
Etanol	5,5 % – 14 %	Glikolna	0,012
Metanol	≤0,2	α-Hidroksi- <i>izo</i> -kapronska	0,002

Tablica 2.1. (nastavak)

Alkoholi i ketoni		Kiseline	
Viši alkoholi	<300	2-Metil-2,3-dihidroksimaslačna	0,09
<i>n</i> -Propanol	7–56	Oksalna	0,07
<i>izo</i> -Butanol	49–213	Malonska	0,01
2-Metilbutan-1-ol	111–193	Fumarna	var.
3-Metilbutan-1-ol	627–773	2-Metiljabučna	0,02
2-Feniletan-1-ol	5–74	α -Hidroksiglutarna	0,23
2,3-Butilenglikol	0,1–1,5	Akonitska	0,02
Acetoin	0–0,03	Piruvatna	0,01
Glicerol	3–14	α -Ketoglutarna	0,03
Sorbitol	tragovi	Sulfitna (kao SO ₂)	var.
Diacetil	0,2–4	Karbonatna (kao CO ₂)	var.
Aldehidi	0,01–0,5	Esteri	
Dušikovi spojevi		<i>izo</i> -Amil-acetat	2,0
Proteini	0,01–0,03	Etil-heksanoat	0,6
Aminokiseline	0,1–2	Heksil-acetat	0,1
Amidi	0,01–0,08	Etil-oktanoat	1,3
Amini	0,01–0,03	2-Feniletil-acetat	0,1
Amonijak	0–0,7	Etil-dekanoat	0,6
Vitamini	var.	Polifenoli	200–1800 GAE L ⁻¹

GAE – ekvivalenata galne kiseline; var. – varijabilno

Aromatični esteri u vinu su sadržani u manjim količinama, ali zbog niskih mirisnih pragova detekcije i visokih tlakova para značajno doprinose aromi.⁹ Nosioči arome vina pripadaju sljedećim skupinama spojeva: ugljikovodicima, alkoholima, aldehydima, ketonima, karboksilnim kiselinama, esterima, laktonima, tiolima, sulfidima, acetalima, eterima, nitrilima, fenolima, furanima i epoksidima. Ukupni sadržaj ovih spojeva je oko 1 g L⁻¹, a polovicu čine viši alkoholi, koji nastaju tijekom fermentacije metabolizmom kvasca.^{10,11} Uz djelovanje kvasaca, aromatični spojevi nastaju biljnim metabolizmom u bobicama grožđa, metabolizmom bakterija, ekstrakcijom iz drvenih bačvi ili kemijskim reakcijama tijekom starenja vina.¹²

U vinu je identificirano pedesetak anorganskih spojeva. Anorganski spojevi vina dijele se na mineralne tvari, zastupljene u masenim koncentracijama od 10 mg L⁻¹ do preko 1000 mg L⁻¹, elemente u tragovima, kojih ima manje od 10 mg L⁻¹ i elemente u ultratragovima, s masenim

koncentracijama nižim od $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Osim učinka mineralnih tvari na kvalitetu, anorganske vrste važne su zbog kataliziranja brojnih reakcija u vinskoj matrici.¹³

Hlapljivi spojevi porijeklom iz grožđa imaju ključnu ulogu u stvaranju karakterističnih aroma vina i odgovorni su za njihov sortni karakter. Posebnost arome sortnog vina ne ovisi samo o prisutnosti prekursora, već je uzrokovana kombinacijama i omjerima koncentracija aromatičnih spojeva. Najranije istraženi sastojci sortne arome su monoterpenski alkoholi linalool, geraniol, nerol, citronelol i α -terpinen-4-ol, bilo slobodni u vinu ili glikozilirani u grožđu, koji definiraju vina sorte Muškat. Spojevi poput 2-alkiloksipirazina (*izo*-butil-, *izo*-propil- i etil-) heterociklički su nositelji arome vina sorte Cabernet Sauvignon. Pronađeni su u grožđu, a njihovi prekursori nisu identificirani; vino sorte Chardonnay sadrži vitispiran, 1,2,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen i β -damaskenon.^{9,10} Specifična aroma vina sorte Traminac objašnjena je prisutnošću 4-vinilgvajakola i tetrahidro-4-metil-2-(2-metilpropenil)-2*H*-pirana (*cis*-ružinog oksida). Paprena aroma vina sorte Shiraz veže se uz seskviterpen rotundon. Vina nekih sorti vrste *V. labrusca* sadrže metil-antranilat, furaneol i 2-aminoacetofenon.¹⁴

Posljednjih dvadesetak godina istražuju se sortni tioli, identificirani u vinima nekoliko sorti grožđa od kojih je najvažniji Sauvignon bijeli. Mošt ove sorte slabog je mirisa, dok se aroma pojavljuje tijekom alkoholne fermentacije. Još je 1980. godine Peynaud intuitivno predvidio i slikovito opisao¹⁵ postojanje prekursora arome u grožđu ove sorte:

„Kušanjem plodova grožđa Sauvignon bijeli osjeti se karakterističan, vrlo blag okus. I svježe tiješten mošt ima slab miris i okus. Dvadesetak sekundi nakon kušanja, u usnoj i nosnoj šupljini pojavljuje se vrlo intenzivan miris vina ove sorte. Voćna aroma mnogo je naglašena u vinu nego u plodovima pa možemo slobodno reći da fermentacija na svjetlo dana tjera arome skrivene u grožđu.“

Intenzitet arome aromatičnih^a spojeva nije nužno proporcionalan njihovoj zastupljenosti

^a U disertaciji se izrazom „aromatični“ opisuju spojevi koji vinu daju miris i utječu na njegovu aromu. Tako se izbjegava subjektivniji izraz „mirisni“ i izraz „aromatski“ koji nema veze s mirisom već opisuje reaktivnost benzenoidnih i nebenzenoidnih konjugiranih organskih spojeva.

u vinu jer ovisi i o vrsti, odnosno strukturi spoja. Određeni spojevi prisutni u tragovima imaju ključan doprinos nastanku arome, dok drugi prisutni u višim koncentracijama mogu imati marginalnu ulogu. Uzrok je fiziologija njuha, točnije receptori specifični za detekciju tiola.^{16,17} Vezanje aromatičnih spojeva na receptore sparene s G-proteinima u olfaktornom luku sluznice nosa početni je korak tvorbe osjeta njuha. Prema zakonitostima interakcije ligand-receptor, strukturno slični ligandi mogu uzrokovati različit osjet mirisa.¹⁸ Konstrukcijom modela QSAR (**engl.** *Quantitative Structure-Activity Relationship*), točnije kvantitativnog odnosa strukture i aromatičnosti, identificirani su strukturni i vibracijski fragmenti - olfaktofori, koji doprinose mirisu tiola.¹⁹⁻²¹ Računalnim modeliranjem ustanovljeno je da se sulfhidrilna skupina tiola neposredno prije vezanja na receptore kompleksira s bakrovim(II) ionima.^{16,22} Interakcijom ligand-receptor objašnjavaju se neobična svojstva osjeta njuha, npr. pojava različitih mirisnih nota pri različitim koncentracijama spoja. Sortni tioli imaju miris tropskog voća pri vrlo niskim, a miris znoja pri povišenim koncentracijama.²³ Do ove pojave dolazi zbog vezanja na sporedne receptore nakon potpunog zauzeća specifičnog receptora²⁴ i postojanja više veznih mjesta na pojedinom receptoru.²⁵ Unatoč brojnim istraživanjima, precizni modeli za predviđanje vrste i intenziteta mirisa na temelju strukture te priroda osjeta njuha nisu potpuno objašnjeni na molekularnoj razini.

Određivanje relativnog doprinosa spojeva aromi uzorka težak je zadatak jer senzorna analiza, temeljena na njuhu, nužno pati od subjektivnosti. Radi praktičnosti definirana je vrijednost mirisnog praga detekcije (**engl.** *Odor Perception Threshold*) i aktivnost mirisa (**engl.** *Odor Activity Value*, OAV). Određuju se senzornom analizom i olfaktometrijskim (**engl.** *Gas Chromatography-Olfactometry*, GC-O) tehnikama, a opisuju mirisna svojstva spojeva:

- 1) Mirisni prag detekcije je minimalna koncentracija spoja koju trokutnim testom^b osjeti 50 % ispitivača. Pritom nije potrebno provesti identifikaciju vrste mirisa. Uz utvrđenu vrijednost uvijek se mora naznačiti medij u kojem se testiranje provodi (voda, modelno vino ili realno vino).

^b Trokutni test diskriminativni je senzorni test kojim se utvrđuje razlika između dva identična i trećeg neidentičnog uzorka. Služi za istraživanje utjecaja promjene formulacije, proizvodnog postupka ili različitih vanjskih faktora, kao što je npr. pakiranje, na senzorna svojstva.

- 2) Aktivnost mirisa je mjera doprinosa pojedinog spoja aromi složene smjese spojeva, tj. realnog uzorka. Računa se kao omjer masene koncentracije spoja u uzorku i mirisnog praga detekcije. Spoj čija je aktivnost mirisa viša od jedan imaće veći doprinos konačnoj aromi. Spojevi čija je aktivnost mirisa niža od jedan, s druge strane, mogu sinergijom pojačano utjecati na konačnu aromu. Između aktivnosti mirisa i mirisnih nota nema korelacije.^{14, 26, 27}

2.2. Tioli i reaktivnost tiola u vinu

2.2.1. Kemijska svojstva i reakcije tiola s komponentama vina

Hlapljivi spojevi sumpora sadržani su u raznim biljnim vrstama i daju aromu brojnim prehrambenim proizvodima.²⁸⁻³⁰ Doprinos tiola aromi vina može biti pozitivan ili negativan, a ovisi o koncentraciji i vrsti spoja te mirisnim pragovima detekcije tiola. Raznovrsnost tiola u vinu, unatoč ograničenim izvorima sumpora u prirodi, objašnjava se različitim mehanizmima nastanka. Hlapljivi tioli uglavnom nisu sadržani u moštu, a klasificiraju se prema porijeklu i fazi vinifikacije u kojoj nastaju. Sortni tioli oslobađaju se djelovanjem kvasaca na prekursore nastale biljnim metabolizmom u vinovoj lozi, koji je podložan mnogim faktorima: genetici, sastavu tla, klimi, načinu uzgoja i procesima oksidacije i hidrolize koji se odvijaju prije fermentacije zbog oštećenja ploda. Prekursori sortnih tiola su nehlapljivi konjugati aminokiselina i oligopeptida. Fermentativni tioli su nusprodukti metabolizma kvasaca i bakterija koji provode alkoholnu i mliječnokiselu fermentaciju, ali njihovi specifični prekursori ne postoje u grožđu. Ostali tioli produkti su neenzimskih reakcija tijekom pohrane i starenja vina u bačvama i buteljama.³¹

Svojstva spojeva sumpora najprikladnije je opisati usporedbom s analognim spojevima kisika. Najvažnije oksidacijsko stanje sumpora u spojevima u vinu je -2, ali za razliku od kisika atom sumpora može se oksidirati do stanja +6, pa su mnogi procesi kojima podliježu sumporovi spojevi oksidoredukcijskog karaktera (**Tablica 2.2**). Tioli imaju izraženu nukleofilnost: kako je elektrofilnost atoma sumpora manja nego atoma kisika, a valentni su elektroni u atomu sumpora udaljeniji od jezgre, polarizabilnost sumpora je veća i nespareni elektroni lakše tvore kovalentne veze, sudjelujući u nukleofilnim adicijama na aldehide i kinone u vinu.

Tablica 2.2. Tipične reakcije kojima podliježu sumporovi spojevi u vinu³²

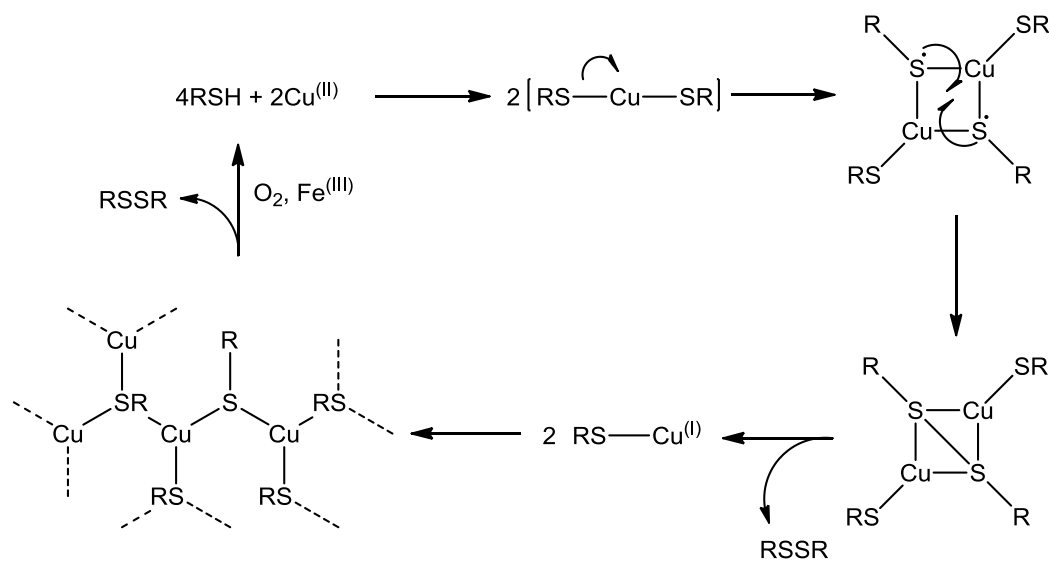
Oksidacijski broj	Vrsta spoja	Primjer reakcije
-2	Sulfidi	$2\text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CS}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
		$\text{H}_2\text{S} + \text{RCHO} \rightarrow \text{RSH} + \text{H}_2\text{O}$
	Tioli	$2\text{RSH} \rightarrow \text{RSSR}$
		$\text{RSH} + \text{E} \rightarrow \text{RS}-\text{E} (-\text{H}^+)$
		$\text{RSH} \rightarrow \text{CuSR}$
	Alkilsulfidi	$\text{RSR} \rightarrow \text{RS(O)R}$
Tioacetati	$\text{RS(O)R}' + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R}'\text{SH} + \text{RCOOH}$	
-1	Alkildisulfidi	$\text{RSSR} \rightarrow 2\text{RSH}$
		$\text{RSSR} + \text{R}'\text{SH} \rightarrow \text{RSSR}' + \text{RSH}$
0	Sulfoksidi	$\text{RS(O)R} \rightarrow \text{RSR}$
+2	Sulfoni	nepoznato
+4	SO ₂ , bisulfit, sulfit	$\text{HSO}_3^- \xrightarrow{\text{sulfit-reduktaza}} \text{HS}^-$
+6	Sulfat	$\text{SO}_4^{2-} \xrightarrow{\text{ATP-sulfurilaza}} \text{5'-adenilil-sulfat}$

E - elektrofilna vrsta

Polarnost veze sumpor-vodik manja je od polarnosti veze kisik-vodik, što utječe na vrelište i druga fizikalna svojstva. Tioli su redovito hlapljiviji od analognih alkohola. I jačina veze sumpor-vodik slabija je od jačine veze kisik-vodik, a izraženija je delokalizacija negativnog naboja u većem sumporovom atomu tiolatnog aniona, stoga tioli imaju kiselij karakter od alkohola. Na primjer, etantiolel ima vrijednost $pK_a = 8,5$, dok je pK_a etanola 15,9. Navedena se svojstva razmatraju prilikom razvoja i optimiranja derivatizacijskih reakcija i drugih tehnika detekcije i kvantifikacije tiola. Veza ugljik-sumpor slične je jakosti kao veza ugljik-kisik, međutim veza sumpor-sumpor (250 kJ mol^{-1}) jača je od veze kisik-kisik (150 kJ mol^{-1}). Zbog toga se oksidacijom tiola lako formiraju disulfidi, koji imaju važnu biokemijsku funkciju u

proteinima i glutationu (Gsh). Nakon formiranja disulfida veze sumpor-sumpor podložne su napadu nukleofila, uključujući i druge tiole, čime nastaju asimetrični disulfidi (RSSR') i polisulfidi (R(S)_nR). Karakteristične su reakcije tiola s kationima prijelaznih metala, koji tvore komplekse s tiolima ili kataliziraju tvorbu disulfida u vinu (**Slika 2.1 i 2.2**).³²

Najpoznatije su reakcije s kationima dvovalentnog bakra (**Slika 2.1**). Sulfidi bakra(II) Cu(SR)₂ nisu stabilni već disproporcioniraju do sulfida bakra(I), CuSR. Predložen je mehanizam po kojem se dvovalentni bakar u prisutnosti sumporova dioksida prevodi u jednovalentni, nakon čega nastaju sulfidi bakra(I), koji se stabiliziraju agregacijom u polimerni oblik. Nastali agregati nisu inertni već mogu reagirati sa željezom(III) u prisutnosti kisika i prijeći u disulfide i bakar(II). Izlaganje vina kisiku dovodi do regeneracije bakrovih(II) iona. Hlapljivi spojevi sumpora ne mogu se potpuno ukloniti iz vina filtracijom nakon tretiranja bakrom, već ostaju vezani u topljivim vrstama koje sudjeluju u oksidoredukcijskim procesima.^{33,34}



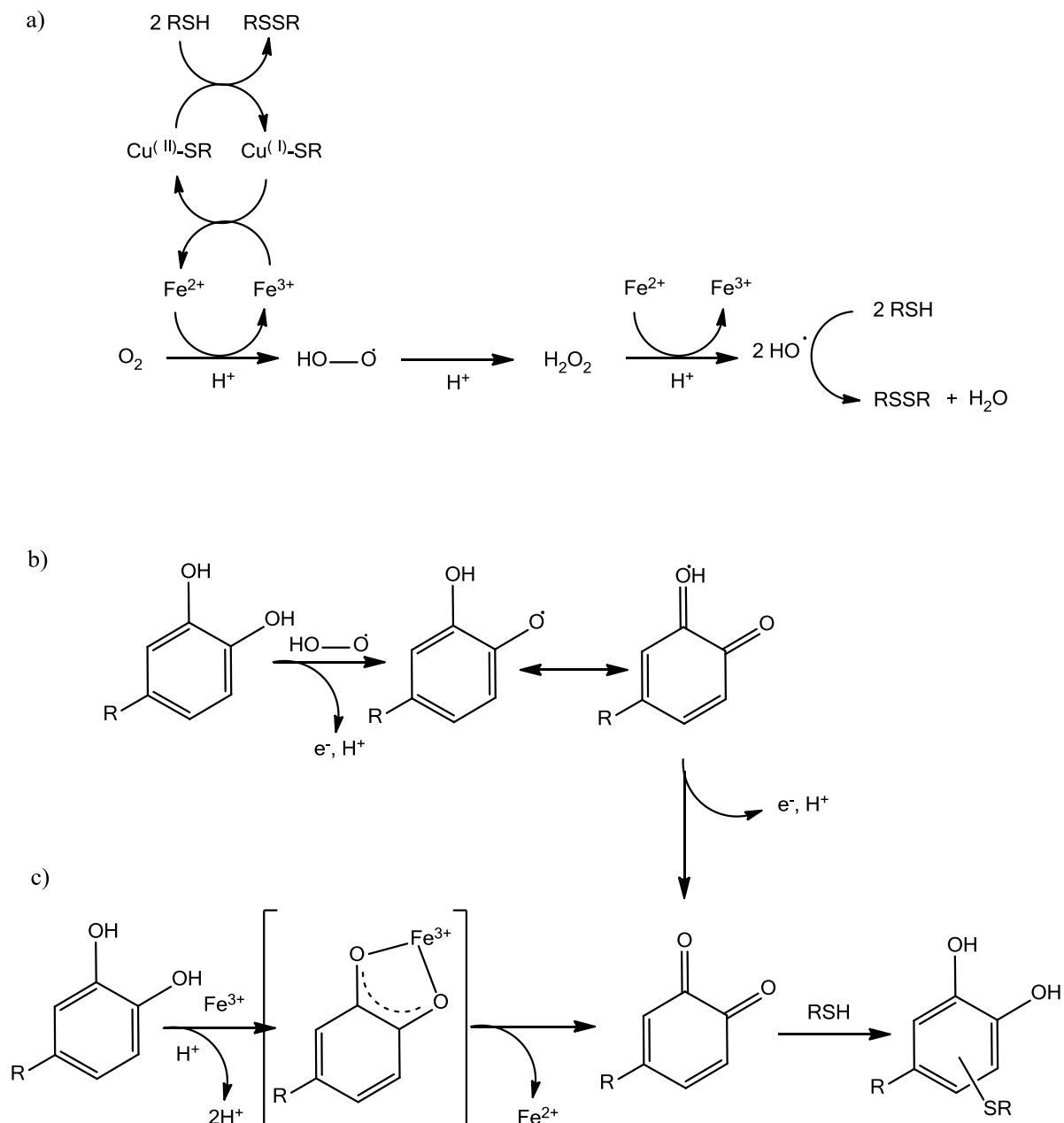
Slika 2.1. Predloženi mehanizam reakcije tiola s bakrovim ionima i nastanak kompleksa bakra(I) i bakra(II)³³

Osim s bakrom, reakcije tiola s metalima u vinu detaljno su proučene samo sa željezom, koje posredno sudjeluje u degradaciji tiola katalizom nastanka kinona i reaktivnih kisikovih radikala.^{35, 36} Degradacija sortnih tiola nedavno je potvrđena praćenjem reakcije s kinonima

obilježenima izotopom ^{13}C , a strukture produkata su potvrđene MS/MS-om i spektroskopijom nuklearne magnetne rezonancije (**engl.** *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR).³⁷ Detaljan pregled oksidoredukcijskih reakcija tiola u vinu, utjecaja redukcijskog potencijala i prisutnosti metalnih kationa napravili su Ferreira i suradnici.³⁸

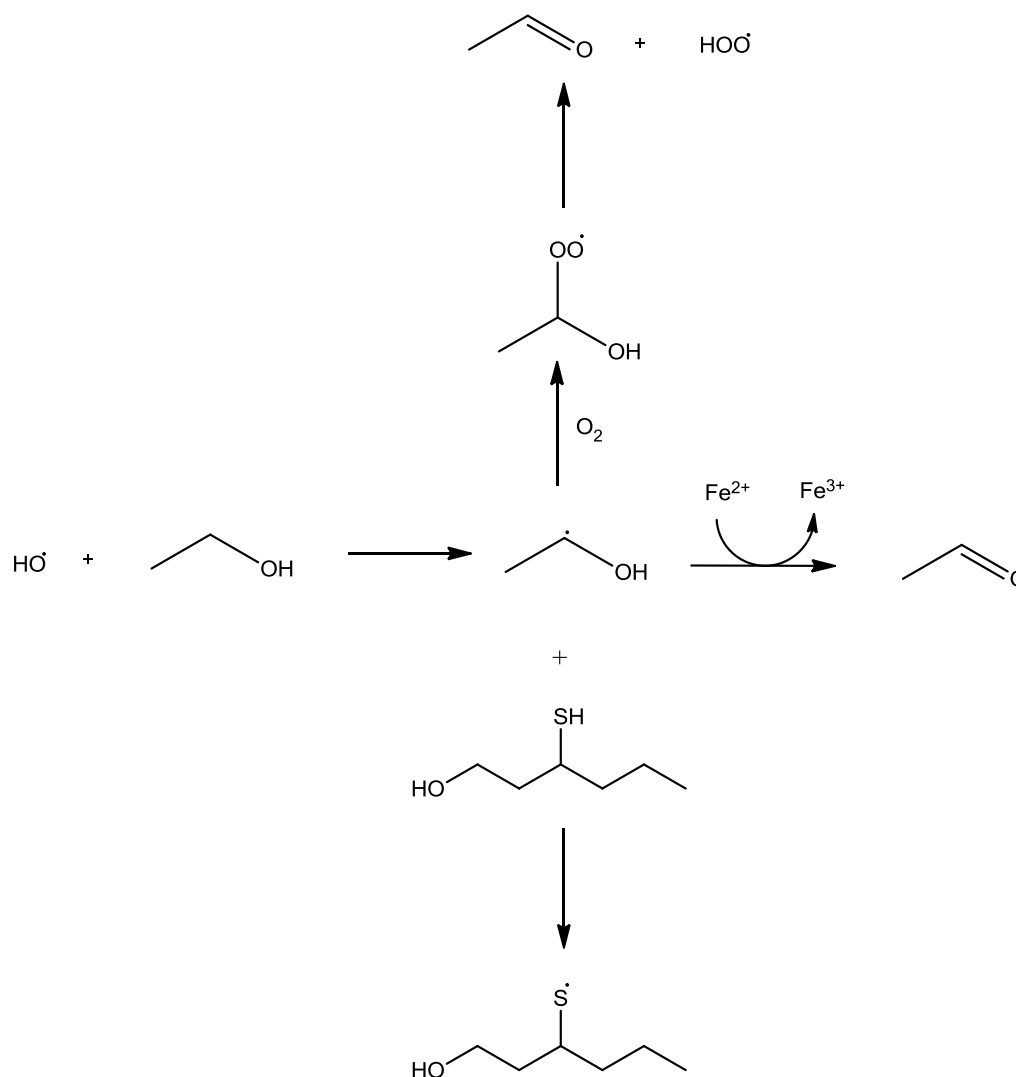
Spojevi *o*-kinoni zastupljeni u vinu nastaju iz katehina, epikatehina i kaftarne kiseline, enzimskom ili kemijskom oksidacijom polifenola. Kemijska oksidacija odvija se u moštu i vinu, dok se enzimska događa u ubranom grožđu i u moštu tijekom fermentacije, kada količina dodanog sumporova dioksida nije dovoljna da u potpunosti inhibira djelovanje polifenol-oksida.³⁹

U prisutnosti željeza(II) dolazi do jednoelektronske redukcije kisika u superoksidni anion radikal, koji u kiselom mediju vina brzo prelazi u hidroperoksidni radikal (HOO^{\bullet}), koji oksidira polifenole i prelazi u vodikov peroksid (**Slika 2.2b**). Metali u nižem oksidacijskom stanju, željezo(II) ili bakar(I), kataliziraju redukciju vodikova peroksida u reaktivni hidroksilni radikal (HO^{\bullet}), koji stupa u reakciju s organskim spojevima (**Slika 2.2a**). Osim nastanka reaktivnih kisikovih vrsta, polifenoli oksidiraju u kinone reakcijom s HOO^{\bullet} ili željezom(III) čime nastaju semikinon-radikali. Gubitak elektrona reakcijom s idućim radikalom ili željezom(III) daje *o*-kinon. Kinoni su odgovorni za degradaciju tiola Michaelovom adicijom (**Slika 2.2c**).⁴⁰



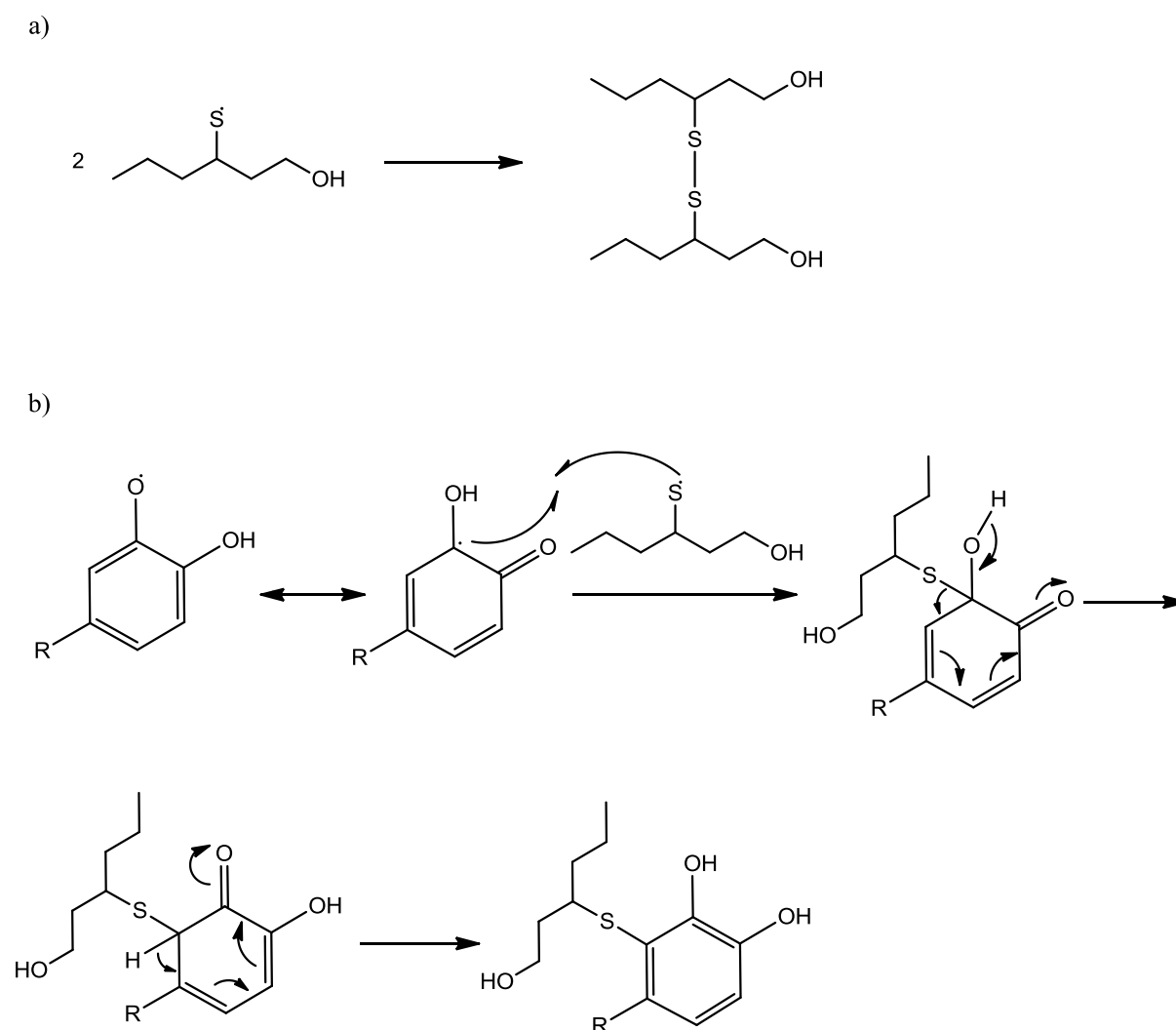
Slika 2.2. Degradacija tiola u vinu a) metalima kataliziranim nastankom reaktivnih kisikovih radikala ili reakcijom s *o*-kinonima koji nastaju: b) djelovanjem kisikovih radikala; c) željezom(III) kataliziranom oksidacijom katehola^{32, 34, 40}

Reakcijom etanola s hidroksilnim radikalom nastaje 1-hidroksietilni radikal, koji uglavnom oksidira u acetaldehid. Kreitman i suradnici⁴¹ dokazali su da osim reakcije s kinonima, gubitak sortnih tiola u vinu uzrokuje i oksidacija 1-hidroksietilnim radikalom (**Slika 2.3**).



Slika 2.3. Mehanizam oksidacije etanola u vinu i prijelaza tiola 3-SH u tiolni radikal⁴¹

Hidroksilni radikal može izravno napasti tiole, ali je ova reakcija marginalna zbog neselektivnosti radikala i visoke koncentracije etanola u vinu. Radikal 1-hidroksietil ima niži redukcijski potencijal ($E= 1,2$ V) od hidroksilnog radikala ($E= 2,5$ V) i trebao bi selektivnije reagirati s komponentama vina. Najvjerojatnije hidroksilni radikal oksidira etanol, da bi nastali 1-hidroksietilni radikal oksidirao tiol 3-SH. Produkt ove reakcije je tiilni radikal, koji dimerizira u disulfid ili reagira sa semikinonima (Slika 2.4).⁴⁰

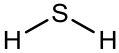

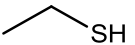
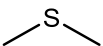
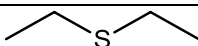
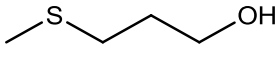
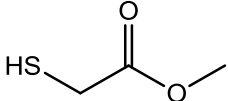
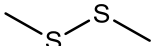
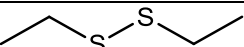
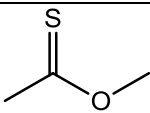
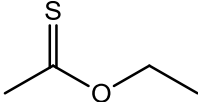


Slika 2.4. Predloženi mehanizam gubitka tiola 3-SH a) dimerizacijom tiilnog radikala u disulfid i b) reakcijom sa semikinon-radikalima⁴⁰

2.2.2. Fermentativni tioli

Hlapljivi tioli nastaju degradacijom aminokiselina tijekom fermentacije mošta svih sorti grožđa. Najpoznatiji predstavnici su sumporovodik, metil-sulfid, dimetil-sulfid, dimetil-disulfid, tioacetati i metionol (**Tablica 2.3**).

Tablica 2.3. Fermentativni spojevi sumpora identificirani u vinu, njihove mirisne karakteristike, mirisni pragovi detekcije i aktivnost mirisa

Grupa spojeva	Naziv	Struktura	Note arome	Mirisni prag detekcije/ ng L ⁻¹	OAV
Sulfidi	Sumporovodik		Pokvarena jaja	1000	35
Alkiltioli	Metantiol		Pokvareno meso	2000	8
	Etantiol		Luk	1000	19
Alkilsulfidi	Dimetil-sulfid		Kuhane kupusnjače, šparoge	25000	30
	Dietil-sulfid		Češnjak	1000	30
	Metionol		Krumpir, cvjetača	10 ⁶	6
Acilsulfidi	Metil-2-sulfanilacetat		Zemljast	400	n.o.
Alkildisulfidi	Dimetil-disulfid		Luk, kupus	29000	1
	Dietil-disulfid		Luk	4000	22
Tioacetati	Metil-tioacetat		Luk, češnjak	50000	2
	Etil-tioacetat		Luk, češnjak	10000	18

n.o.: nije određeno

Kvasci metaboliziraju prirodne izvore sumpora u moštu i antropogene sumporove fungicide, sumporov dioksid i hidrogensulfid, radi nastanka sumporovodika, potrebnog u biosintezi aminokiselina.⁴² Jednostavni fermentativni tioli metantioi, etantioi, dimetil-disulfid, metionol i 2-sulfanilacetaldehid nastaju retro-Michaelovom i Streckerovom razgradnjom cisteina (Cys) i metionina (Met) djelovanjem enzima kvasaca koji provode alkoholno vrenje i bakterija koje provode mliječnokiselno vrenje.^{43, 44} Uvjeti fermentacije, prihrana i soj kvasca utječu na biosintezu spojeva sumpora, a neprikladni uvjeti vode do pojačanog nastanka fermentativnih tiola.

Fermentativni spojevi sumpora imaju malu molekulsku masu, nisko vrelište i redovito su prisutni u vinu u masenim koncentracijama višim od mirisnog praga detekcije (**Tablica 2.4**). Unatoč činjenici da ova skupina spojeva negativno utječe na aromu, vrlo niske koncentracije najlakših fermentativnih tiola u vinu su poželjne. Višegodišnjim skladištenjem mogu se dobiti vrlo kvalitetna vina karakterizirana bukeom (*fr. bouquet*) ili postfermentativnom aromom, opisanom mirisom svježe kuhanih artičoka ili svježe oprane i prozračene posteljine.¹⁵ Uvjeti postizanja idealnog bukea nisu potpuno poznati, a među zaslužnim spojevima ističu se dimetil-sulfid i dietil-sukcinat u vrlo niskim koncentracijama. Sumporovodik pozitivno utječe na buke mladih bijelih vina.⁴⁵⁻⁴⁷

Tablica 2.4. Raspon masenih koncentracija najvažnijih fermentativnih spojeva sumpora u vinu³²

Sorta	$\gamma / \mu\text{g L}^{-1}$					
	H ₂ S	CH ₃ SH	CH ₃ SAc	CH ₃ SCH ₃	CS ₂	C ₂ H ₅ SC ₂ H ₅
Bijela vina						
Chardonnay	1,5–5,0	3,0–8,0	0–7,0	20,0–185,0	0,5–5,0	-
Pinot gris	2,0	3,0	-	11,0	0,5	-
Riesling	0,5–35,0	0–3,0	-	11,0–37,1	0–21,1	0–0,4
Sauvignon bijeli	0,8–4,0	1,7–6,0	-	25,0–118,2	1,0–13,5	0–0,4
Verdelho	1,0	1,6	-	47,7	18,6	0,4

Tablica 2.4. (Nastavak)

Sorta	$\gamma / \mu\text{g L}^{-1}$					
	H ₂ S	CH ₃ SH	CH ₃ SAc	CH ₃ SCH ₃	CS ₂	C ₂ H ₅ SC ₂ H ₅
Crna vina						
Cabernet sauvignon	0–1,6	0–1,5	0–10,0	88,0–379,5	3,0–20,0	0–0,4
Durif	2,0	2,0	18,0	61,0	1,0	-
Merlot	0,5–1,2	0–1,6	3,0–8,0	48,0–235,0	8,0–17,0	0–0,4
Sangiovese	-	-	-	68,0	4,0	-
Shiraz	0–8,7	0–5,0	12,5	28,0–765,0	2,0–45,1	0–0,5

U uvjetima povoljnim za nastanak sumporovodika rasti će koncentracije fermentativnih spojeva sumpora oksidacijskih brojeva -1 i -2 koji uzrokuju „reduciranu“ aromu, koja podsjeća na pokvarena jaja, luk i kuhane kupusnjače. Kako fermentativni tioli pri višim koncentracijama uzrokuju defekt arome, primijenjuju se metode njihovog uklanjanja, najčešće dodatak soli bakra(II) koji uzrokuje taloženje tiola u obliku teško topljivih sulfida, ali ne i dialkilsulfida i tioacetata. Ako se sulfidi ne uklone iz vina, tijekom starenja se raspadaju i ponovno se oslobađa sumporovodik.^{36, 48}

Prisutnost kisika nakon fermentacije održava koncentraciju fermentativnih tiola niskom tijekom starenja vina, vjerojatno zbog reakcije s kinonima.^{49, 50} Pojavu sumporovodika i drugih fermentativnih tiola tijekom fermentacije moguće je spriječiti upotrebom vinskih kvasaca koji otklanjaju nepoželjne mirise ili redovitim praćenjem nastanka organosumporovih spojeva u ranoj fazi vinifikacije.⁵¹ Primijenjuje se i tehnika *sur lie* (fermentacija i pohrana vina na kvascu) kojom se tioli adsorbiraju ili vežu s cisteinom u staničnim stijenkama pa njihova koncentracija opada. Pritom se mora smanjiti sumporenje vina jer sulfit-reduktaza kvasca može uzrokovati nastanak sumporovodika i nakon završetka fermentacije.⁵²

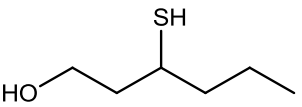
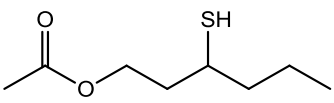
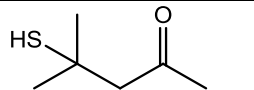
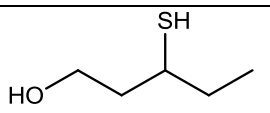
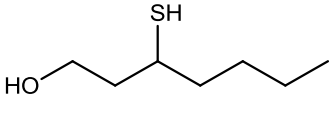
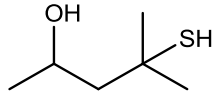
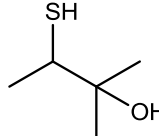
Reakcije fermentativnih tiola slične su reakcijama sortnih tiola.^{46, 53} Metil- i etil-tioacetat starenjem hidroliziraju te se oslobađaju tioli više aktivnosti mirisa. Fermentativni tioli oksidiraju u disulfide i trisulfide, uzročnike latentnih defekata arome koji nastaju tijekom pohrane vina u aerobnim uvjetima. Uz sorte tiola, fermentativni tioli podliježu razgradnji reakcijom s *o*-kinonima.³⁹ Alkilsulfidi, druga najzastupljenija vrsta fermentativnih spojeva sumpora, manje su podložni oksidaciji pa im koncentracija u vinu uglavnom raste zbog nastanka hidrolizom *S*-metilmetionina.⁵⁴

2.2.3. Sortni tioli

Niz godina smatrano je da jedinstvena aroma sortnih vina, posebice sorte Sauvignon bijeli i Concord potječe od nepoznatih spojeva sumpora.^{55, 56} Aromatične tiole 3-sulfanilheksan-1-ol, 3-sulfanilheksil-acetat i 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on koji nastaju tijekom alkoholnog vrenja iz prekursora prisutnih u grožđu i moštu nazivamo sortnim tiolima.⁴ U literaturi se susreće naziv polifunkcionalni tioli zbog drugih funkcionalnih skupina u strukturama ovih spojeva, najčešće hidroksilne i esterske skupine.

Isključivi kriterij svrstavanja tiola u ovu skupinu nije njihova struktura već porijeklo. Spoj metil-2-sulfanil-acetat, nađen u vinima sorte Sauvignon bijeli, Riesling i Grenache te spojevi etil-2-sulfanil-acetat i 3-sulfanilpropil-acetat nađeni u vinima sorte Sauvignon, Semillon i Chardonnay, iako strukturno slični, nisu sortni već fermentativni tioli zbog odsutnosti njihovih prekursora u grožđu i moštu.^{57, 58} Sortni tioli imaju snažan učinak na aromu vina i, za razliku od fermentativnih tiola, vrlo niske mirisne pragove detekcije. Skupina sortnih tiola je u posljednjih desetak godina proširena identifikacijom novih spojeva. Novootkriveni sortni tioli kao 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ol (4-MSPOH) rijetko se kvantificiraju jer je u većini uzoraka njihova masena koncentracija niža od mirisnog praga detekcije pa nemaju izražen utjecaj na kvalitetu vina.^{59, 60} Strukture, mirisne karakteristike, mirisni pragovi detekcije i aktivnosti mirisa sortnih tiola prikazani su u **Tablici 2.5**.

Tablica 2.5. Sortni tioli, njihove mirisne karakteristike, mirisni pragovi detekcije i aktivnosti mirisa

Naziv	Struktura	Note arome	Mirisni prag detekcije/ ng L ⁻¹	OAV
3-Sulfanilheksan-1-ol		Šimšir	60 (racemat)	310
3-Sulfanilheksil-acetat		Grejp, pasiflora	4,2 (racemat)	625
4-Metil-4-sulfanilpentan-2-on		Šimšir, ribizl	0,8	30
3-Sulfanilpentan-1-ol		Grejp	950	n.o.
3-Sulfanilheptan-1-ol		Grejp	35	n.o.
4-Metil-4-sulfanilpentan-2-ol		Citrusi	55	2
2-Metil-3-sulfanilbutan-1-ol		Sirovi luk	n.o.	n.o.

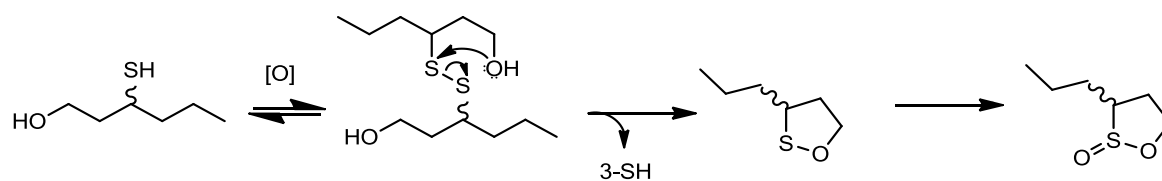
n.o.: nije određeno

Metode detekcije sortnih tiola i istraživanja njihove biogeneze pokrivaju najvažnija tri tiola, posebno zastupljena u vinima sorte Sauvignon bijeli.^{4, 35, 60} Sortni tioli su prvi puta identificirani 1991. godine u pasiflori (*Passiflora sp.*) ekstrakcijom tekuće-tekuće i detekcijom tehnikama plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (**engl.** *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*, GC-MS) i plinske kromatografije s plamenofotometrijskim detektorom (**engl.** *Gas Chromatography - Flame Photometric Detector*, GC-FPD), a kasnije i u drugim biljnim rodovima: grejpu (*Citrus × paradisi*), murvi

(*Morus sp.*), ruti (*Ruta chalepensis*) i žutilovki (*Genisteae sp.*).⁶¹⁻⁶⁵ Izuzev sortnog tiola 3-SHA koji nastaje acetiliranjem 3-sulfanilheksan-1-ola, sortni tioli nastaju oslobađanjem iz nehlapljivih *S*-konjugata aminokiselina.^{4, 35, 66, 67}

Sortni tioli 4-MSP, 3-SH i 3-SHA imaju nizak mirisni prag detekcije od 0,8 ng L⁻¹, 60 ng L⁻¹ i 4,2 ng L⁻¹. Sortni tioli su identificirani u vinima sorti Scheurebe, Colombard, Rizling, Semillon, Petit i Gros Manseng, Traminac, Muškat, Grenache, Merlot, Shiraz i Cabernet Sauvignon.^{4, 35, 60} Tioli 3-SH i 3-SHA kiralni su i u vinu rijetko prisutni kao racemat. Individualni enantiomeri imaju različite mirisne pragove detekcije i mirisni karakter u modelnom vinu.⁶⁸ (*R*)-3-SH ima mirisni prag detekcije od 50 ng L⁻¹ i miris citrusa i pasiflore, (*S*)-3-SH ima mirisni prag detekcije od 60 ng L⁻¹ i miris grejpa; (*R*)-3-SHA ima mirisni prag detekcije od 9 ng L⁻¹ i miris pasiflore, dok (*S*)-3-SHA ima najniži mirisni prag detekcije od 2,5 ng L⁻¹ i miris šimšira. Korelacija između masenih koncentracija enantiomera 3-SH i 3-SHA i arome vina sorte Sauvignon bijeli utvrđena je tekućinskom kromatografijom separacijom na kiralnoj Lipodex koloni s heptakis-(2,3,6-tri-*O*-pentil)- α -ciklodekstrinom kao nepokretnom fazom.⁶⁸⁻⁷⁰ U praktičnom smislu, omjer koncentracija enantiomera tiola 3-SH i 3-SHA nema značajan učinak na aromu vina. (*S*)-Enantiomeri prekursora Cys-3-SH su zastupljeniji, ali je individualni doprinos oslobođenih tiola daleko manji od njihova ukupnog doprinosa.^{71, 72}

Sortni tioli sudjeluju u reakcijama navedenima u **Tablici 2.3**, među kojima je detaljno proučena nukleofilna adicija s *o*-kinonima.^{35, 73-76} Zbog ove reakcije snižava se koncentracija tiola u vinu, a dokazano je da glutation doprinosi očuvanju sortnih tiola kao kompetitivni supstrat nukleofilne adicije.⁷⁷ Sortni tioli oksidacijom prelaze u disulfide, koji se intramolekularno pregrađuju, pa su u vinu proizvedenom od grožđa inficiranog gljivicom *B. cynerea* detektirani spojevi 3-propil-1,2-oksatiolan i 3-propil-1,2-oksatiolan-2-oksid, nastali pregradnjom 3,3'-ditiobis(heksan-1-ola), koji je nastao oksidacijom tiola 3-SH (**Slika 2.5**).^{78,79} Disulfidi i drugi produkti oksidacije imaju različit mirisni prag detekcije i mirisna svojstva u usporedbi sa sortnim tiolima. Nedavno je primjenom tehnika HS-SPME i GC-MS potvrđena prisutnost 2-metil-4-propil-1,3-oksatiolana, koji nastaje kiselo kataliziranom adicijom 3-sulfanilheksan-1-ola na acetaldehid, elektrofil prisutan u oksidiranom vinu.⁸⁰



Slika 2.5. Dimerizacija sortnog tiola 3-SH i disproporcioniranje nastalog disulfida³²

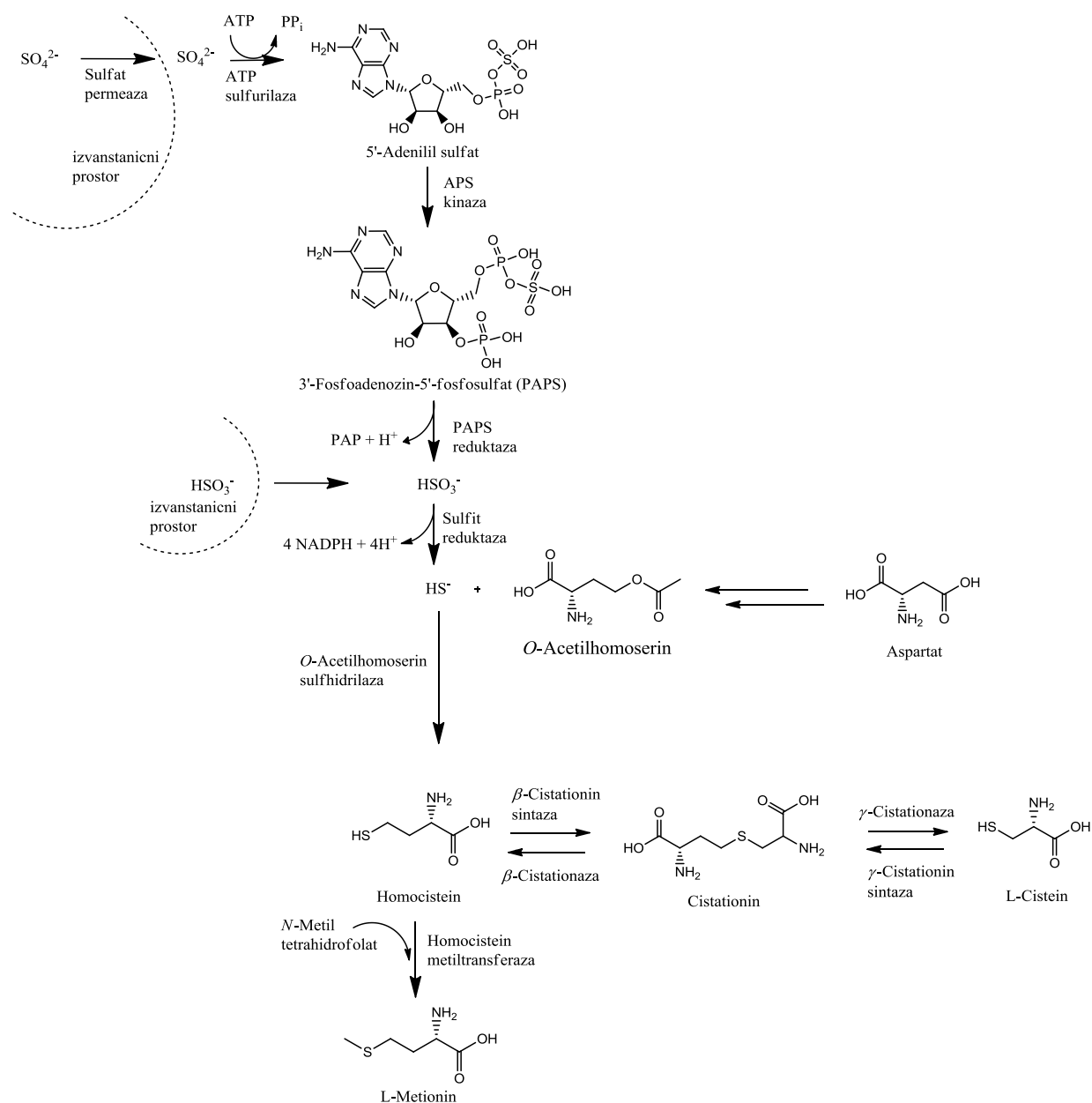
Tijekom starenja vina sortni tiol 3-SHA hidrolizira, a skladištenjem pri povišenoj temperaturi ubrzava se proces hidrolize.⁸¹ Hidroliza slabi tropski karakter arome vina jer ester ima višu aktivnost mirisa od produkta 3-SH.

2.2.3.1. Biogeneza sortnih tiola

Sumpor je makronutrijent potreban za biosintezu aminokiselina metionina i cisteina, sadržan u glutationu, oligopeptidima, proteinima i ostalim, manje zastupljenim biomolekulama u bilju: izvanstaničnim polisaharidima, klasterima željezo-sumpor, koenzimu A, vitaminu B₁ i fitokelatinima.⁸² Osnovni izvor sumpora tijekom alkoholnog vrenja je sulfat, čija je masena koncentracija u moštu u rasponu od 100 mg L⁻¹ do 700 mg L⁻¹.^{83, 84} Ostali izvori sumpora su sumporov dioksid, u upotrebi zbog antimikrobnog i antioksidacijskog učinka i elementarni sumpor korišten kao kontaktni fungicid na sadnicama vinove loze.^{42, 85-87}

Sulfat se asimilira iz tla kroz korijenje djelovanjem sulfat-permeaze, koju pokreće membranski potencijal biljnih stanica. Unutar lista, sulfat se akumulira u vakuolama ili reducira u plastidima ciklusom redukcije sulfata u hidrogensulfidni ion, ishodišnu vrstu u biosintezi svih spojeva sumpora u biljkama.⁸⁸ Ciklus redukcije sulfata započinje aktivacijom sulfata adeniliranjem, koje snižava njegov reduksijski potencijal da bi zatim slijedila redukcija u dva koraka. Aktivacija sulfata odvija se prijenosom adenzilfosforilne skupine ATP-a na sulfat i nastankom 5'-adenilil-sulfata (APS) posredstvom enzima sulfurilaze. U sljedećem koraku, APS-kinaza fosforilira APS i nastaje 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS). Ovaj se spoj zatim reducira djelovanjem PAPS-reduktaze u hidrogensulfit, kojeg sulfit-reduktaza zatim reducira u hidrogensulfid.⁸⁹ Ugradnja hidrogensulfida u aminokiseline protječe u nekoliko enzimski kataliziranih koraka. Enzim *O*-acetylhomoserin-sulfhidrilaza

katalizira nastanak homocisteina. Cistationin- β -sintaza prevodi homocistein u cistationin, dok γ -cistationaza provodi cijepanje supstrata te nastaje cistein. Metionin nastaje iz *O*-acetilhomoserina djelovanjem *O*-acetilhomoserin-sulfhidrilaze i homocistein-metiltransferaze u dva koraka.⁹⁰⁻⁹⁵ Prva faza biokemijskog procesa nastanka sortnih tiola prikazana je na **Slici 2.6**.

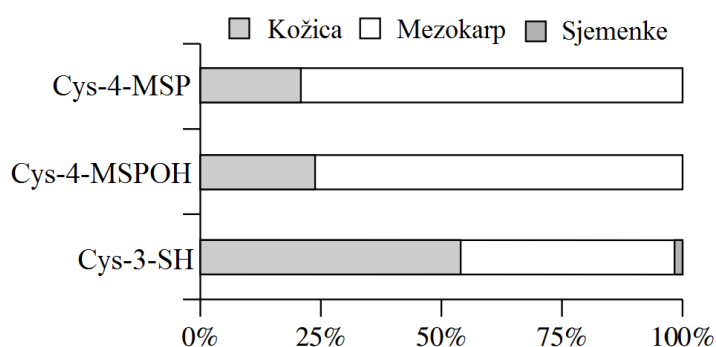


Slika 2.6. Prva faza biogeneze sortnih tiola: ciklus redukcije sulfata i nastanak ishodišnih aminokiselina sumpora, cisteina i metionina⁹⁶

Ciklus redukcije sulfata aktivira se kada postoji fiziološka potreba za cisteinom i metioninom. U određenim uvjetima, uglavnom u nedostatku izvora dušika, iz stanica se oslobađa višak hidrogensulfita. Deficit dušika inhibira ciklus redukcije sulfata, a iz oslobođenog hidrogensulfita nastaje sumporovodik zbog reduktivnih uvjeta anaerobne fermentacije pri niskim pH-vrijednostima.^{97, 98}

Potvrđena je uloga kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u nastanku tiola koji utječu na senzorna svojstva vina.^{85, 99-105} Uz neenzimske kemijske i fotokemijske reakcije prilikom starenja vina, enzimski procesi biotransformacije metionina, cisteina i glutationa imaju najvažniju ulogu u nastanku tiola.^{46, 53, 85, 104, 106} Na biosintezu prekursora sortnih tiola utječu unutarnji uvjeti kao što je sadržaj aminokiselina u moštu, koji se razlikuje među sortama grožđa,¹⁰⁷ ali i vanjski uvjeti, stresori: oksidacija, oštećenja, vlažnost, suša,^{108, 109} nedostatak dušika¹⁰⁹⁻¹¹² i infekcija biljnim patogenima, osobito gljivicom *Botrytis sp.*¹¹³

Prekursori hlapljivih spojeva: terpena, norizoprenoida i tiola koncentrirani su u mezokarpu, mesnatom tkivu bobice grožđa i egzokarpu, kožici ploda kao glikokonjugati ili konjugati aminokiselina (**Slika 2.7**). Hlapljivi spojevi se oslobađaju fizičkom abrazijom i cijepanjem konjugata pod djelovanjem glikozidaza i peptidaza kvasca.¹¹⁴ Oko 80 % sadržaja prekursora tiola 4-MSP nalazi se u mezokarpu, dok se približno jednake količine prekursora tiola 3-SH nalaze u mezokarpu i egzokarpu.^{115, 116}



Slika 2.7. Raspodjela cisteinskih prekursora sortnih tiola u dijelovima bobice grožđa¹⁵

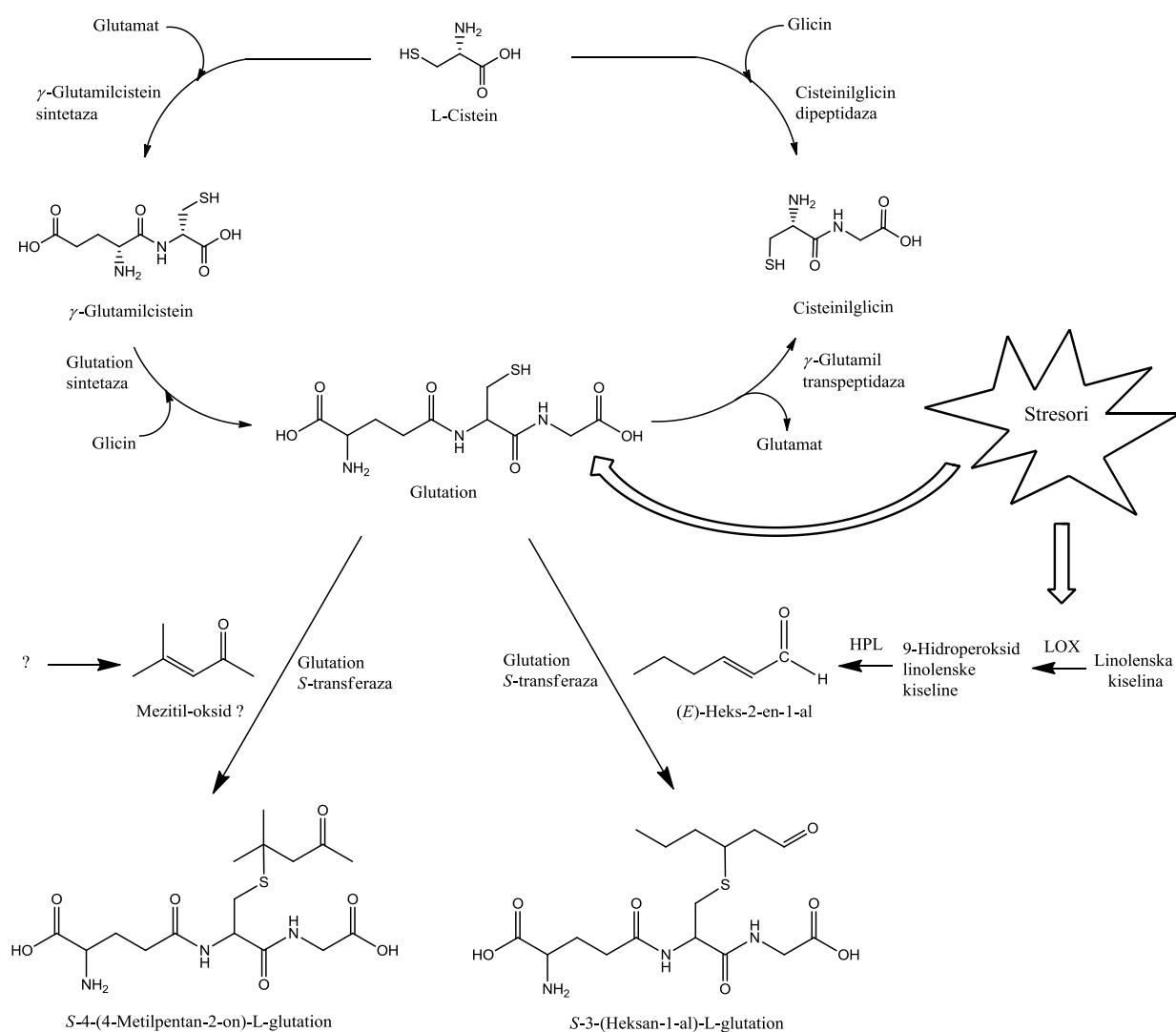
Tioli u grožđu nisu u slobodnom obliku već kao konjugati veće molekulske mase i viših vrelišta, bez mirisa i utjecaja na aromu. Slobodni, aromatični tioli nastaju iz prekursora djelovanjem mikroorganizama ili enzimskih pripravaka.¹¹⁷ Primijećeno je da dodatak β -glikozidaze u mošt ne uzrokuje oslobađanje tiola 4-MSP, odnosno da prekursor sortnog tiola nije glikozid.¹⁵ Djelovanjem β -liaze specifične za *S*-konjugate cisteina na ekstrakt mošta sorte Sauvignon bijeli dokazana je prisutnost cisteinskih prekursora tiola 3-SH i 4-MSP u grožđu prije fermentacije.¹¹⁸ I β -liaze iz ekstrakta goveđeg jezika uzrokuju oslobađanje sortnih tiola.^{85, 119}

Plinskokromatografska analiza prekursora prevedenih u trimetilsililne derivate pokazuje da se 3-SH i 4-MSP nalaze u moštu kao *S*-3-(heksan-1-ol)-L-cistein i *S*-4-(4-metilpentan-2-on)-L-cistein.¹¹⁹ Ekstrakt bakterije *Eubacterium limosum* i triptofanaza izolirana iz bakterije *Escherichia coli* cijepaju prekursor Cys-3-SH *in vitro*.^{119, 120} β -Liaza bakterijskog ekstrakta razgrađuje cistein-*S*-konjugat pa je pretpostavljeno da kvasac *Saccharomyces cerevisiae* na sličan način prevodi prekursore u sortne tirole.^{119, 121}

Nastanak sortnih tiola 3-SH i 4-MSP i njihovih prekursora odvija se u nekoliko koraka, a započinje formiranjem α,β -nezasićenih karbonilnih spojeva (*E*)-heks-2-en-1-ala i alkenona mezitil-oksida prilikom oštećenja i muljanja grožđa zbog degradacije nezasićenih masnih kiselina. Alkoholi i aldehidi sa šest atoma ugljika široko su rasprostranjeni u biljkama i nastaju enzimskom razgradnjom linolne i linolenske kiseline u prisutnosti kisika.^{122, 123, 124} U ovom procesu acilhidrolaza oslobađa masne kiseline iz staničnih membrana, a lipooksigenaza katalizira njihovu oksidaciju. Cijepanjem nastalih peroksida oslobađaju se karbonilni spojevi (**Slika 2.8**).

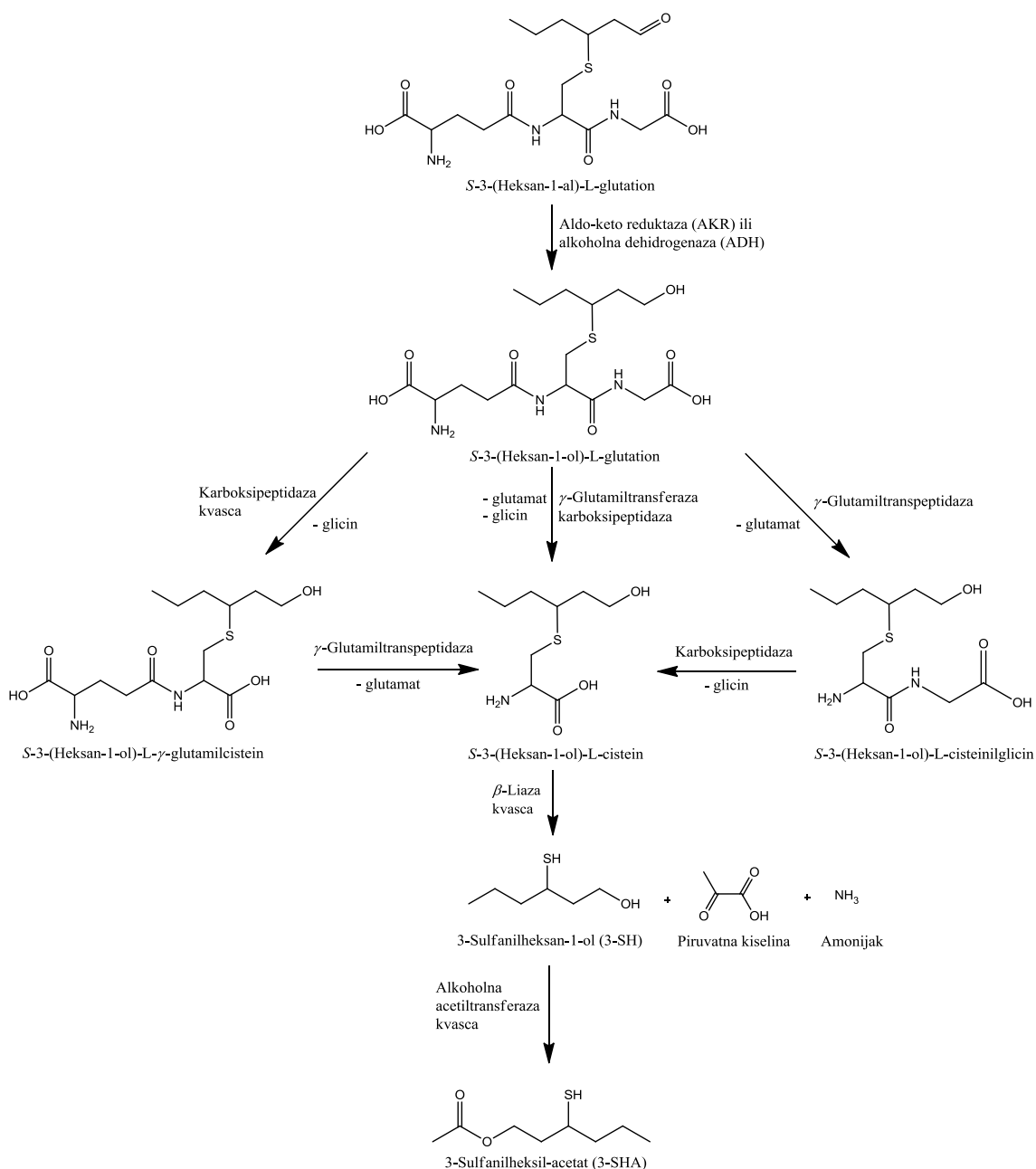
Kako su najranije identificirani L-cisteinski prekursori sortnih tiola, smatralo se da tioli nastaju izravnom Michaelovom adicijom α,β -nezasićenog karbonilnog spoja na L-cistein. Subileau i suradnici¹²⁵ našli su da je *S*-3-(heksan-1-ol)-L-cistein bio izvor samo 7 % ukupnog tiola 3-SH u vinu sorte Sauvignon bijeli. Danas je poznato da se karbonilni spojevi adiraju na glutation djelovanjem glutation *S*-transferaze. Dokazano je da (*E*)-heks-2-en-1-al više doprinosi nastanku prekursora Gsh-3-SH nego prekursora Cys-3-SH jer inducira glutation *S*-

transferazu.¹¹³ Sortni tioli se ne oslobađaju direktno iz glutationskih prekursora, već u višestupanjskom procesu iz glutationskih prekursora nastaju cisteinski (Slika 2.8). Glutation je tripeptid L-cisteina, L- γ -glutaminske kiseline i glicina koji sprječava oštećenje stanice djelujući kao kompetitivni supstrat u oksidacijskim procesima,¹²⁶⁻¹²⁸ a njegovu biosintezu induciraju stresori.^{129, 130} Glutation ima ulogu u metabolizmu dušika i sumpora, biotransformaciji ksenobiotika i endogenih toksičnih tvari.⁷⁷



Slika 2.8. Predložena druga faza biogeneze sortnih tiola: nastanak glutaciona i glutationskih konjugata sortnih tiola induciran egzogenim i endogenim stresorima⁹⁶

Adicijom (*E*)-2-heks-2-en-1-ala na glutation nastaje kratkoživi međuprodukt, *S*-3-(heksan-1-ol)-*L*-glutation (Gsh-3-SHAL), koji se djelovanjem alkoholne dehidrogenaze (ADH) ili aldo-ketoreduktaze (AKR) prevodi u stabilan prekursor *S*-3-(heksan-1-ol)-*L*-glutation (Gsh-3-SH). Prisutnost Gsh-3-SH u moštu znači da je ovaj spoj međupreursor iz kojeg nastaje Cys-3-SH (Slika 2.9).¹³¹⁻¹³⁵

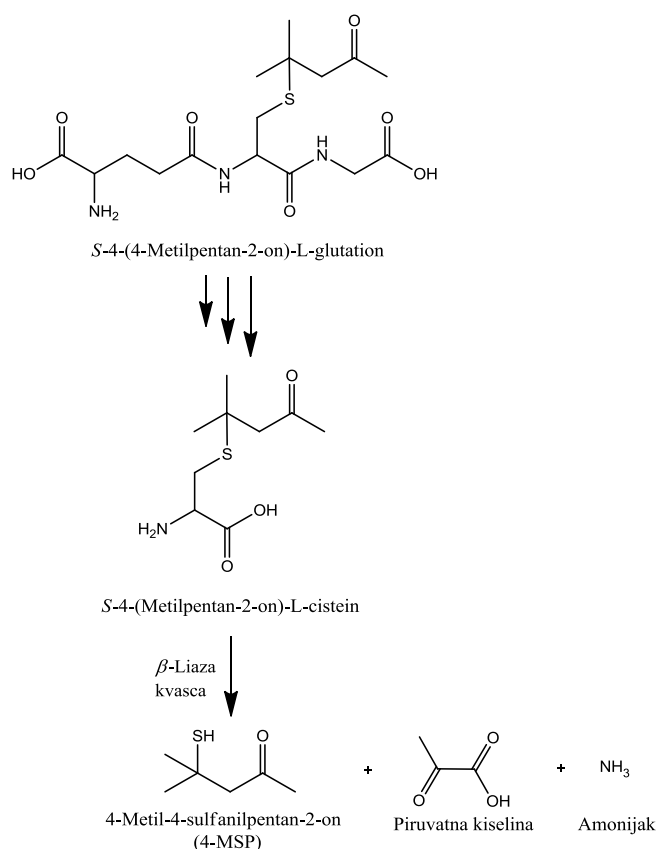


Slika 2.9. Predložena završna faza biosinteze sortnih tiola: nastanak sortnih tiola 3-SH i 3-SHA⁹⁶

Prekursor Gsh-3-SH djelovanjem kvasca prelazi u drugi međuprekursor, *S*-3-(heksan-1-ol)-*L*-cisteinilglicin (CysGly-3-SH) i *S*-3-(heksan-1-ol)-*L*- γ -glutamilcistein (GluCys-3-SH).^{136, 137} *S*-Cisteinilni prekursor nastaje djelovanjem γ -glutamil-transpeptidaze, koja uklanja glutaminsku kiselinu, i karboksipeptidaze, koja uklanja glicin iz međuprodukta.¹³⁴ U posljednjem koraku liaza cijepa vezu u cisteinu, atom sumpora ostaje na fragmentu i nastaje slobodni tiol i neidentificirani međuprodukt koji se razlaže na piruvatnu kiselinu i amonijak (**Slika 2.9**).¹³⁸

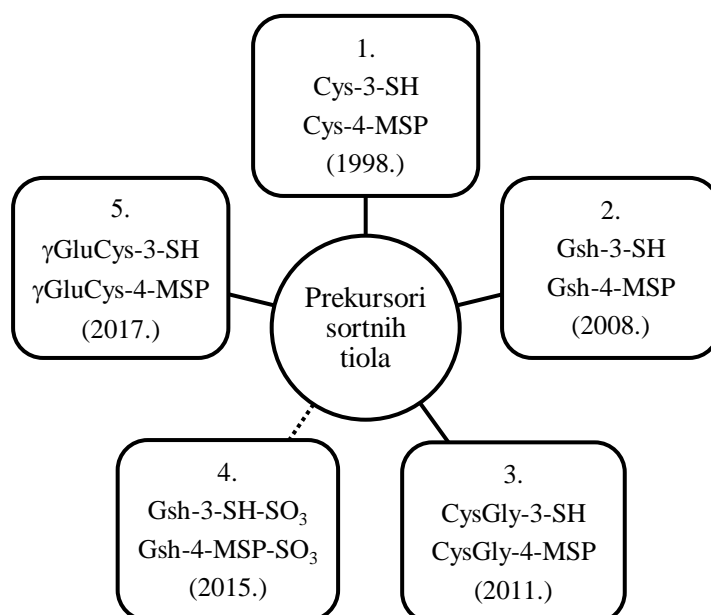
Prekursor tiola 3-SHA nije nađen u grožđu i vinu. Dokazano je da ovaj tiol nastaje esterifikacijom tiola 3-SH i octene kiseline prilikom fermentacije, djelovanjem alkoholne acetiltransferaze kvasca (**Slika 2.9**).¹³⁹

Nastanak tiola 4-MSP (**Slika 2.10**) sličan je nastanku tiola 3-SH i uključuje korake postupne razgradnje glutationiliranog (Gsh-4-MSP) i cisteiniliranog (Cys-4-MSP) prekursora.^{118, 136, 140}



Slika 2.10. Predložena završna faza biosinteze sortnih tiola: nastanak sortnog tiola 4-MSP⁹⁶

Iako su masene koncentracije cisteinskih prekursora u moštu u korelaciji s masenim koncentracijama sortnih tiola u vinu, samo mali udio prekursora se prevodi u slobodne tirole prilikom fermentacije (**Tablica 2.6**). Izotopima obilježeni prekursori prikladni su za istraživanje reakcija nastanka tiola zbog sličnih svojstava i jednostavnog razlikovanja od prirodnih prekursora spektrometrijom masa.¹⁴¹ Subileau i suradnici¹¹⁰ su primjenom izotopno obilježenog prekursora Cys-3-SH odredili da je konverzija u tiol 3-SH manja od 1 %. Konverzija prekursora Gsh-3-SH u sortni tiol izmjerena primjenom izotopomera [²H₂]-Gsh-3-SH bila je 4,4 %.¹⁴² Primjenom izotopomera [²H₈]-(*E*)-heks-2-en-1-ala nađeno je da se prilikom biosinteze 10 % prisutnog aldehida ugrađuje u tiol 3-SH.¹⁴³ Ako se prilikom izračuna konverzije prekursora u sortne tirole uzme u obzir masena koncentracija prekursora zaostalih u vinu nakon fermentacije, može se objasniti porijeklo oko 45 % udjela sortnog tiola 3-SH uz sljedeći doprinos prekursora: Gsh-3-SH (25 %), CysGly-3-SH (1 %), γ GluCys-3-SH (1 %), Cys-3-SH (7 %), (*E*)-heks-2-enal (10 %) i Gsh-3-SHAL i njegovog adukta (1 %).¹⁴⁴ Konverzija prekursora Cys-4-MSP i Gsh-4-MSP objašnjava oko 20 % udjela tiola 4-MSP u vinu sorte Sauvignon bijeli.^{110, 145, 146} Do danas dokazani i predloženi prekursori sortnih tiola u vinu prikazani su na **Slici 2.11**.



Slika 2.11. Podjela prekursora sortnih tiola u skupine prema vrsti konjugata i vremenskom redosljedu njihovog otkrića ili predlaganja. Prekursori četvrte skupine još nisu detektirani u moštu i vinu

Tablica 2.6. Konverzija predloženih prekursora sortnih tiola u 3-SH i 4-MSP. Sojevi kvasca nisu navedeni, ali utječu na konverziju

Tiol	Prekursor	Praćeni spoj	Medij	Konverzija / %	Lit. izvor	
3-SH	Cys-3-SH	-	Mošt	<10	116	
		Cys-3-SH	Modelno vino	1,1	147	
		[² H ₈]-Cys-3-SH		<1	110	
		Cys-3-SH		14	133	
		Cys-3-SH		0,5	148	
	Gsh-3-SH	[² H ₂]-Gsh-3-SH	Mošt	4,4	142	
		(<i>R</i>)-Gsh-3-SH	Modelno vino	3	133	
		Gsh-3-SH		0,5	148	
		Gsh-3-SH		1,05	149	
	Gsh-3-SHAL	Gsh-3-SHAL	Mošt i	0,40 – 0,45	150	
	Gsh-3-SH-SO ₃	Gsh-3-SH-SO ₃	modelno vino			0,38 – 0,42
	(E)-heks-2-en-1-al	[² H ₈]-(<i>E</i>)-heks-2-en-1-al	(E)-heks-2-en-1-al	Mošt	10	143
				Modelno vino	58,8	151
		(E)-heks-2-en-1-ol	(E)-heks-2-en-1-ol		9,4	
	4-MSP	Cys-4-MSP	Cys-4-MSP	Modelno vino	1	152
Gsh-4-MSP		[² H ₁₀]-Gsh-4-MSP	Mošt	0,3	146	
		Gsh-4-MSP	Modelno vino	0,5	149	

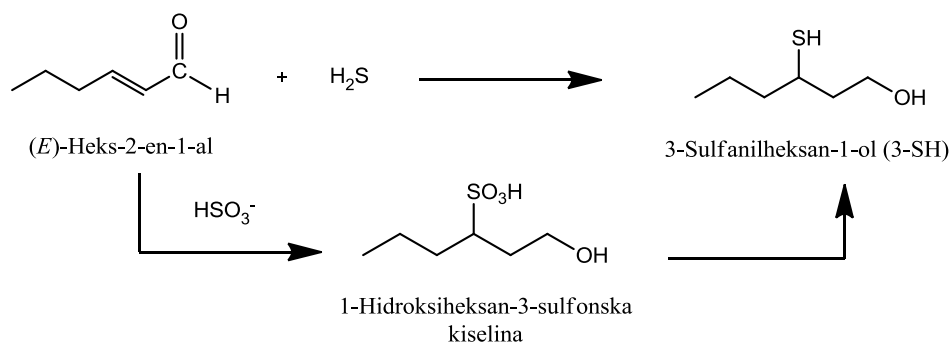
Predloženi biosintetski putevi nastanka: degradacija cisteinskog prekursora, degradacija glutationskog prekursora te posredna degradacija glutationskog u cisteinski prekursor koji se zatim razlaže ne objašnjavaju ukupnu zastupljenost sortnih tiola u vinu. Masena koncentracija tiola određena konverzijom prekursora mnogo je niža od stvarnih koncentracija tiola u vinu.^{110, 153} Dokazana je prisutnost nerazgrađenih prekursora u vinu nakon alkoholne fermentacije.^{133, 136, 154, 155} Prema Coetzee i suradnicima,³⁵ većina sojeva kvasca *S. cerevisiae* može prevesti do 10 % prekursora u slobodne tiole zbog slabog afiniteta enzima za cisteinilirane supstrate.

Ova saznanja ukazuju na postojanje alternativnog puta biosinteze tiola, koji bi uključivao nepoznate prekursore ili aldehide i ciklizirane strukture koji su derivati ili međuprekursori poznatih prekursora.^{4, 142, 148, 154} Predložen je izravni put nastanka sortnih tiola 1,4-Michaelovom adicijom sulfhidrilne skupine hipotetskog donora na mezitil-oksidi kojom nastaje 4-MSP, odnosno na (*E*)-heks-2-en-1-al nakon čega slijedi redukcija enzimima kvasca i nastanak 3-SH (**Slika 2.12**).

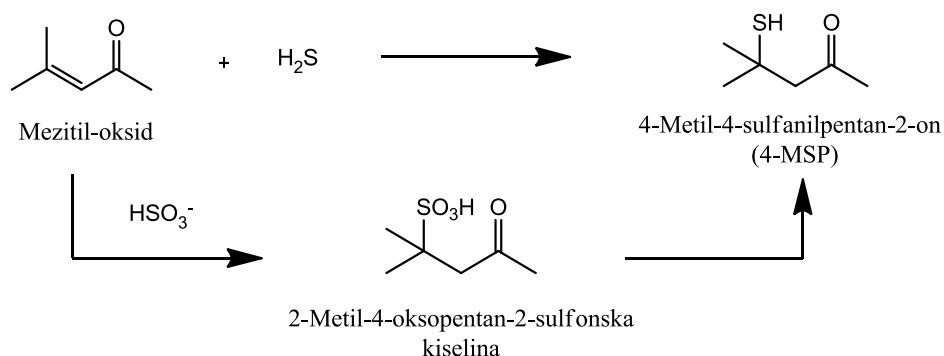
Prema Schneider i suradnicima¹⁴³ hipotetski donor je sumporovodik, a poznato je da se njegovim dodatkom u mošt prije fermentacije povisuje koncentracija tiola 3-SH u vinu. Unatoč tome, ovim je radom uočena odgoda između potrošnje aldehida, koja se odvija u prvim satima fermentacije, i nastanka sumporovodika metabolizmom kvasaca, pa je razdoblje nastanka tiola ovim putem vrlo ograničeno.^{143, 151} Predloženi put nije potvrđen upotrebom izotopomera sumporovodika.^{137, 151} Uz deficit pantotenske kiseline kvasci pojačano proizvode sumporovodik,¹⁵⁶ a njegov nastanak je inhibiran dodatkom do 250 µg L⁻¹ pantotenske kiseline u mošt ovisno o soju korištenog kvasca.¹⁵⁷ Pantotenska kiselina ima ulogu kofaktora koenzima A, koji sudjeluje u biosintezi *O*-acetylserina i *O*-acetylhomoserina, potrebnih za nastanak sortnih tiola. Predloženi mehanizam biogeneze izravnom adicijom sumporovodika mogao bi se istražiti mjerenjem koncentracije sortnih tiola u vinu proizvedenom od mošta obogaćenog pantotenskom kiselinom.

Duhamel i suradnici¹⁵⁸ opisali su reakciju (**Slika 2.12**) kojom iz bisulfita dodanog tijekom vinifikacije i (*E*)-heks-2-en-1-ala ili mezitil-oksida nastaju 1-hidroksiheksan-3-sulfonska kiselina, odnosno 2-metil-4-oksopentan-2-sulfonska kiselina, koje bi redukcijom mogle prijeći u tiol 3-SH i 4-MSP.

a)



b)



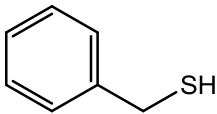
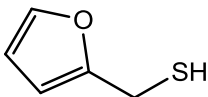
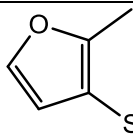
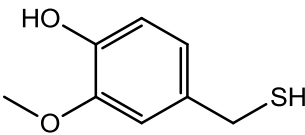
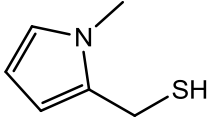
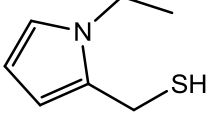
Slika 2.12. Prijedlog dodatnog puta nastanka sortnih tiola a) 3-SH i b) 4-MSP izravnom adicijom sumporovodika na (*E*)-heks-2-en-1-al i mezitol-oksidi^{143, 158}

2.2.4. Ostali tioli u vinu

Tijekom pohrane i starenja vina sorti Chardonnay, Sauvignon bijeli, Semillon, Cabernet Sauvignon i Merlot nastaju tioli koji se ne svrstavaju u prethodne dvije skupine.⁶⁰ Benziltiol, 2-furfuriltiol i 2-metil-3-furantiol (2-MFT) imaju vrlo nizak mirisni prag detekcije i mirisne note dima, pržene kave ili pečenog mesa (**Tablica 2.7**). U odležanom pjenušcu Veuve Clicquot Ponsardin tehnikama HS-SPME i GC-MS pronađeni su 2,3-dimetiltiofen, 2,5-dimetiltiofen, 2-acetiltiofen i 2-etiltiazol, koji vjerojatno nastaju Maillardovom reakcijom šećera i sumporovih aminokiselina.¹⁵⁹ Nedavno su Gros i suradnici¹⁶⁰ tehnikom dvodimenzijske plinske kromatografije odstranjivanjem najzastupljenijeg sastojka uz detekciju tandemnom spektrometrijom masa (*heartcutting* GC-GC-MS/MS) i prethodnu

ekstrakciju tehnikom SPE i destilaciju pri sniženom tlaku identificirali derivate pirola s tiolnom skupinom u vinu sorte Chardonnay. Pons i suradnici¹⁶¹ su u vinu sorte Sauvignon bijeli odležanom u hrastovim bačvama pronašli vanililtiol tehnikom HS-SPME i GC-MS/MS.

Tablica 2.7. Ostali tioli u vinu i njihove mirisne karakteristike

Naziv	Struktura	Note arome	Mirisni prag detekcije/ ng L ⁻¹	OAV
Benziltiol		Dim	0,3	440
2-Furfuriltiol		Pržena kava	0,4	540
2-Metil-3-furantiol		Kuhano meso	3	66
Vanililtiol (4-Hidroksi-3-metoksibenzenmetantiol)		Cimet, dim	3,8	n.o.
1-Metilpirolil-2-metantiol		Lješnjak	0,7	n.o.
1-Etilpirolil-2-metantiol		Lješnjak	1,4	n.o.

n.o.: nije određeno

Spoj 2-furfuriltiol nastaje reakcijom sumporovodika s furfuraldehidom u drvenim bačvama, u vinu proizvedenom tehnikom *barrique*.¹⁶² Spoj 2-metil-3-furantiol nastaje Maillardovom reakcijom cisteina ili sumporovodika s ksilozom i drugim pentozama^{163, 164} ili reakcijom aldehida i cisteina.¹⁶⁵ Reakcije benziltiola, 2-furfuriltiola i 2-metil-3-furantiola u vinu slične su reakcijama ostalih tiola: podliježu oksidaciji u disulfide i adiciji s *o*-kinonima kojom degradiraju sortni tioli, sumporovodik i glutation.³²

2.3. Sadržaj sortnih tiola u vinu

Prvi rad u kojem se navodi utjecaj nefermentativnih tiola na aromu vina objavili su Du Plessis i Augustyn 1981. godine, koji su istraživali karakteristične tropske arome vina sorti Chenin bijeli i Colombar.¹⁶⁶ Dodatkom sortnog tiola 4-MSP u modelno vino nađena je aroma identična aromi realnog vina. Struktura sortnih tiola nije bila poznata, već se radilo o nagađanju. Darriet i suradnici¹⁶⁷ izolirali su 4-MSP iz vina sorte Sauvignon bijeli, dok je Guth potvrdio¹⁶⁸ njegovu prisutnost u vinu sorte Scheurebe u masenoj koncentraciji od 400 ng L⁻¹. U radu Schneider i suradnika¹⁶⁹ tiol 4-MSP je detektiran u vinu sorte Sauvignon bijeli i Bacchus u masenoj koncentraciji mnogo višoj od mirisnog praga detekcije, a nije pronađen u vinu sorte Muscadet, u kojem je masena koncentracija tiola 3-SH bila visoka. Tominaga i suradnici¹⁷⁰ su potvrdili doprinos tiola 4-MSP, 3-SH i 3-SHA aromi vina sorte Sauvignon bijeli, uz masene koncentracije sortnih tiola iznad mirisnog praga detekcije.

Dva manje poznata sortna tiola, 4-sulfanil-4-metilpentan-2-ol i 3-sulfanil-3-metilbutan-1-ol detektirani su u vinu sorti Muškat i Traminac.¹¹⁹ Značajna prisutnost sortnih tiola potvrđena je i u vinu sorti Colombard, Petit Manseng, Semillon, Traminac, Tokay i Rizling, a tiol 3-SHA pronađen je u vinu sorti Colombard i Petit Manseng.^{119, 171} Sarrazin i suradnici¹⁷² su u botritiziranom slatkom vinu osim tiola 3-SH masene koncentracije 7033 ng L⁻¹ pronašli manje poznate tirole 3-sulfanilpentan-1-ol i 3-sulfanilheptan-1-ol. Tioli 2-etilsulfanil-acetat i 3-propilsulfanil-acetat, s notama dimljenog mesa, pronađeni su u suhim bijelim vinima sorti Semillon i Sauvignon bijeli.¹⁷³

Visoke masene koncentracije tiola 3-SHA (>500 ng L⁻¹) i 3-SH (>5000 ng L⁻¹) izmjerene su u vinu sorte Sauvignon bijeli intenzivnog tropskog mirisa, a od dvadesetak aromatičnih spojeva imali su najjaču mirisnu aktivnost.⁷⁰ Sortni tioli pronađeni su i u vinu sorti Petite Arvine¹⁷⁴ Verdicchio i Müller Thurgau,^{175, 176} Verdejo¹⁷⁷ i Devine¹⁷⁸. Capone i suradnici¹⁷⁹ odredili su masene koncentracije sortnih tiola u vinu sorti Sauvignon bijeli, Pinot Gris, Chardonnay i Pinot Noir. Najviše masene koncentracije tiola 4-MSP, 3-SH i 3-SHA su nađene u vinu sorte Sauvignon bijeli, dok je vino sorte Chardonnay sadržavalo niske koncentracije tiola. Nekoliko uzoraka vina sorte Pinot Noir sadržavalo je visoku masenu koncentraciju tiola 4-MSP. U uzorcima komercijalnih kalifornijskih vina sorte Rizling, Traminac, Cabernet Sauvignon i Sauvignon bijeli pronađen je tiol 3-SH, a vino sorte Niagara proizvedeno od vrste V.

labruscana sadržavalo je tiol etil-3-sulfanilpropionat.¹⁸⁰ Tiol 4-MSP pronađen je u višim masenim koncentracijama samo u vinu sorte Sauvignon bijeli i jednom uzorku vina sorte Rizling (2,5 ng L⁻¹). Masena koncentracija tiola 3-SHA bila je niska u svim istraženim vinima što je pripisano starosti uzoraka, odnosno hidrolizi estera.¹⁸⁰ Bouchilloux i suradnici¹⁸¹ identificirali su 2-metil-3-sulfanilpropan-1-ol, 3-SH i 3-SHA u vinima sorte Merlot i Cabernet Sauvignon. Masena koncentracija 2-metil-3-sulfanilpropan-1-ola bila je u rasponu od 10 ng L⁻¹ do 10000 ng L⁻¹, tiola 3-SH od 10 ng L⁻¹ do 50000 ng L⁻¹, a tiola 3-SHA od 1 ng L⁻¹ do 200 ng L⁻¹.

Kvantifikaciju sortnih tiola u crnim vinima proveli su Rigou i suradnici,⁹⁹ a masene koncentracije su bile od 4,83 ng L⁻¹ do 54,2 ng L⁻¹ tiola 4-MSP, od 4,62 ng L⁻¹ do 153 ng L⁻¹ tiola 3-SHA i od 678 ng L⁻¹ do 11,5 µg L⁻¹ tiola 3-SH. U vinu sorte Carmenere utvrđen je utjecaj četiri spoja na aromu: 2-furfuriltiola, 3-SHA, 3-SH i 2-metil-3-sulfanilbutan-1-ola.¹⁸² Voćna aroma rosé vina sorte Cabernet Sauvignon i Merlot potječe isključivo od tiola 3-SH, čije su masene koncentracije varirale od 900 ng L⁻¹ do 1600 ng L⁻¹. Murat i suradnici¹⁸³ dokazali su akumulaciju prekursora 3-SH u kožici plodova i utjecaj predfermentacijske maceracije na aromu vina. Ferreira i suradnici¹⁸⁴ analizirali su rosé vino sorte Grenache i pronašli da 3-SH s masenom koncentracijom 4 µg L⁻¹ najviše doprinosi aromi voća i citrusa. U **Tablici 2.8** nalazi se pregled masenih koncentracija sortnih tiola izmjerenih u vinu različitih sorti grožđa. U svim analiziranim vinima masene koncentracije sortnih tiola su gotovo uvijek više od vrijednosti mirisnog praga detekcije.

Tablica 2.8. Zastupljenost sortnih tiola u vinima. Masene koncentracije izražene u ng L⁻¹

Sorta	4-MSP	3-SH	3-SHA	Lit. izvor
Sauvignon bijeli	19	3786	395	70
	13	1532	74	
	24	1184	35	
	8	524	37	
	8	2335	146	
	11	1151	10	
	20	2033	246	
	8,2	7080	516	
	9	1733	65	

Tablica 2.8. (Nastavak)

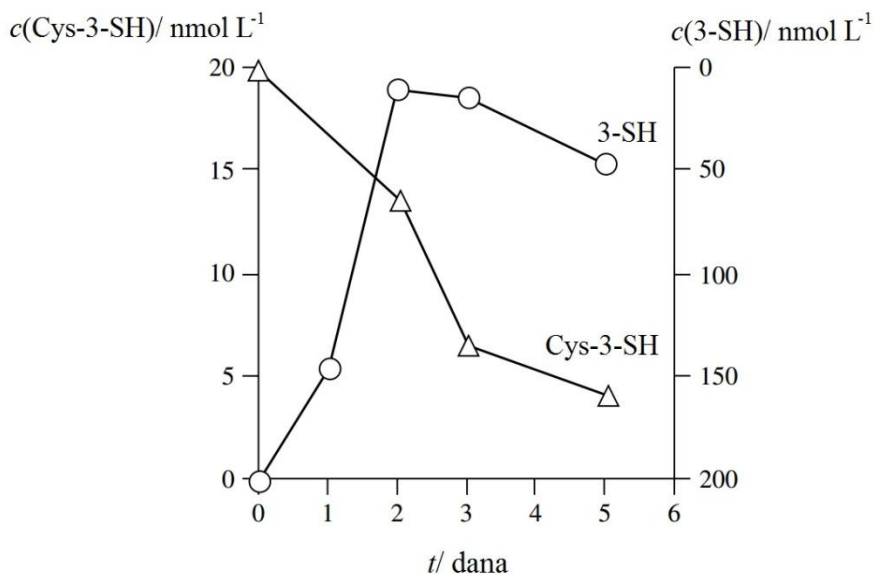
Sorta	4-MSP	3-SH	3-SHA	Lit. izvor	
Sauvignon bijeli	19	5219	99	70	
	5,5	2379	68		
	6,6	1526	38		
	9,7	2050	29		
	5,7	2094	45		
	n.a.	1100	1000	101	
	n.a.	500	450		
	n.a.	1300	1200		
	n.a.	780	800		
	n.a.	550	780		
	n.a.	550	600		
	n.a.	900	400		
	n.a.	1200	580		
	n.a.	1500	600		
	n.a.	850	370		
	n.a.	1300	590		
	n.a.	1600	610		
	n.a.	40	620		
	3	380	20		102
	3	280	60		
	3	290	65		
	6	500	30		
	14	450	80		
	4,5	300	55		
	2,5	380	30		
	5	8402	724	119	
	4	12822	451		
	10	7465	451		
	4	3736	275		
	22	1291	254		
	24	733	212		
	4	3415	777		
	27	446	-	180	
	44	438	-		
	43	712	-		
	50	835	-		
n.a.	623	14	185		
n.a.	1312	218			
n.a.	362	79			
n.a.	303	83			
n.a.	222	114	186		
n.a.	1664	479			
n.a.	392	175			
5	243	112			

Tablica 2.8. (Nastavak)

Sorta	4-MSP	3-SH	3-SHA	Lit. izvor
Sauvignon bijeli	9	312	56	186
	17	311	79	
	17	289	46	
	23	200	57	
	0,6-87,9	25,8-7257	6,7-591	187
Semillon i Sauvignon bijeli	0,6-2,7	3911-5224	7,16-10,8	187
Devine	14	-	40	178
Cayuga White	-	195	-	180
Niagara	18	230	-	
Rizling	2,3	569	-	
Traminac	-	373	-	
Cabernet Sauvignon	-	765	57	
	-	405	60	
	-	498	67	
	-	396	46	
Carmenere	n.a.	617	10	182
	n.a.	422	8	
	n.a.	775	21	
	n.a.	760	22	
Verdejo	-	610	80	188
	70	780	80	
	820	780	80	
	1100	810	80	
Chardonnay	0,13-0,95	168-5077	2,1-204,6	189

n.a.: nije analiziran

Koncentracija sortnih tiola u vinu raste vrlo brzo tijekom fermentacije, u svega nekoliko dana, da bi zatim počela opadati¹³⁵ (Slika 2.13). Stabilnost tiola 3-SH i 3-SHA praćena je u vinu sorte Sauvignon bijeli pohranjenom u tami pri 15 °C u razdoblju od sedam mjeseci. Tiol 3-SHA bio je najmanje stabilan i njegova množinska koncentracija se snižavala od početka mjerenja, dok se množinska koncentracija tiola 3-SH tijekom prva tri mjeseca nije mijenjala, a sljedeća četiri mjeseca je blago rasla.



Slika 2.13. Porast množinske koncentracije sortnog tiola 3-SH i sniženje množinske koncentracije prekursora u moštu sorte Sauvignon bijeli tijekom alkoholne fermentacije¹³⁵

Hidroliza 3-SHA u 3-SH glavni je mehanizam degradacije ovog tiola tijekom početnih mjeseci skladištenja vina.¹⁹⁰ Makhotkina i suradnici⁸¹ su pratili stabilnost tiola u Sauvignonu bijelom skladištenom tijekom jedne godine pri tri različite temperature (5 °C, 10 °C i 18 °C). Među praćenim spojevima brzina razgradnje 3-SHA bila je najveća, a koncentracija u vinu skladištenom pri 18 °C bila je 3,5 puta niža u odnosu na vino skladišteno pri 5 °C. Struktura sortnih tiola utječe na intenzitet njihove degradacije: 4-MSP je terciarni tiol i teže stupa u reakciju s *o*-kinonima pa mu koncentracija opada sporije nego sekundarnom tiolu 3-SH, vjerojatno zbog steričke zaklonjenosti sulfhidrilne skupine.¹⁹¹

2.4. Utjecaj uzgoja vinove loze i proizvodnje vina na prisutnost sortnih tiola u vinu

2.4.1. Uzgoj i predfermentacijske operacije

Koncentracija sortnih tiola u vinu ovisi o zastupljenosti njihovih prekursora u grožđu i moštu, koji nastaju u različitim uvjetima uzgoja kao što su: dostupnost vode,^{109, 192} koncentracija ukupnog dušika u sadnicama,¹⁰⁹ insolacija,^{193, 194} ultraljubičasto zračenje,¹⁹² klonalnost loze¹⁹⁵

i prisutnost biljnih patogena¹⁹² (**Tablica 2.9**). Umjereno navodnjavanje pojačava nastanak cisteiniliranih prekursora,⁴ dok suša ima suprotan učinak na njihovo formiranje.¹⁰⁹ Koncentracija prekursora Cys-3-SH, Gsh-3-SH i CysGly-3-SH u grožđu sorte Sauvignon bijeli raste tijekom dozrijevanja, a počinje opadati kada količina nastalog šećera prijeđe vrijednost 24° po Brixu.⁶⁶ Infekcija grožđa gljivicom *Botrytis cinerea* uzrokuje povišene koncentracije sortnih tiola u vinu. Ovaj biljni patogen ne proizvodi prekursore, već inducira metaboličke procese nastanka, najviše akumulaciju lipooksigenaza. Lipooksigenaze i hidroperoksid-liaze prevode linolensku kiselinu u (*E*)-heks-2-enal i druge reaktivne aldehide koji tvore prekursor Gsh-3-SH.¹⁹⁶

Tehnološke operacije prilikom berbe značajno utječu na koncentracije sortnih tiola u vinu. Strojnim branjem redovito se dobiva vino viših koncentracija sortnih tiola jer oštećenje ploda i sjemenki uzrokuje nastanak aldehida koji sudjeluju u njihovoj biogenezi.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ Prekursori Gsh-3-SH i Cys-3-SH nađeni su u 70 %, odnosno 65 % višim koncentracijama u vinu sorte Sauvignon bijeli proizvedenom od strojno ubranog grožđa.¹⁹⁷ Tiještenjem se oslobađaju prekursori tiola iz grožđa. Tiješteni mošt sorte Sauvignon bijeli sadrži četiri puta višu koncentraciju prekursora Cys-3-SH u odnosu na samotočni.²⁰⁰ Day i suradnici²⁰¹ dokazali su da tiještenje u aerobnim uvjetima dovodi do porasta koncentracije sortnih tiola 3-SH i 4-MSP, u skladu s ranijim opažanjima gdje je uočeno da prisutnost kisika rezultira povišenom koncentracijom prekursora Gsh-3-SH u moštu sorte Sauvignon bijeli. Predfermentacijska maceracija utječe na koncentracije sortnih tiola i njihovih prekursora. Masena koncentracija prekursora Cys-3-SH i Cys-4-MSP u moštu sorte Merlot, Cabernet Sauvignon i Cabernet franc porasla je 30 % odnosno 50 % nakon jednodnevne maceracije.^{134, 200} Masena koncentracija prekursora Cys-3-SH je dvostruko viša u moštu maceriranom pri 20 °C u odnosu na uzorak pripremljen pri 10 °C. Porast temperature maceracije ili kriomaceracija uzrokuju intenzivniju difuziju prekursora tiola iz ploda u mošt.^{116, 199}

Grožđe i mošt podliježu brojnim kemijskim i biokemijskim promjenama tijekom uzgoja, berbe, tiještenja i maceracije. Oksidacija utječe na koncentracije prekursora i slobodnih tiola, a stupanj oksidacije mošta kontrolira se dodatkom kisika ili sumporova dioksida. Iako se prisutnost kisika smatra negativnom, maceracija u oksidacijskim uvjetima dovodi do viših masenih koncentracija Gsh-3-SH u moštu sorti Müller-Thurgau i Sauvignon bijeli, uz

istovremeno sniženje koncentracije glutationa. Porast koncentracije Gsh-3-SH ovisi o stupnju oksigenacije potrebnom za nastanak (*E*)-heks-2-en-1-ala, čija dostupnost ima najveći utjecaj na nastanak ovog prekursora.²⁰² Porast koncentracije prekursora Gsh-4-MSP mogao bi se uočiti kada bi mezitil-oksidi bio prisutan u moštu prije fermentacije. Ovaj spoj nije detektiran u moštu, ali je u vinu pronađen njegov hidrosilirani oblik masene koncentracije 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.²⁰³ Bistrenje bentonitom ili aktivnim ugljenom s ciljem uklanjanja proteina daje vina nižeg sadržaja tiola 3-SH i 3-SHA u odnosu na kontrolu te se ovim postupkom kviri sortni karakter vina sorte Sauvignon bijeli.^{204, 205}

2.4.2. Fermentacija

Duže su vrijeme poznate razlike u aromi vina uzrokovane primjenom različitih sojeva kvasca *Saccharomyces sp.*²⁰⁶⁻²⁰⁸ Učinak različitih sojeva kvasca izražen je samo kod sortnih tiola 4-MSP i 3-SH jer je koncentracija tiola 3-SHA neovisna o aktivnosti β -liaze.¹⁰² Biogeneza sortnih tiola zahtijeva specifične enzime i transportere, koji se pojavljuju kao izotipovi promjenjivih aktivnosti i zastupljenosti. Fermentacija kvascem koji proizvodi veće količine β -liaze daje vino intenzivnije arome, uz 66 % veću konverziju prekursora.^{209, 210} Izmjerena je viša masena koncentracija tiola 3-SH i 3-SHA kada je fermentacija provedena mješavinom kvasaca.²¹¹ Druge vrste gljivica koje proizvode sorte tiola su *Torulaspora delbrueckii*²¹² i *Pichia kluyveri*.^{213, 214} Kofermentacijom kulturama *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* raste koncentracija tiola 3-SH u vinu u odnosu na kontrolu fermentiranu konvencionalnim kvascem.¹⁸⁵

Metabolizam dušika regulira nastanak i otpuštanje sortnih tiola u kvascima.^{215, 216} Dušik je neophodan za biokemijske procese u vinovoj lozi i mikroorganizmima koji provode fermentaciju. Koncentracija prekursora tiola 4-MSP i 3-SH u moštu raste prihranom loze ili sadnjom na tlu bogatijem dušikom.^{109, 217} Katabolička represija dušika jedan je od najvažnijih faktora nastanka sortnih tiola iz prekursora.²¹⁸ Ovim mehanizmom, amonijev ion i drugi preferirani izvori dušika inhibiraju transkripciju gena odgovornih za trošenje zamjenskih izvora dušika, kao npr. prekursora sortnih tiola, koji ostaju nepromijenjeni ili uopće ne nastaju.²¹⁹ Uvjeti fermentacije utječu na nastanak sortnih tiola pa su u vinu fermentiranom pri

višim temperaturama nađene više koncentracije tiola 4-MSP i 3-SH, neovisno o soju korištenog kvasca.^{186, 220}

Tablica 2.9. Utjecaj raznih tehnoloških postupaka i čimbenika na koncentracije sortnih tiola i njihovih prekursora u moštu i vinu^{35, 154}

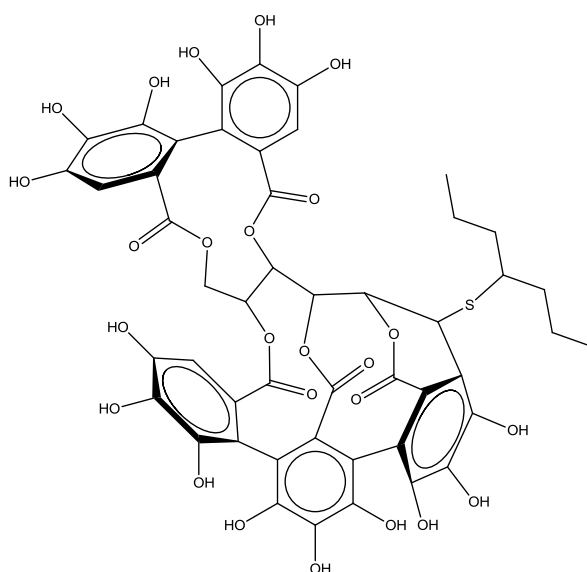
Faktor	Utjecaj na koncentraciju tiola	Spojevi
Dozrijevanje	↑	Prekursori
Deficit vode	↑ Cys-3-SH, ↓ Cys-4-MSP	
Niska dostupnost dušika	↓	
Infekcija gljivicom <i>B. cinerea</i>	↑	
Strojna berba	↑	
Defolijacija	↑ Gsh, ↓ Cys	
Dodatak malih količina SO ₂	↑	
Dodatak velikih količina SO ₂	-	
Dodatak velikih količina SO ₂ prije fermentacije	↓	
Ozračivanje UV zrakama	-	
Izlaganje kisiku	↑	
Predfermentacijska maceracija	↑	
Maceracija pri povišenoj <i>T</i>	↑	
Tiještenje	↑ ili ↓ ovisno o udjelu polifenola	
Fermentacija	↑	Sortni tioli
Izbor soja kvasca	↑	
Fermentacija pri povišenoj <i>T</i>	↑	
Oksidacija	↓	
Dodatak bakra(II)	↓	
Dodatak glutaciona	Očuvanje	
Buteljiranje u prisutnosti kisika	↓	
Prisutnost SO ₂ u bocama	Očuvanje	
Starenje	↓	

2.4.3. Očuvanje sortnih tiola u vinu

Nakon fermentacije i buteljiranja, sastav i aroma vina podložni su promjenama. Oksidacija je središnji problem kemijske stabilnosti vina i može se smanjiti dodatkom nekoliko vrsta antioksidansa. Kisik razgrađuje aromatične spojeve tijekom buteljiranja i starenja vina. Kontakt mošta i vina s kisikom dovodi do oksidacije, posebno *trans*-kaftarne kiseline i drugih fenolnih derivata, u *o*-kinone. Sulfhidrilna skupina glutaciona djeluje kao nukleofil i stupa u reakciju s *o*-kinonima, čime nastaje 2-*S*-glutacionil-kaftarna kiselina, pokazatelj stupnja oksidacije vina.²²¹ Brzina difuzije kisika ovisi o vrsti čepa, jer polimerni čepovi ne sprječavaju difuziju kisika, dok navojni i pluteni čepovi bolje štite vino. Čepovi koji nedovoljno štite vino od oksidacije uzrokuju sniženje koncentracije sortnih tiola u vinu sorte Sauvignon bijeli dvije godine nakon vinifikacije.^{222, 223} Pluteni čepovi mogu adsorbirati tiol 3-SH i 4-MSP što dovodi do neoksidativnog sniženja njihove koncentracije u vinu („*scalping*“).^{222, 224}

Nikolantonaki i suradnici⁷⁴ pratili su sniženje koncentracije tiola 3-SH u prisutnosti kisika i sumporova dioksida reakcijom adicije s dva različita polifenola, (+)-katehina i (-)-epikatehina. Sumporov dioksid spriječio je adiciju oksidiranog (+)-katehina na tiol 3-SH, dok se reakcija s oksidiranim (-)-epikatehinom nesmetano odvijala. Tiol 4-MSP bio je stabilan prema (+)-katehinu, a sniženje koncentracije uočeno je reakcijom s (-)-epikatehinom u prisutnosti kisika.⁷⁴

Vino odležalo u bačvama sadrži elagitanine, hidrolizirajuće tanine koji mogu reagirati s tiolima u blago kiselim uvjetima u prisustvu kisika. Istražen je utjecaj dodatka elagitanina veskalagina i metil-galata, koji sadrže pirogalolnu skupinu, na koncentracije tiola 3-SH i 2-MFT u modelnom vinu.^{225, 226} Nakon oksidacije polihidroksifenilna skupina je podložna dehidrogeniranju u *o*-kinon pa nastaju adukti sa sortnim tiolima i njihova koncentracija se snižava. Sekundarni tiol 3-SH reagirao je brže s elagitaninima zbog veće nukleofilnosti, a reakcije se odvijaju u prisutnosti željeza(III). Strukture adukta veskalagina s tiolima (**Slika 2.14**) potvrđene su tehnikom NMR i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz tandemnu spektrometriju masa (**engl. High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS**).^{225, 226}



Slika 2.14. Struktura adukta nastalog reakcijom sortnog tiola 3-SH i galotanina veskalagina²²⁶

Najvažniji aditiv korišten za sprječavanje degradacijskog djelovanja kisika u vinu je sumporov dioksid odnosno hidrogensulfid. Njegovo zaštitno djelovanje temelji se na inhibiciji polifenol-oksidade u moštu, redukciji *o*-kinona u *o*-dihidroksifenole, izravnoj reakciji s *o*-kinonima, aldehydima i drugim elektrofilima u matrici i redukciji vodikova peroksida u vodu.²²⁷ Adukti kinona s tiolom 3-SH nastaju i u prisutnosti sumporova dioksida, ali u manjoj mjeri.²²⁸ Zbog utjecaja na aromu vina i štetnosti za zdravlje, sumporov dioksid se upotrebljava u kombinaciji s askorbinskom kiselinom i glutationom kako bi se poboljšalo zaštitno djelovanje i snizila njegova koncentracija.^{75, 77} Askorbinska kiselina prirodan je antioksidans koji se dodaje vinu prije buteljiranja radi uklanjanja kisika, a djeluje i kao supstrat za oksidaciju umjesto polifenola i reducira kinone. Dodaje se zajedno sa sumporovim dioksidom koji reducira nastali vodikov peroksid i dehidroaskorbinsku kiselinu.²²⁹ Reakcije askorbinske kiseline teško je kontrolirati, a produkti degradacije uzrokuju pojavu obojenih ksantilnih kationa koji negativno utječu na boju vina.^{75, 230}

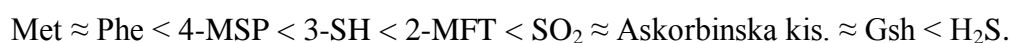
Optimalna doza od 120 mg kg⁻¹ sumporova dioksida dodana u tiješteni mošt očuvala je tirole 3-SH i 3-SHA, dok je prevođenje 3-SH u 3-SHA acetiliranjem usporeno dodatkom 300 mg kg⁻¹ sumporova dioksida.²³¹ Sumporov dioksid kompetitivno sprječava razgradnju sortnih tiola interakcijom s kinonskom skupinom polifenola.³⁹ Sumporenje sprječava i oksidaciju glutationa, pa veća količina ostaje dostupna za nastanak prekursora Gsh-3-SH i Gsh-4-

MSP.^{126, 197, 232} Očekivan je pojačan nastanak prekursora u prisutnosti sumporova dioksida, ali pri previsokim koncentracijama nastaje manje prekursora Cys-3-SH jer se iz masnih kiselina ne formira (*E*)-heks-2-enal te su inhibirani enzimi koji razgrađuju prekursor Gsh-3-SH.¹⁹⁷ U vinu koje je sumporeno dozom od 500 mg L⁻¹ masena koncentracija tiola i njihovih prekursora je niža nego pri tretmanu nižom dozom sumporova dioksida.⁶⁶

Glutation, prirodno prisutan u moštu, stupa u reakcije nukleofilne adicije, kompetitivno veže oksidirane polifenole i štiti aromatične spojeve od degradacije. Glutationski i cisteinski prekursori tiola imaju tioeterske veze ugljik-sumpor zbog kojih su postojani i otporni na oksidaciju.²³³ Lavigne i Dubourdieu²³⁴ pronašli su da dodatak 6 mg L⁻¹ glutaciona usporava degradaciju sortnih tiola. Dodatak 20 mg L⁻¹ glutaciona u vino sorte Sauvignon bijeli prije punjenja štiti tiol 3-SH u uzorcima šest mjeseci nakon punjenja u usporedbi s netretiranim vinom.²²³

Kreitman i suradnici⁴⁰ istražili su utjecaj kelatora željeza(II), dipiridina i ferozina, odnosno željeza(III), etilendiamintetraoctene kiseline i fitinske kiseline, na oksidaciju tiola u vinu. Kelatori željeza(II) imali su bolju početnu zaštitu tiola 3-SH, dok je učinak kelatora željeza(III) bio izraženiji nakon osam dana izlaganja vina kisiku. Selektivno keliranje inhibira procese katalizirane željezom pa se tako izbjegava degradacija sortnih tiola. Uklanjanjem željezovih kationa spriječen je nastanak *o*-kinona i 1-hidroksietilnog radikala. Nedostatak ovog pristupa je toksičnost kelatora, koji se ne smiju dodavati u vino, pa bi trebalo istražiti učinak sigurnijih i manje štetnih spojeva koji selektivno vežu željezove ione.

Istraživanjem kinetike reakcije kinona 4-metilkatehola s tiolima nađeno je da sumporov dioksid, glutation i askorbinska kiselina s kinonom reagiraju otprilike šest puta brže od tiola 3-SH.²³⁵ Antioksidansi se redovno dodaju u vino u masenim koncentracijama od nekoliko mg L⁻¹, dok je masena koncentracija sortnih tiola u vinu do nekoliko µg L⁻¹. Antioksidansi bi trebali dobro štititi sorte tiola od degradacije zbog brže kinetike reakcije s kinonima i velikih relativnih koncentracija.²³⁵ Nikolantnonaki i suradnici²²⁸ ustanovili su odnos nukleofilnosti spojeva u modelnom vinu mjerenjem konstante brzine reakcija s modelnim kinonom 4-metil-1,2-benzokinonom:



Nukleofili u vinu dijele se u tri kategorije: prvu čine aminokiseline metionin i fenilalanin (Phe), čija je brzina reakcije s kinonima zanemariva. Drugu kategoriju čine tioli, čija konstanta brzine reakcije raste s padom steričke zaklonjenosti sulfhidrilne skupine. Tercijarni tiol 4-MSP ima najmanju konstantu brzine reakcije, nižu od sekundarnog (3-SH) i primarnog tiola (2-MFT). Konstanta brzine reakcija veća je u trećoj skupini nukleofila, antioksidansima sumporovom dioksidu, glutationu i askorbinskoj kiselini, a najveća kod najreaktivnijeg nukleofila, sumporovodika.²²⁸

2.5. Priprava uzoraka vina za kromatografsku analizu

2.5.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Iako se plinskom kromatografijom postiže vrlo učinkovito razdvajanje analita, potrebno je provesti pripravu uzorka jer ishod analize u većoj mjeri ovisi o pripravi i obradi nego o kromatografskoj separaciji. Ekstrakcija na čvrstoj fazi jedna je od najčešće korištenih tehnika priprave uzorka zbog jednostavne provedbe, niske cijene i dobrog analitičkog povrata. Temelji se na adsorpciji analita na nepokretnoj fazi, koja je čvrsti sorbens.²³⁶ Ekstrakcija na čvrstoj fazi provodi se u nekoliko koraka koji uključuju aktivaciju ili kondicioniranje sorbensa, nanošenje uzorka na sorbens, ispiranje i sušenje sorbensa te eluiranje analita.²³⁷ Ukoncentriravanje eluata provodi se uparavanjem do suha ili malog volumena. Eluat se može neposredno injektirati u kromatograf ili upariti u struji dušika pa razrijediti u prikladnom otapalu.

Analitički povrat se može poboljšati promjenom sorbensa, čime se mijenja selektivnost. Kod složenih uzoraka može se povećati aktivna površina sorbensa korištenjem sorbensa većeg kapaciteta ili nanošenjem manjeg volumena uzorka. Prvi sorbensi temeljeni su na oktadecilsilicijevom dioksidu i nemaju dobru sposobnost ekstrakcije iz smjese voda-etanol kakva je vinska matrica. Bolji rezultati ostvareni su primjenom polistiren-divinilbenzen kopolimera velike poroznosti.^{238, 239} Sorbens Lichrolut-EN često se koristi za separaciju sortnih tiola.²⁴⁰⁻²⁴⁴

Aromatični spojevi vina obično se eluiraju polarnijim otapalom, najčešće diklormetanom. Eluiranjem sortnih tiola polarnim otapalom eluat se kontaminira esterima masnih kiselina koji interferiraju prilikom kromatografske separacije. Prilikom ekstrakcije sortnih tiola iz vina, smjesa pentana i diklormetana ($\psi=1:1$) ili etil-acetat predstavljaju najbolji kompromis između učinkovitosti ekstrakcije i eluiranja interferencija.^{245, 246}

2.5.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi je tehnika pripreme uzorka bez primjene otapala koja obuhvaća uzorkovanje, ekstrakciju, ukoncentriravanje i unošenje ekstrakta u instrument u jednom slijedu, uz mogućnost automatizacije. Za razliku od tehnike SPE u kojoj se analiti privremeno adsorbiraju na nepokretnu fazu, SPME je ravnotežna tehnika u kojoj se analiti razdjeljuju između uzorka i sorbensa.²⁴⁷ Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi može se primijeniti za tekuće i čvrste uzorke, ali je ograničena na relativno hlapljive analite, osim kada je hlapljivost poboljšana derivatizacijom.²⁴⁸ Dva su načina izvođenja tehnike SPME, izravnim uranjanjem vlakna u uzorak ili izlaganjem vlakna parama iznad otopine.²⁴⁹ Tehnika HS-SPME provodi se uranjanjem štrcaljke u bočicu i potiskivanjem vlakna iz nosača. Nakon uspostavljanja ravnoteže, vlakno se uvlači u štrcaljku i uklanja iz bočice. Vlakno se zatim potisne u injektor, a analiti se toplinski desorbiraju.²⁵⁰

Ključni parametri prilikom optimiranja ekstrakcije su vrsta sorbensa, debljina sorbensa, uvjeti ekstrakcije te parametri injektiranja i desorpcije. Sorbensi rabljeni u tehnici SPME su polidimetilsiloksan (PDMS), kopolimer PDMS-divinilbenzen (PDMS/DVB), poliakrilat (PA), kopolimer Carboxen-PDMS (CAR/PDMS), kopolimer Carbowax-DVB (CW/DVB) i kopolimer DVB/CAR/PDMS. Odabir vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije. Polarna vlakna koriste se za adsorpciju polarnih analita, a nepolarna za nepolarne analite. Nekoliko vrsta sorbensa omogućava zadovoljavajuću selektivnost pri ekstrakciji aromatičnih spojeva iz vina. Kada je potrebno analizirati veći broj analita različitih svojstava, najbolji kompromis detekcije i kvantifikacije predstavlja nespecifični trokomponentni sorbens DVB/CAR/PDMS.

Vlakna CAR/PDMS pokazuju veći afinitet za hlapljivije tirole manje mase.^{251, 252} Odziv plinskrokromatografskog detektora za sumporovodik, metantioi, dimetil-sulfid i dimetil-

disulfid bio je 3-10 puta veći primjenom vlakna CAR/PDMS u usporedbi s vlaknom DVB/CAR/PDMS, ali je u slučaju sumporovodika i dimetil-sulfida nelinearan.²⁵³ Porozne čestice karboksena prisutne su u većem udjelu u sorbensu CAR/PDMS i imaju veću sposobnost zadržavanja lakših tiola. Trokomponentna vlakna DVB/CAR/PDMS slabije ekstrahiraju manje tirole, dok su daleko prikladnija u analizi težih tiola koji eluiraju kasnije.^{254,255} Provedena je analiza hlapljivih spojeva sumpora u soku grejpa korištenjem tehnike SPME.²⁵⁶ Primjenom trokomponentnih vlakana DVB/CAR/PDMS pronađen je ključni analit 1-*p*-menten-8-tiol, kojeg nije bilo moguće ekstrahirati vlaknom CAR/PDMS. Vlakna PDMS/DVB relativno neučinkovito ekstrahiraju tirole, ali su prilikom derivatizacije sortnih tiola *N*-fenilmaleimidom na vlaknu najbolji rezultati ekstrakcije ostvareni upravo primjenom ovog sorbensa.²⁵⁷ Herszage i suradnici²⁵⁸ istražili su tri vrste sorbensa (CAR/PDMS, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS) za mikroekstrakciju hlapljivih tiola iz para iznad otopine. Primjenom vlakna koja su sadržavala karboksen ili divinilbenzen postignuta je veća osjetljivost, dok je primjenom trokomponentnog vlakna DVB/CAR/PDMS postignuta najbolja ponovljivost analize (RSD=9 %). Uz primjenu drugih dvaju vlakana ponovljivost rezultata analize bila je lošija (RSD >15 %) u istraženom rasponu masenih koncentracija.

Jedan od glavnih nedostataka tehnike SPME je ograničen broj sorbensa od kojih su izrađena vlakna, a koji samo djelomično pokrivaju analite s aspekta polarnosti. Pojavljuju se teškoće pri ekstrakciji polarnih analita iz polarne matrice.^{253, 259} Drugi nedostaci su krhkost vlakna i bubrenje u otapalima, degradacija sorbensa i ograničen broj ciklusa ekstrakcije na pojedinom vlaknu. Uočena je loša učinkovitost ekstrakcije u slučaju vrlo hlapljivih, polarnih ili toplinski nestabilnih analita.^{259, 260} Analiza vina tehnikom SPME problematična je zbog visoke koncentracije etanola, viših alkohola i estera masnih kiselina u parama iznad otopine. Prisutnost ovih spojeva premašuje ekstrakcijski kapacitet sorbensa koji postaje zasićen, a kalibracija je otežana.²⁶¹ Problem se može riješiti upotrebom optimalnog unutarnjeg standarda i razrjeđenjem uzorka tako da udio etanola bude niži od 2 %, ali bi se pritom koncentracija spojeva sadržanih u tragovima mogla sniziti ispod njihove granice detekcije.²⁶² Jedan od nedostataka tehnike SPME je pojava nelinearnog odnosa količine ekstrahiranog analita i njegove koncentracije u uzorku.²⁶³ Prilikom analize sumporovih spojeva na sorbensu CAR/PDMS spojevi veće molekulske mase mogu kompeticijom za aktivna mjesta na sorbensu spriječiti adsorpciju analita koji imaju manju molekulsku masu, što uzrokuje

sniženje osjetljivosti.²⁶⁴ Kod sorbena PDMS, ravnoteža se za spojeve veće mase uspostavlja sporije nego za spojeve manje mase, pa izostaje ekstrakcija analita veće molekulske mase.²⁶⁵

Najučinkovitiji sorbensi za ekstrakciju lakohlapljivih analita su mikroporozne strukture, zbog veće aktivne površine dostupne za adsorpciju. Takvi materijali zahtijevaju visoku temperaturu desorpcije kako bi se analiti u instrument prenijeli kvantitativno. Prilikom toplinske desorpcije zbog oksidacije i dehidrogenacije tiola nastaju artefakti, a procese kataliziraju željezo i nikal prisutni u vlaknima i igli nosača.^{266, 267} Analit 2-metilpropantiol analiziran plinskom kromatografijom uz detekciju atomskim emisijskim detektorom (**engl.** *Atomic Emission Detector*, AED) podliježe površinski kataliziranom razlaganju uz otpuštanje sumporovodika tijekom desorpcije.²⁶⁸ Degradacija analita može se smanjiti deaktivacijom injektora i kolone sililiranjem, odnosno injektiranjem bis(trimetilsilil)-trifluoracetamida prije analize.^{269, 270} Relativna vlažnost u parama iznad otopine predstavlja problem prilikom ekstrakcije tiola tehnikom SPME jer vodena para snižava kapacitet adsorbensa te izaziva smetnje kromatografske osnovne linije i promjenu vremena zadržavanja analita. Voda se pojačano adsorbira na vlakna pri temperaturi iznad 40 °C pa se vrijeme ekstrakcije mora skratiti i ekstrakcija provesti pri nižim temperaturama.²⁶⁹

2.5.3. Sorpcijska ekstrakcija miješalom

Glavni nedostatak tehnike SPME je mali aktivni volumen i mali kapacitet polimernog sorbensa. Sorpcijska ekstrakcija miješalom, (**engl.** *Stir-Bar Sorptive Extraction*, SBSE) poput tehnike SPME, koristi za ekstrakciju analita polimerni sorbens koji je nanesen na konvencionalno magnetsko miješalo. Masa sorbensa znatno je veća, stoga je i ekstrakcijski kapacitet veći u usporedbi s tehnikom SPME.^{260, 271} Nakon postizanja ravnoteže, magnet za miješanje se ukloni iz uzorka, unese u modificirani dio injektora za toplinsku desorpciju te se analiti kriofokusiraju pred ulazom u kolonu. Nedostatak tehnike je potreba za modificiranim injektorom kromatografa. Hidrofobni analiti mogu biti ekstrahirani uz visoku djelotvornost, dok je djelotvornost ekstrakcije polarnih odnosno hidrofilnih analita niska. Polarni analiti koji formiraju vodikove veze pokazuju loš afinitet za sorbens PDMS, posebno ako sadrže veći broj polarnih skupina ili heteroatome. Analitički povrat polarnih analita primjenom tehnike SBSE

može se poboljšati povećanjem ionske jakosti uzorka dodavanjem soli ili derivatizacijom *in situ* u matrici uzorka.²⁷¹ Tehnika SBSE korištena je za analizu aromatičnih spojeva u moštu i vinu. U radu iz 2015. godine, Ochiai i suradnici²⁷² primijenili su mikrovalovima pomognutu sorpcijsku ekstrakciju miješalom uz derivatizaciju za kvantitativno određivanje sortnih tiola u pivu.

2.5.4. Derivatizacijske metode

Plinskom kromatografijom postiže se vrlo visoka razlučivost, a vezanje s brojnim detektorima ovu tehniku čini idealnom za analizu različitih spojeva. Istraživani analiti moraju imati dovoljno visok tlak para radi prijelaza u plinovitu fazu. Tlak para se snižava s porastom molekulske mase i polarnosti i tada nije moguće prevesti analit u plinovitu fazu bez raspada. Niska hlapljivost uzrokovana jakim intermolekularnim interakcijama kao što su vodikove veze, posebice kod spojeva s polariziranom vezom heteroatom-vodik: alkohola, tiola, amina i karboksilnih kiselina, može se poboljšati derivatizacijom. Derivatizacija značajno povećava hlapljivost i prikladnost spojeva za analizu plinskom ili tekućinskom kromatografijom i detekciju odgovarajućim detektorima.^{270, 273, 274} Derivatizacijom polarni analiti eluiraju pri nižim temperaturama bez razlaganja te se povećava postojanost nestabilnih analita.²⁷⁵ Mogu se poboljšati separacijska svojstva i simetričnost signala jer se interakcije s aktivnim površinama i adsorpcija analita na kolonama smanjuju. U slučaju koeluiranja analita, njihovi derivati mogu se razdvojiti zbog promjene vremena zadržavanja. Derivatizacijom može nastati spoj prikladan za detekciju selektivnim detektorima. Maseni spektri derivata mogu imati specifičan uzorak fragmenata koristan u identifikaciji analita.²⁷⁶

Reakcije derivatizacije provode se u otopinama ili na sorbensu za ekstrakciju tehnikom SPE ili SPME, a poznata je i tehnika *flash* derivatizacije zajedničkim dodavanjem uzorka i reagensa u injektor kromatografa. I u tom se slučaju reakcije odvijaju u tekućoj fazi, prije isparavanja uzorka.²⁷⁷ Najčešće korištene reakcije derivatizacija su sililiranje, alkiliranje, aciliranje, tvorba oksima ili hidrazona te u manjoj mjeri ciklizacija. Derivatizacijom pomoću prikladnih reagensa (*N*-metil-bis(trifluoracetamid), trimetilsilil-jodid, bis(trimetilsilil)-

trifluoracetamid) u nevodenim matricama tioli se prevode u trimetilsililne derivate uz detekciju selektivnim detektorima: termionskim ionizacijskim detektorom selektivnim za spojeve sumpora ili AED-om. U vinu derivatizacije sililnim reagensima nisu izvedive, iako postoje pokušaji sililiranja u koncentriranim vodenim otopinama.^{278, 279} Prekursori sortnih tiola se mogu prevesti u sililne derivate nakon ekstrakcije i ukoncentriravanja organskog ekstrakta.²⁷⁷ Poznati su brojni reagensi za derivatizaciju tiola,²⁸⁰ a sortni tioli se najčešće prevode u derivate alkiliranjem i metoksimiranjem.

2.6. Kvalitativna i kvantitativna analiza sortnih tiola u vinu

Analiza hlapljivih tiola zahtjevna je zbog složenosti matrice, kemijskih svojstava tiola i njihovih niskih koncentracija u uzorku. Prehrambeni proizvodi koji sadrže hlapljive tiolne: vino, pivo, sirevi, kava, meso, voće i povrće sadrže druge hlapljive i nehlapljive sastojke.⁵³ Složenost i raznolikost matrica predstavlja velik izazov u razvoju učinkovitih analitičkih metoda.²⁸¹ Hlapljivi tioli velike aktivnosti mirisa strukturno su raznoliki, njihove su koncentracije vrlo niske, a sadrže sulfhidrilnu skupinu (-SH), jednu od najreaktivnijih funkcionalnih skupina.²⁸² Tioli su podložni oksidaciji, izomerizaciji i pregradnjama.²⁸³ U analizi nederivatiziranih tiola, reaktivna sulfhidrilna skupina utječe na učinkovitost kromatografske separacije zbog asimetričnosti (povlačenja) signala u plinskom kromatogramu.²⁸⁴ Izuzev nestabilnosti, ovi analiti sadrže dodatne funkcionalne skupine, najčešće karboksilnu, alkoholnu, aldehidnu, estersku ili etersku koje se moraju uzeti u obzir prilikom razvoja metode kako bi se smanjila njihova promjena i utjecaj na separaciju.^{53, 285} Kiralni tioli posjeduju identična fizikalna i kemijska svojstva, ali različita biološka, u ovom slučaju aromatična svojstva i mirisni prag detekcije.⁴ Razdvajanje enantiomera analizu čini još zahtjevnijom. Tioli su u većini uzoraka sadržani u tragovima, masenih koncentracija nekoliko ng L⁻¹ pa je potrebno selektivno ekstrahirati i ukoncentrirati analite prije kromatografske analize i koristiti osjetljive detektore. Razrađene su brojne strategije pripreve uzorka: ekstrakcija tekuće-tekuće organskim otapalima, ekstrakcija na čvrstoj fazi, selektivna ekstrakcija na čvrstoj fazi, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi i postupci derivatizacije s različitim reagensima. Idealna analitička metoda za kvantifikaciju tiola mora biti brza, jednostavna, osjetljiva, pouzdana, robusna, okolišno i cjenovno prihvatljiva. Metode detekcije

novih tiola najčešće daju dovoljno informacija potrebnih za identifikaciju. Kako su mirisni pragovi detekcije u rasponu od nekoliko ng L^{-1} , kvantifikacijske metode moraju imati vrijednost granice određivanja nižu od mirisnog praga detekcije. Matrica vina utječe na razdjeljenje analita između uzorka i sorbensa pa je potrebno koristiti unutarnji standard.

Zbog reaktivnosti sortnih tiola, polarnosti, viših vrelišta i vrlo niske zastupljenosti u uzorku, teško je učinkovito selektivno ekstrahirati ove analite rutinskim tehnikama ekstrakcije.²⁸⁶ Metode ekstrakcije tiola gotovo uvijek kombiniraju složenije korake specifične ekstrakcije, derivatizacije, pročišćavanja uzorka i ukoncentriravanja. Najranije metode kojima su sortni tioli u vinu analizirani plinskom kromatografijom uključivale su selektivnu ekstrakciju tekuće-tekuće u prisutnosti žive(I) ili ekstrakciju tehnikom dinamičke analize para iznad otopine, uz detekciju plamenim fotometrom ili spektrometrom masa.²⁸⁷ Iz primjera koji slijede vidljivo je da se analiza sortnih tiola usavršila od konvencionalnih, dugotrajnih metoda do bržih, poluautomatskih i jednostavnijih. Metode ekstrakcije sortnih tiola iz vina dijele se u tri skupine:

- neselektivna, neposredna ekstrakcija primjenom: mikroekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine, ekstrakcije na čvrstoj fazi, ekstrakcije tekuće-tekuće (**engl.** *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) ili dinamičke analize para iznad otopine (**engl.** *purge-and-trap*, PT). U ovim metodama tioli nisu derivatizirani ni kemijski modificirani;
- selektivna ekstrakcija ionima metala, isključivo živom(I) i srebrom(I);
- derivatizacija selektivnim reagensima prije, istovremeno ili nakon ekstrakcije tehnikama LLE, HS-SPME, SPE i SBSE.

2.6.1. Neselektivna ekstrakcija sortnih tiola

Metode neselektivne ekstrakcije sortnih tiola bez derivatizacije slične su metodama koje se koriste u analizi arome prehrambenih namirnica, no imaju brojne nedostatke. Konvencionalne tehnike kao ekstrakcija tekuće-tekuće, statička analiza para iznad otopine i dinamička analiza

para iznad otopine nisu prikladne za analizu sortnih tiola u vinu.²⁶⁴ Nedostaci neselektivne ekstrakcije su slaba ponovljivost zbog gubitka analita, veliki utrošak otapala i veliki volumen uzorka. Granica detekcije kod statičke analize para iznad otopine redovno je deset do sto puta lošija od granice detekcije koja se postiže primjenom dinamičke analize para iznad otopine.⁶ Dinamičkom analizom para iznad otopine izbjegava se korištenje otapala i utjecaj matrice je mnogo manji, ali je granica detekcije gotovo uvijek iznad mirisnog praga detekcije, a nastanak toplinskih artefakata je pojačan.^{175, 287, 288, 289}

Usporedbom tehnika HS-SPME, SPE i PT uz detekciju tehnikom GC-MS pokazalo se da je tehnika PT osjetljivija od tehnike HS-SPME u slučaju tiola 3-SHA ($GD=0,036 \mu\text{g L}^{-1}$ odnosno $0,057 \mu\text{g L}^{-1}$) i 3-SH ($GD=0,048 \mu\text{g L}^{-1}$ odnosno $0,069 \mu\text{g L}^{-1}$). Granica detekcije nakon ekstrakcije tehnikom SPE bila je slična kao kod tehnike HS-SPME.²⁹⁰

Noviji pristup ekstrakciji sortnih tiola iz vina bez derivatizacije uključivao je mikroekstrakciju raspršenjem tekuće faze (**engl.** *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME). Ova tehnika minijaturizirani je oblik tehnike LLE i primijenjuje mikrolitarske količine ekstrakcijskih otapala. Temelji se na trokomponentnom sustavu otapala u kojem su ekstrakcijsko i disperzijsko otapalo štrcaljkom dodani u vodeni uzorak pa nastaje emulzija. Nakon centrifugiranja ekstrakt se uzima štrcaljkom i injektira u kromatografski sustav. Prednosti tehnike DLLME su jednostavno izvođenje, kratkotrajnost, robusnost i mali troškovi. Analiti su određeni tehnikom GC-MS, ali uz veliku standardnu devijaciju rezultata analize tiola 3-SH (oko 15 %).²⁹¹

Neselektivna ekstrakcija na čvrstoj fazi bez derivatizacije, uglavnom na sorbensima Lichrolut EN i ENV+ uz eluiranje diklormetanom, vrlo se rijetko primijenjuje zbog loše ponovljivosti i izraženog šuma osnovne linije kromatograma te se koristi samo u kvalitativne svrhe.^{184, 292} Postignute granice detekcije više su u usporedbi s granicama detekcije postignutima primjenom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi, dok su relativne standardne devijacije niže. Matrica uzorka značajno utječe na analitički povrat u tehnici HS-SPME pa je nužna primjena unutarnjeg standarda.¹⁷⁶

Gamero i suradnici²⁹³ usporedili su nekoliko tehnika ekstrakcije aromatičnih spojeva u vinu. Istražene su tehnike statičke analize para iznad otopine (**engl.** *Headspace Analysis*, HS), dinamičke ekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine (**engl.** *Headspace Solid-Phase Dynamic Microextraction*, HS-SPDE), HS-SPME-om, mikroekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine izravnim uranjanjem sorbensa u uzorak (**engl.** *Direct Immersion Solid-Phase Microextraction*, DI-SPME), SBSE-om i ekstrakcije na monolitnom sorbensu (**engl.** *Monolithic Material Sorptive Extraction*, MMSE). Najveća osjetljivost u analizi tiola postignuta je tehnikom DI-SPME, a nakon njih tehnikama SBSE i MMSE. Analizom tehnikom HS-SPME postignut je najbolji omjer kromatografskog signala i šuma osnovne linije (**engl.** *Signal-to-Noise Ratio*, *S/N*) uz najmanje interferencija u kromatogramu. Analizom tehnikama HS i HS-SPDE postignuta je najlošija osjetljivost pa su ove tehnike korisne samo za analizu zastupljenijih aromatičnih spojeva. Sortni tiol 3-SHA moguće je odrediti svim tehnikama osim tehnikom HS, dok tiol 4-MSP nije određen nijednom tehnikom.

Primjena tehnike HS-SPME za detekciju tiola u vinu prvi puta je predložena u radovima Mestres i suradnika.^{251, 294} Analiti su većinom bili lakohlapljivi tioli molekulske mase manje od 100 g mol^{-1} , a mikroekstrakcija je provedena na PDMS ili PA sorbensu. Detekcija analita je provedena tehnikom GC-FPD. Istražena su i vlakna CAR/PDMS kojima je postignut bolji analitički povrat, ali je ponovljivost bila lošija. Howell i suradnici^{220, 295} primijenili su za analizu sortnih tiola veće molekulske mase sorbens DVB/CAR/PDMS. Metoda nije uključivala derivatizaciju analita. Analitički povrat i ponovljivost metode bili su prihvatljivi, ali je detektiran samo tiol 4-MSP, a granice detekcije analita bile su previsoke, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ i 10 mg L^{-1} .

Fedrizzi i suradnici¹⁷⁶ odredili su tirole 3-SH i 3-SHA u vinu mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi iz para iznad otopine na sorbensu CAR/PDMS/DVB bez derivatizacije analita. Uočeno je da se porastom temperature ekstrakcije povećava signal tiola 3-SH, ali se signal tiola 3-SHA smanjuje, vjerojatno zbog hidrolize u matrici ili desorpcije s vlakna. Kromatografska separacija tiola provedena je spajanjem dviju kapilarnih kolona različitih polarosti, dulje kolone Innowax ($30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$) i kraće kolone HP-1 ($10 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25$

µm). Razlučivanje postignuto na polarnijim kolonama korištenim u ranijim istraživanjima bilo je nedovoljno, a ovakvim spajanjem dviju kolona ostvareni su bolji rezultati.

Mattivi i suradnici²⁹⁶ proveli su analizu sortnih tiola 3-SH i 3-SHA u vinu sorte Lugana koje je fermentirano u oksidacijskim i redukcijskim uvjetima. Tioli su analizirani bez derivatizacije mikroekstrakcijom na sorbensu CAR/PDMS/DVB uz 6-sulfanilheksan-1-ol (6-SH) kao unutarnji standard i detekciju tehnikom GC-MS/MS uz tehniku MRM. Granica detekcije i određivanja bila je iznad mirisnog praga detekcije (126 ng L⁻¹ i 23 ng L⁻¹).

Wang i suradnici²⁹⁷ odredili su utjecaj gljivice *Botrytis cinerea* na koncentracije tiola u vinu sorte Chardonnay. Nederivatizirani tioli i ostali aromatični spojevi ekstrahirani su iz vina tehnikom HS-SPME na sorbensu DVB/CAR/PDMS. Iako su rezultati analize estera i viših alkohola bili dobri, od tiola je kvantificiran samo 3-SH uz veliku mjernu nesigurnost i devijaciju, iznad 20 %.

2.6.2. Selektivna ekstrakcija sortnih tiola

Metode selektivne ekstrakcije sortnih tiola temelje se na afinitetu između tiola i metalnih iona, u prvom redu žive i srebra. Organoživinim spojevi koriste se za specifičnu ekstrakciju tiola reverznim kompleksiranjem i zadržavanjem kompleksa na nepokretnoj fazi.^{167, 298, 299} Slobodni tiol se zatim eluira dodatkom suviška drugog tiola, npr. glutationa, cisteina ili D,L-ditiotreitola.¹⁶⁷ Među organoživinim spojevima koriste se *p*-hidroksiživin benzoat (**engl.** *p*-hydroxymercuribenzoate, *p*-HMB),^{167, 298, 299} fenilživin klorid¹⁶⁹ i 4-aminofenilživin acetat.²⁹⁸ Reakcije nastanka kompleksa tiola s ovim spojevima vrlo su učinkovite, a reagensi ne tvore komplekse s tioesterima, sulfidima i disulfidima.¹⁶⁷

Metoda kojom je u vinu po prvi puta nađen sortni tiol 4-MSP uključivala je zalučivanje uzorka velikog volumena (1000 mL) i ekstrakciju tekuće-tekuće nakon koje je slijedilo kompleksiranje *p*-hidroksiživinim benzoatom u vodenoj fazi.^{118, 167, 170} Ovaj reagens ranije je korišten u analizi lakohlapljivih fermentativnih tiola.³⁰⁰ Kvantifikacijske metode zahtijevaju

čišće ekstrakte tiola pa su u novijim metodama uzorci pročišćeni primjenom jakih anionskih izmjenjivača prije eluiranja tiola otopinom cisteina.¹⁷⁰ Ista je metoda uz modifikacije korištena za analizu piva i sireva.^{301, 302} Ove metode zahtijevaju opetovano zalučivanje vina tijekom izvedbe,¹⁷⁰ a visoka pH-vrijednost može uzrokovati oksidaciju tiola, degradaciju analita 3-SHA u analit 3-SH ili nastanak kinona koji reagiraju s tiolima. Kompleksiranje organoživinim spojevima modificirano je primjenom pufera kako bi se izbjegao nagli porast pH-vrijednosti.²⁹⁹ Ove su metode zahtjevne zbog korekcije pH-vrijednosti i dugotrajnog pročišćavanja.

Razvijena je metoda ekstrakcije tekuće-tekuće bez derivatizacije analita uz primjenu afinitetne kromatografije na nepokretnoj fazi Affi-Gel 501, pripremljenoj umrežavanjem agaroze uz dodatak 4-aminofenilživinog acetata ili fenilživinog klorida kako bi se pojednostavila ekstrakcija analita.^{110, 125, 143, 169} Afinitetna kromatografija skraćuje trajanje analize, ali je analitički povrat tiola 4-MSP svega 38 %. Osim toga, nepokretna faza pripremlja se neposredno prije analize, a potrebno je provesti ekstrakciju tekuće-tekuće i ukoncentriravanje iz eluata velikog volumena. Ova je metoda korisnija u identifikaciji nepoznatih tiola u voću i voćnim sokovima.²⁹⁸

Nedavno je objavljena metoda koja se temelji na afinitetu tiola prema kationima srebra(I). Sortni tioli ekstrahirani su iz uzoraka piva i hmelja na modificiranom sorbensu za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Meta-Sep IC-Ag) te eluirani otopinom tioglicerola u diklormetanu.³⁰³ Toksičnost kompleksiranja srebrom je zanemariva u odnosu na organoživine spojeve, a kolonice sa sorbensom su komercijalno dostupne. I ova metoda uključuje ekstrakciju tekuće-tekuće i ukoncentriravanje analita nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi.

Metodama selektivne ekstrakcije metalnim kationima postiže se visoka selektivnost i akumuliranje analita u kemijski neizmijenjenom obliku. Korisne su prilikom analize tehnikom GC-O aktivnosti mirisa i detekcije novih aromatičnih tiola u vinu.^{167, 170, 299} Nedostaci ovih metoda uključuju veliki volumen uzorka, upotrebu organskih otapala, dugotrajnost i ekstrakciju tiola u slobodnom obliku što može uzrokovati neželjene reakcije, gubitke analita

hlapljenjem i otežanu kromatografsku separaciju. Osim toga, otrovni organoživini spojevi predstavljaju sigurnosni i okolišni rizik.

Tablice 2.10-2.13 prikazuju primjere metoda za detekciju i kvantifikaciju sortnih tiola u vinu i pivu uz primjenu različitih tehnika ekstrakcije, kromatografske separacije i detekcije. **Tablica 2.10** prikazuje metode bez primjene derivatizacije, dok su **Tablicama 2.11-2.13** metode koje primijenjuju derivatizaciju.

Tablica 2.10. Pregled metoda ekstrakcije, detekcije i kvantifikacije sortnih tiola bez primjene derivatizacije (popis kratica imena analitičkih tehnika nalazi se u Poglavlju 6)

Uzorak	Tehnika ekstrakcije	Separacija i detekcija	Nepokretna faza	Lit. izvor (godište)
Vino	LLE	GC-FPD, GC-MS	BP20 ili SPB1	167 (1995.)
Vino	LLE	GC-MS	BP20	170 (1998.)
Vino	LLE, afinitetna kromatografija	GC-AED, GC-MS	DB WAX	169 (2003.)
Pivo	LLE	GC-PFPD, GC-FID, GC-MS	FFAP CB, DB CP-sil 5 CB-MS	301 (2006.)
Vino	HS-SPME	GC-MS	InnoWAX zajedno s HP-1	176 (2007.)
Vino	SPE, SPME, PT	GC-PFPD, GC-MS	TR-5MS	175 (2008.)
Vino	HS-SPME	GC-ITMS	DB-WAX	304 (2009.)
Vino	LLE	GC-MS/MS (QqQ)	BP20 zajedno sa ZB-1ms	305 (2015.)
Vino	LLE	GC-MS/MS (QqQ)	ZB-1ms	160 (2017.)
Pivo	LLE → SPE(Ag ⁺)	GC-MS/MS (QqQ)	Pure-WAX	303 (2017.)
Vino	LLE, afinitetna kromatografija	GC-FID, GC-SCD GCxGC-Q-TOFMS	DB-FFAP, 1D: DB-FFAP 2D: DB-17ms	298 (2019.)

Tablica 2.11. Primjeri metoda detekcije i kvantifikacije sortnih tiola uz primjenu ekstrakcije tekuće-tekuće i derivatizaciju (popis kratica imena analitičkih tehnika nalazi se u Poglavlju 6)

Uzorak	V(uzorak)/ mL	Tehnika ekstrakcije	Derivatizacijski reagens	Separacija i detekcija	Lit. izvor (godishte)
Vino	1000	LLE	<i>p</i> -HMB	GC-MS	167 (1995.)
Vino	500	LLE, afinitetna kromatografija	<i>p</i> -HMB	GC-AED	169 (2003.)
Pivo	350	LLE	<i>p</i> -HMB	GCxGC- MS	306 (2017.)
Vino	6	LLE	PFBBr	GC-MS	307 (2007.)
Vino	80	LLE	<i>O</i> -ftalildialdehid	HPLC- MS/MS	308 (2015.)

Tablica 2.12. Primjeri metoda detekcije i kvantifikacije sortnih tiola uz primjenu ekstrakcije na čvrstoj fazi i derivatizaciju (popis kratica imena analitičkih tehnika nalazi se u Poglavlju 6)

Uzorak	V(uzorak)/ mL	Tehnika ekstrakcije	Derivatizacijski reagens	Separacija i detekcija	Lit. izvor (godishte)
Vino	10	SPE	PFBBr na sorbensu	GC-MS	309 (2008.)
Vino	50	SPE	ETP	GC-MS	285 (2013.)
Vino	20	SPE	4,4'-ditiodipiridin	HPLC- MS/MS	179 (2015.)
Vino	100	SPE	<i>p</i> -HMB, AENM	HPLC- MS/MS	310 (2017.)

Tablica 2.13. Primjeri metoda detekcije i kvantifikacije sortnih tiola uz primjenu mikroekstrakcije na čvrstoj fazi i derivatizaciju (popis kratica imena analitičkih tehnika nalazi se u Poglavlju 6)

Uzorak	V(uzorak)/ mL	Tehnika ekstrakcije	Derivatizacijski reagens	Separacija i detekcija	Lit. izvor (godišće)
Vino	10	HS-SPME	PFBBBr na sorbensu	GC-ECD GC-MS	284 (2006.)
Vino	100	SPE → HS-SPME	<i>O</i> -metil hidroksilamin, PFBBBr	GC-MS	311 (2009.)
Vino	200	LLE → HS-SPME	PFBBBr	GC-MS	312 (2011.)
Vino	3	HS-SPME	<i>O</i> -metil hidroksilamin	GC-MS/MS	313 (2014.)
Pivo	20	SBSE	ETP	GC-MS/MS	272 (2015.)

2.6.3. Derivatizacijske metode

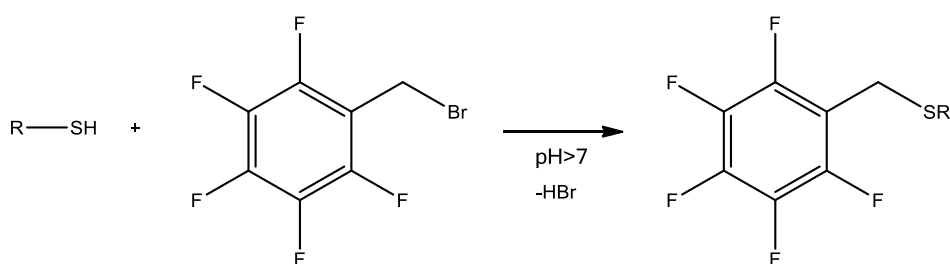
Prevođenje analita u stabilnije spojeve predstavlja veliki pomak u analizi sortnih tiola. Modifikacija sulfhidrilne skupine (i karbonilne u slučaju tiola 4-MSP) derivatizacijom smanjuje reaktivnost, olakšava ekstrakciju tiola i poboljšava toplinsku stabilnost prilikom plinskrokromatografske analize. Uvođenjem supstituenta smanjuje se polarnost analita, a raste hidrofobnost i molekulska masa, pa je analite moguće odrediti tekućinskom kromatografijom.³¹⁴ Izbor derivatizacijskog reagensa ovisi o specifičnosti i iskorištenju reakcije s analitom, kompatibilnosti s matricom uzorka, manipulaciji uzorka i potrebi za provođenjem ekstrakcije. Na **Slikama 2.15, 2.16, 2.17, 2.18 i 2.19** prikazani su derivatizacijski reagensi korišteni u analizi sortnih tiola u vinu i drugim prehrambenim proizvodima.

U dvama radovima Kreitman i suradnici^{34, 41} određivali su tiol 3-SH spektrofotometrijski uz derivatizaciju Ellmanovim reagensom. Tioli su određeni bez prethodne ekstrakcije pri $\lambda_{\max}=412$ nm uz primjenu vanjskog standarda. Ova metoda nije razrađena za analizu 3-SH u realnim uzorcima vina, a koristi se isključivo prilikom praćenja reaktivnosti sortnih tiola u modelnom vinu s odabranim komponentama vinske matrice.

Primjenom reagensa za derivatizaciju sortnih tiola 2,3,4,5,6-pentafluorbenzil-bromida, etilpropiolata i *O*-metilhidroksilamina nastaju stabilni derivati prikladni za analizu plinskom kromatografijom. PFBBr i ETP reagiraju sa sulfhidrilnom skupinom, dok reakcijom *O*-metilhidroksilamina s karbonilnom skupinom tiola 4-MSP nastaje metoksim. Derivati se ekstrahiraju tehnikama HS-SPME, SPE ili SBSE, a vrlo rijetko tehnikom LLE ili afinitetnom kromatografijom kao što je slučaj kod metoda u kojima se ne primjenjuje derivatizacija. PFBBr se koristi za derivatizaciju tiola jer je brom podložan nukleofilnoj supstituciji s tiolima u prisutnosti baze, a nastali derivati su stabilni i dobro se razdvajaju i detektiraju pa se osim spektrometrom masa mogu detektirati i detektorom zahvata elektrona (**engl.** *Electron Capture Detector*, ECD).^{284, 315} Derivatizacija sortnih tiola u vinu PFBBr-om (**Slika 2.15**) provedena je različitim postupcima: u organskom otapalu³⁰⁷ ili vodenoj otopini^{149, 312} nakon čega slijedi ekstrakcija tehnikom HS-SPME i SPE,³⁰⁹ *in situ* na sorbensu za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi²⁸⁴ ili kombinacijom tehnika SPE i HS-SPME.³¹¹

Derivatizacija na sorbensu za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi kratko traje i provodi se u odsustvu otapala na način da se sorbens PDMS/DVB izloži parama tributilamina, zatim PFBBr-a, a zatim parama iznad uzorka u koji su dodani prikladna sol i unutarnji standard. Ovim pristupom smanjuje se utjecaj interferencija, a postupak se može poluautomatizirati primjenom uzorkivača.²⁸⁴ Područje linearnosti odziva ECD-a za sortne tiole određene ovom metodom je usko, a kvantificirana su samo dva tiola, 2-MFT i 3-SHA. Poboljšanje metode postignuto je derivatizacijom u organskom otapalu, benzenu, i primjenom 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-ena (DBU), nenukleofilne baze za deprotoniranje tiola. Time se snižava koncentracija potrebnog PFBBr-a i smanjuje kontaminacija eluata suviškom reagensa. Ovom metodom prošireno je područje linearnosti,^{187, 307} ali je ponovljivost određivanja derivata 2-MFT i 3-SHA bila loša.³⁰⁷ Razvijena je metoda derivatizacije pentafluorbenzilbromidom na sorbensu u kolonici za ekstrakciju na čvrstoj fazi.^{107, 309} Ova metoda

jednostavno se izvodi, ali zahtijeva višestruko kondicioniranje sorbensa i podložna je učinku matrice. Iz tog je razloga modificirana uvođenjem tehnike SIDA.³⁰⁹ Razvijena je metoda koja kombinira derivatizaciju *O*-metilhidroksilaminom i PFBBr-om u otopini s ekstrakcijom tehnikama SPE i HS-SPME.³¹¹ Nakon metoksimiranja pH-vrijednost vina podešena je na 7 i provedena je derivatizacija pentafluorbenzil-bromidom na kolonici za SPE. Eluat je uparen do suha i analiti su ekstrahirani tehnikom HS-SPME. Zaluživanje je provedeno radi uklanjanja interferencija koje se ne zadržavaju na sorbensu pri nižim pH-vrijednostima.³¹¹



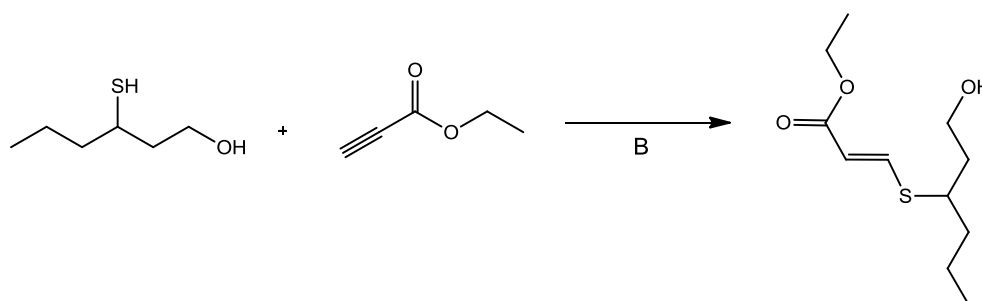
Slika 2.15. Derivatizacija tiola 2,3,4,5,6-pentafluorbenzil-bromidom²⁸⁴

U svim metodama u kojima su tioli derivatizirani pentafluorbenzil-bromidom analiti su razdvojeni plinskom kromatografijom i detektirani spektrometrijom masa uz negativnu kemijsku ionizaciju (**engl.** *Negative Chemical Ionization*, NCI), umjesto češće rabljene ionizacije elektronima (**engl.** *Electron Ionization*, EI).^{180, 312} Tehnika NCI nije rutinski dostupna, dok je analiza PFBBr-derivata tiola uz ionizaciju elektronima manje osjetljiva.¹⁸⁰

Razvijena je metoda određivanja tiola 3-SH koja uključuje ekstrakciju tekuće-tekuće pentanom i povratnu ekstrakciju otopinom NaOH, nakon koje slijedi derivatizacija PFBBr-om.³¹² Tom metodom je dokazano da se ionizacija derivatiziranog tiola može postići tehnikom EI, iako je potreban veći volumen uzorka nego kod ionizacije tehnikom NCI. Kvantificiran je samo 3-SH, s granicom detekcije nižom od mirisnog praga detekcije.³¹² Sličnom metodom kvantificirani su 3-SH, 3-SHA i 4-MSP u uzorku vina volumena 40 mL derivatizacijom s PFBBr-om uz istovremenu ekstrakciju derivata smjesom pentana i dietil-etera.¹⁸⁰ Ekstrakti su upareni i analizirani tehnikom HS-SPME. Poboljšanja ove metode su učinkovitije uklanjanje interferencija i manji broj koraka, čime se izbjegava gubitak analita.

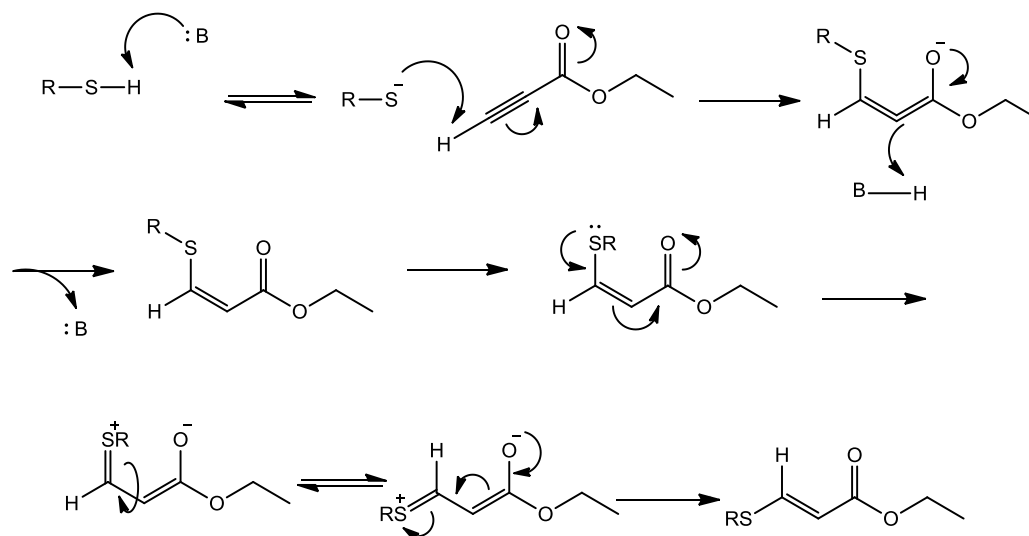
U usporedbi s metodama kompleksiranja organoživinim spojevima, metode derivatizacije tiola PFBBr-om zahtijevaju mnogo manji volumen uzorka i otapala i uključuju manji broj koraka pripreve uzorka. Međutim, postupak ekstrakcije je dugotrajan, složen i zahtijeva korekciju pH-vrijednosti uzorka, a PFBBr je korozivan i skup organofluorov reagens.

Etil-propiolat (etil-prop-2-inoat) je derivatizacijski reagens novije generacije korišten u kvantifikaciji sortnih tiola u vinu, pivu i ekstraktu hmelja (**Slika 2.16**).^{42, 199, 272, 285, 316, 317} Zacharis i suradnici^{318, 319} predložili su upotrebu etil-propiolata za derivatizaciju cisteina i glutationa u povrću. Prednosti primjene etil-propiolata su brojne: reakcija je jednostavna, izvediva u vodenoj otopini, odvija se brzo i selektivno u blagim uvjetima, može se lako kontrolirati promjenom pH-vrijednosti medija, reagens je jeftin i slabo toksičan. Nastali alkiltioakrilati apsorbiraju zračenje u području valnih duljina između 270 nm i 320 nm pa su u modelnom vinu određeni tehnikom spektrofotometrije u ultraljubičastom i vidljivom području. U realnom vinu komponente matrice također apsorbiraju zračenje u navedenom rasponu valnih duljina i kvantifikacija tiola nije moguća. Zbog hlapljivosti etil-propiolata i njegove male molekulske mase, predložena je analiza derivata plinskom kromatografijom.²⁸⁵



Slika 2.16. Derivatizacija sortnog tiola 3-SH etil-propiolatom²⁸⁵

Propiolatni esteri lako stupaju u reakciju s tiolima u blago bazičnim uvjetima te nastaju stabilni alkiltioakrilati (**Slika 2.17**). Reakcija se temelji na deprotoniranju tiola i nukleofilnom napadu tiolata na ugljikov atom trostruke veze reagensa.³¹⁸ Kinetika reakcije je određena deprotoniranjem tiolne skupine koje se događa kada je pH-vrijednost uzorka viša od vrijednosti pK_a sulfhidrilne skupine. Zamijećeno je najbrže odvijanje reakcije pri vrijednosti $pH=10$.²⁸⁵

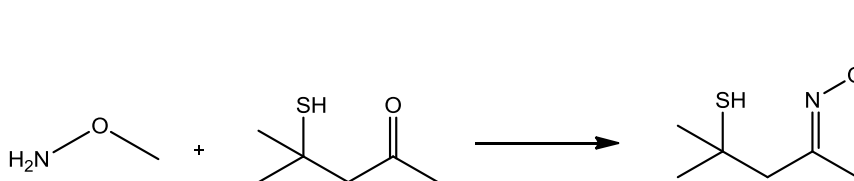


Slika 2.17. Mehanizam bazom katalizirane derivatizacije tiola etil-propiolatom i ravnoteže između (*E*)- i (*Z*)-izomera produkta³²⁰

Nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi na sorbentu ENVI-18 ili DSC-18, eluirani derivati detektiraju se tehnikom GC-MS.²⁸⁵ Primjena etil-propiolata kao reagensa za derivatizaciju pojednostavljuje analizu tiola, ali zahtijeva korekciju pH-vrijednosti uzorka, koja može uzrokovati degradaciju analita. Drugi nedostatak ove metode je slabo iskorištenje reakcije s tiolom 4-MSP zbog intramolekularne vodikove veze između sulfhidrilne i karbonilne skupine te steričke zasjenjenosti.^{285, 309}

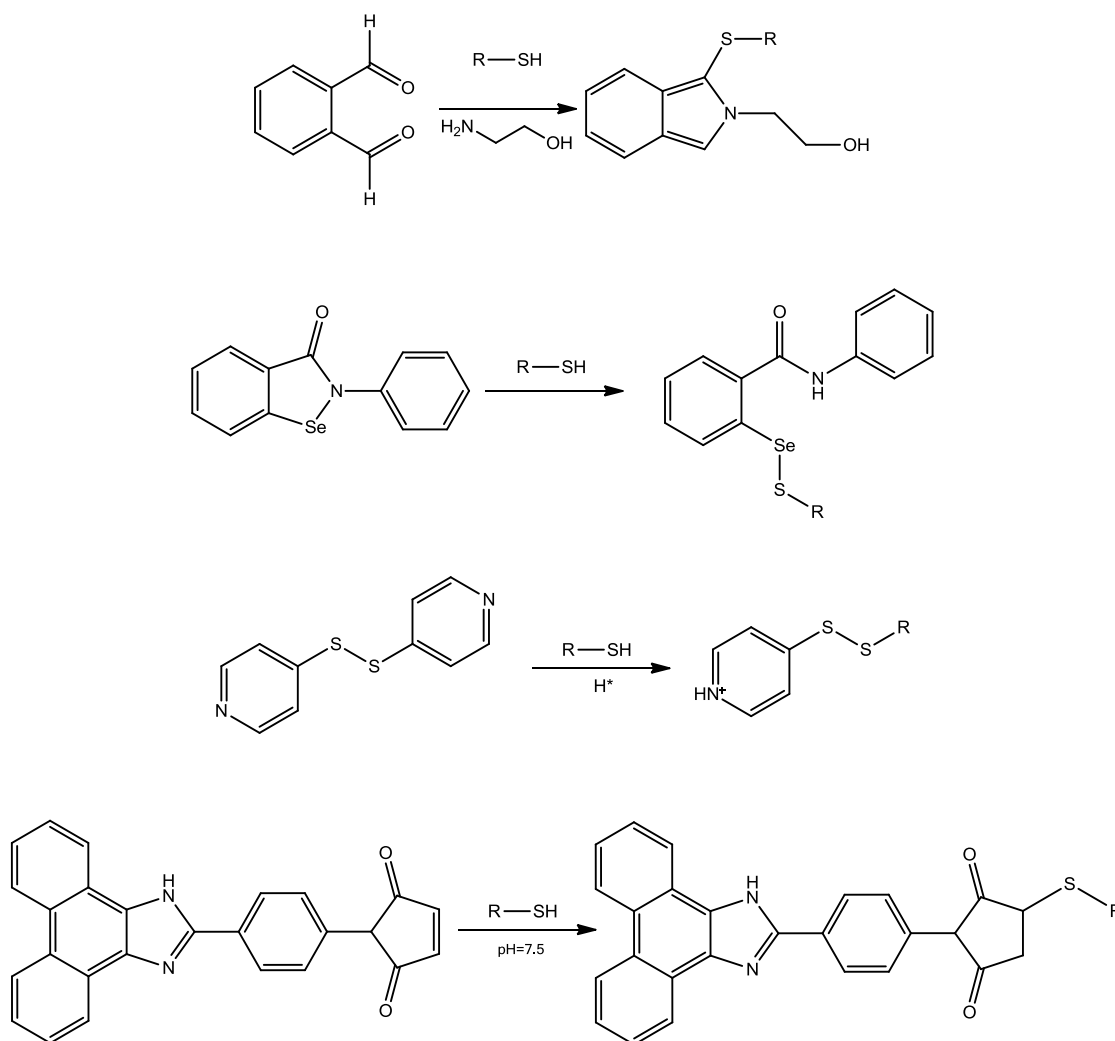
Istražena je derivatizacija tiola 3-SH, 3-SHA i 4-MSP u pivu i hmelju ETP-om *in situ* uz ekstrakciju tehnikom SBSE. Sorpcijska ekstrakcija miješalom relativno je jednostavan postupak koji primijenjuje manji volumen otapala, ali zahtijeva optimiranje pH-vrijednosti. Miješalo prije upotrebe treba kondicionirati, a instrument mora biti opremljen nastavkom za toplinsku desorpciju.^{272, 321} U najnovijem radu Romana i suradnika³²² derivati sortnih tiola s ETP-om i njihovi prekursori ekstrahirani su iz vina sorte Sauvignon bijeli tehnikom ultrazvučne ekstrakcije. U tim su ekstraktima nađene više koncentracije sortnih tiola nego u ekstraktima pripravljenima ekstrakcijom tekuće-tekuće, dok je utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju prekursora bio negativan.³²²

U upotrebi je još metoda prevođenja karbonilne skupine tiola u metoksim *O*-metilhidroksilaminom (**Slika 2.18**). Primjenjuje se za modifikaciju tiola 4-MSP prije derivatizacije sulfhidrilne skupine PFBBr-om. Ovi su reagensi korišteni u kombinaciji s tehnikom SIDA i ekstrakcijom tehnikom HS-SPME za analizu tiola 4-MSP pri koncentracijama nižim od mirisnog praga detekcije. Postupak je proveden na uzorku vrlo malog volumena ($V=3$ mL) uz kraće trajanje. Iako je metoda jednostavna i osjetljiva, njome je kvantificiran samo tiol 4-MSP. Nastaju dva izomera derivata, od kojih je (*E*)-izomer izabran za kvantifikaciju.³¹³



Slika 2.18. Reakcija derivatizacije sortnog tiola 4-MSP *O*-metilhidroksilaminom³¹³

Posljednjih desetak godina razvijene su metode pripreve derivata tiola pogodnih za analizu tekućinskom kromatografijom. Postupci ekstrakcije pojednostavljeni su uz postizanje odlične osjetljivosti. Najvažniji derivatizacijski reagensi (**Slika 2.19**) za analizu tiola tekućinskom kromatografijom su *O*-ftalildialdehid,³⁰⁸ *N*-fenilmaleimid,³²³⁻³²⁵ 2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(*2H*)-on (ebselen),³²⁶⁻³²⁹ 4,4'-ditiopiridin (DTDP),^{179, 330, 331} te 1-(4-(1*H*-fenantro[9,10-²H₂]imidazol-2-il)fenil)-1*H*-pirol-5-dion (PIPD)³³². Ovi reagensi lako stupaju u reakciju sa sulfhidrilnom skupinom, a derivatizacijske reakcije se kombiniraju s ekstrakcijom tekuće-tekuće ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi.



Slika 2.19. Reakcije tiola s reagensima za derivatizaciju uz analizu tekućinskom kromatografijom: *O*-ftalildialdehidom, 2-fenil-1,2-benzoselenazol-3(2*H*)-onom, 4,4'-ditiopiridinom i 1-(4-(1*H*-fenantro[9,10-²H₂]imidazol-2-il)fenil)-1*H*-pirol-5-dionom^{179, 308, 327, 332}

O-Ftalildialdehid je korišten za derivatizaciju tiola (**Slika 2.19**) u bijelom vinu^{308, 333, 334} zbog reaktivnosti dialdehida s tiolima i drugim nukleofilima.³³⁵ Derivatizacija tiola ovim reagensom uz etanolamin kao bazu kratko traje i provodi se u blagim uvjetima. Međutim, tiol 4-MSP ne može se prevesti u ftalilni derivat, a pročišćavanje uzorka je složeno. Vinu se dodaje kalijev metabisulfit i polivinilpirolidon, slijedi podešavanje pH-vrijednosti i reakcija s borhidridom, pa ekstrakcija tekuće-tekuće diklormetanom i ukoncentriravanje prije

derivatizacije. Ftalilni derivati nestabilni su nakon kraće pohrane pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, pa rezultati kvantitativnog određivanja mogu biti pogrešni.³⁰⁸

Roland i suradnici³²³ kvantificirali su tiole 3-SH i 3-SHA u vinu tehnikom HPLC-MS/MS, uz prethodnu redukciju disulfida u tiole. Derivatizacija je provedena *N*-fenilmaleimidom zbog kompatibilnosti reagensa s uvjetima redukcije. Tiol 3-SH brže stupa u reakciju s *N*-fenilmaleimidom, a derivatizacija tiola 3-SHA traje dvostruko duže. Derivati su pročišćeni tehnikom SPE uz eluiranje smjesom acetonitrila i 2,2,2-trifluoetanolu ($\psi=9:1$) uz dodatak mravlje kiseline (0,1 %, w/v). Optimiranjem je postignuta granica detekcije od $0,7\text{ ng L}^{-1}$ i $0,5\text{ ng L}^{-1}$ za 3-SH odnosno 3-SHA. Izotopomeri analita, $[^2\text{H}_5]\text{-3-SHA}$ i $[^2\text{H}_2]\text{-3-SH}$, korišteni su kao unutarnji standardi.

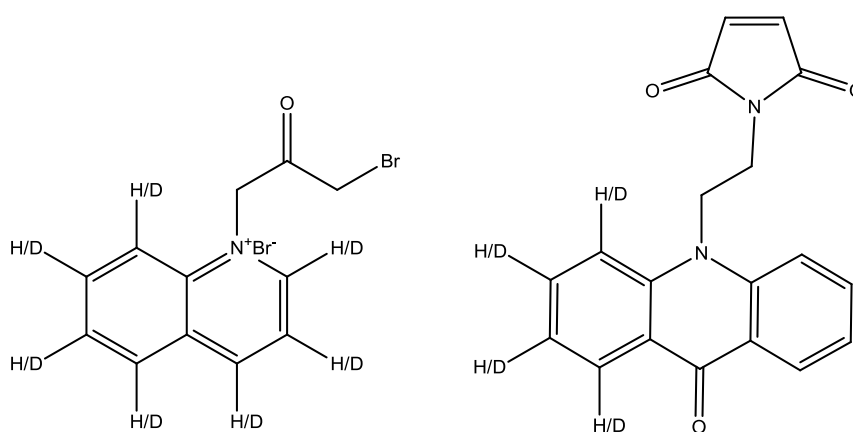
Derivatizacijski reagens ebselen selektivno reagira s tiolima cijepanjem veze selenij-dušik i nastankom veze selenij-sumpor.³³⁶ Ebselenom (**Slika 2.19**) su derivatizirani hlapljivi tioli u raznolikim matricama, od vina, piva i kave do maslinova ulja.³²⁶⁻³²⁹ Derivatizacija ebselenom je kratkotrajna, provodi se u jednom koraku dodatkom reagensa u organskom otapalu i ekstrakcijom tekuće-tekuće prije ukoncentriravanja i analize.³²⁶⁻³²⁹ Postupak je jednostavniji od prethodno opisanih derivatizacija, iako se provodi u atmosferi dušika. Ionizacija nastalih derivata je poboljšana, a kromatografski signal je intenzivniji. Derivatizacija DTDP-om je korištena u analizi sortnih tiola u vinu zbog specifičnog i kvantitativnog vezanja reagensa na sulfhidrilnu skupinu pri pH-vrijednosti vina.^{179, 286, 337-339} Nije potrebno zaluživanje uzorka, a u kombinaciji s tehnikom SPE postiže se dobra osjetljivost.¹⁷⁹ Granice određivanja analiziranih tiola su između $0,01\text{ ng L}^{-1}$ i 10 ng L^{-1} , a relativna standardna devijacija bila je do 10 %.³²⁷

Istom su metodom analizirani enantiomeri tiola 3-SH i 3-SHA, primjenom konvergencijske kromatografije pri superkričnim uvjetima bez ukoncentriravanja eluata nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi.^{330, 338} Spoj 4,4'-ditiodipiridin je slabo toksičan, derivati su stabilni i lako se ioniziraju zbog prisutne piridinske skupine, ali je potrebno dodati disulfidni reagens u suvišku kako bi se tioli potpuno preveli u derivate. Nastali disulfidi mogu dalje reagirati ako postoje slobodne sulfhidrilne skupine pa se derivati razgrađuju.³³⁶

U radu Zhuang i suradnika³³² sortni tioli u prehrambenim namirnicama derivatizirani su PIPD-om (Slika 2.19). Maleimidna skupina u PIPD-u brzo reagira s tiolima i nastaju derivati koji se mogu detektirati fluorescencijskim detektorom i identificirati spektrometrijom masa uz kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (**engl.** *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, APCI).³³² Ekstrakcija tiola provodi se prije derivatizacije u fosfatnom puferu vrijednosti pH=7,5, a derivati se razrjeđuju metanolom i izravno injektiraju u kromatograf.³³² Ova metoda je brza, osjetljiva i precizna, ali zahtijeva posebno dizajniranu komoru, a uzorak se zagrijava pri visokoj temperaturi. Reagens PIPD uglavnom nije komercijalno dostupan i mora se sintetizirati.

Plinskromatografska analiza zahtijeva primjenu unutarnjeg standarda prilikom kvantifikacije tiola. Standardi, pogotovo deuterirani, često nisu komercijalno dostupni ili su vrlo skupi, a njihova sinteza je složena.

U novije vrijeme primjenjuju se izotopno obilježeni derivatizacijski reagensi u paru s neobilježenim reagensima, koji pojednostavljaju identifikaciju i kvantifikaciju tiola zbog razlike u masi fragmenata derivata.^{310, 340-342} Primjeri parova ovih reagensa su [²H₀]/[²H₇]- ω -bromacetonilkinolinijev bromid ([²H₀]/[²H₇]-BQB) korišten u analizi piva, vina i vode i [²H₀]/[²H₄]-akridon-10-etil-*N*-maleimid ([²H₀]/[²H₄]-AENM) (Slika 2.20) korišten u analizi vina.^{310, 341, 343}



Slika 2.20. Izotopno obilježeni i neobilježeni derivatizacijski reagensi [²H₀]/[²H₇]- ω -bromacetonilkinolinijev bromid i [²H₀]/[²H₄]-akridon-10-etil-*N*-maleimid^{310, 343}

Reagensi sadrže brom odnosno maleimid, koji reagira s tiolima, skupinu koja se može lako ionizirati te izotopno obilježenu skupinu. Derivatizacija BQB-om jednostavno se provodi, ali je dugotrajna, dok derivatizacija AENM-om traje kraće, no zahtijeva prethodnu ekstrakciju na čvrstoj fazi uz primjenu organoživinih reagensa.^{310, 341} Primjenom ovih reagensa granice detekcije snižene su do desetak pmol L⁻¹, a reagensi nisu komercijalno dostupni.

2.6.4. Utjecaj matrice uzorka u analizi sortnih tiola

Prilikom analize arome vina osim identifikacije i kvantifikacije analita potrebno je uzeti u obzir njihovu interakciju s hlapljivim i nehlapljivim komponentama matrice. Interakcije utječu na otpuštanje aromatičnih spojeva iz vina promjenom hlapljivosti i topljivosti pa mogu izmijeniti, pojačati ili oslabiti njihovu percepciju.³⁴⁴ Matrica vina je vrlo složena i sadrži najrazličitije vrste spojeva uključujući ugljikohidrate, proteine, polifenole i druge makromolekule koje potječu iz kožice i pulpe grožđa i staničnih stijenki kvasca.^{236, 237, 264} Tioli u vinu nisu samo otopljeni u smjesi vode i etanola već stupaju u interakcije s nehlapljivim spojevima.³⁴⁴ Osim toga, sniženjem koncentracije najzastupljenijih aromatičnih estera i viših alkohola izostaje „maskiranje“ aromatičnih tiola prisutnih u mnogo nižim koncentracijama.³⁴⁵ Pronađeno je da kofermentacijom kvascem *M. Pulcherrima* uz kvasac *S. cerevisiae* nastaju vina izraženijeg voćnog karaktera uz povišene koncentracije tiola 4-MSP i snižene koncentracije viših alkohola.²¹⁶

Djelomično je istražen utjecaj komponenti matrice na koncentracije sortnih tiola u prehrambenim proizvodima. Davis i suradnici²⁶⁴ proučavali su utjecaj hlapljivih spojeva u vinu (octene, heksanske, oktanske i dekanske kiseline, 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola, feniletalnog alkohola i estera etil-acetata, 3-metil-1-butil-acetata, etil-heksanoata, etil-oktanoata i etil-dekanoata) na ekstrakciju aromatičnih tiola tehnikama HS-SPME uz analizu plinskim kromatografom i detekciju pulsniplameno-fotometrijskim detektorom (**engl.** *Pulsed Flame Photometric Detector*, PFPD). Značajno sniženje koncentracije tiola primijećeno je s povišenjem koncentracije analiziranih aromatičnih spojeva zbog kompetitivne adsorpcije na sorbens izložen parama iznad otopine. Unatoč niskim koncentracijama, istraženi hlapljivi spojevi mogu kumulativno utjecati na ravnotežu

razdjeljenja tiola između matrice uzorka i para iznad otopine.^{346, 347} U modelnom, djelomično dearomatiziranom i izvornom vinu sorte Chenin bijeli senzorskom je metodom istražen utjecaj etanola na percepciju tiola 3-SH i 3-SHA. Aroma sortnih tiola bila je najizraženija u dearomatiziranom vinu zbog niže koncentracije etanola.³⁴⁴ Lund i suradnici⁶⁹ su pokazali da prisutnost kafeinske kiseline u vinu sorte Sauvignon bijeli dovodi do porasta hlapljivosti 3-sulfanilheksan-1-ola, vjerojatno zbog reakcije kafeinske kiseline s drugim spojevima koji su prethodno maskirali utjecaj sortnog tiola na aromu, dok prisutnost katehina i kvercetina dovodi do niže hlapljivosti ovog spoja.

Utjecaj matrice redovito se opaža prilikom analize hrane i pića pa kvantifikaciju analita treba provesti oprezno kako bi se izbjegao pogrešan zaključak o zastupljenosti aromatičnih spojeva u uzorku.³⁴⁸ Interferencije uzrokovane matricom utječu na ekstrakciju, separaciju i detekciju analita.²⁸⁴ Utjecaj matrice može se utvrditi usporedbom nagiba baždarnih krivulja za određivanje spojeva u različitim matricama i modelnom vinu.^{284, 311, 331} Pri detekciji analita spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (**engl.** *Electrospray Ionization*, ESI) matrica može utjecati na smanjenje zabilježenih signala analita zbog kompetitivne adsorpcije komponenti matrice na sorbens.³⁴⁹

Izbor unutarnjeg standarda važan je kako bi se smanjio utjecaj matrice na konačni rezultat analize. Spojevi slični sortnim tiolima korišteni su kao unutarnji standardi, najčešće 4-metoksi-2-metil-2-sulfanilbutanol i 6-SH.^{170, 176} Razlike fizikalnih i kemijskih svojstava ovih spojeva i svojstava analita dovoljne su da mogu uzrokovati pogrešnu kvantifikaciju.¹⁶⁹ Najbolji rezultati postižu se tehnikom SIDA, koja primijenjuje izotopno obilježene unutarnje standarde, izotopomere. Ovom tehnikom se gotovo u potpunosti kompenziraju varijacije koje se pojavljuju prilikom ekstrakcije, derivatizacije i kromatografske separacije jer su svojstva izotopomera gotovo identična svojstvima analita.³⁵⁰ Izotopno razrjeđenje korišteno je u analizi sortnih tiola uz detekciju tehnikom GC-MS, a rjeđe uz tehniku HPLC-MS.^{169, 179, 180, 285, 306, 308, 309, 311, 338} Izotopomeri su obilježeni deuterijem,^{169, 179, 180, 285, 306, 309, 312, 338} ili izotopom ¹³C.³⁰⁶ U idealnom slučaju izotopomer sadrži veći broj atoma težeg izotopa, ali uspješno su razvijene metode s primjenom izotopomera [²H₂]-3-SHA i [²H₂]-3-SH.^{308, 309} Izotopomeri i njihovi derivati imaju kraće vrijeme zadržavanja, koje je ovisno o stupnju obilježenosti izotopom.^{179,}

311

Tehnikom izotopnog razrjeđenja nije u potpunosti uklonjen utjecaj matrice. Deuterirani standardi dodani u vino oksidiraju se brže od analita.³⁰⁹ Glavni nedostatak tehnike izotopnog razrjeđenja je nedostupnost ili visoka cijena izotopomera.¹⁴¹ Analitički povrati i signali derivata izotopomera mogu biti niži od signala derivata analita zbog utjecaja sekundarnog izotopnog učinka na kinetiku reakcije. U tom se slučaju provodi normalizacija signala analita prilikom izrade baždarne krivulje.

2.6.5. Instrumentna analiza

Kromatografski instrumenti vezani su s odgovarajućim detektorima za detekciju i kvantifikaciju tiola ili njihovih derivata: plinski kromatograf vezan je s olfaktometrom (O), plamenoionizacijskim detektorom (**engl.** *Flame Ionisation Detector*, FID), FPD-om, PFPD-om, AED-om, ECD-om, SCD-om ili MS-om s jednostrukim kvadrupolom (Q), trostrukim kvadrupolom (QQQ), stupicom za ione, analizatorom vremena leta ili orbitalnom stupicom (**engl.** *Orbitrap*).⁶ Tekućinski kromatograf najčešće je vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom, a analiza se provodi u sustavu obrnutih faza.

U vezanom sustavu plinski kromatograf – spektrometar masa se za ionizaciju tiola upotrebljava ionizacija elektronima i kemijska ionizacija (**engl.** *Chemical Ionization*, CI), a u vezanom sustavu tekućinski kromatograf – spektrometar masa tehnika pozitivne ESI. Thibon i suradnici³⁰⁵ usporedili su učinak različitih vrsta ionizacije na detekciju tiola 3-SH, 4-MSP i 3-SHA analiziranih tehnikom GC-MS/MS. Kemijska ionizacija proces je niže energije od ionizacije elektronima i uzrokuje slabiju fragmentaciju analita. U kemijskoj ionizaciji analiti se ioniziraju reakcijama u plinovitoj fazi, uglavnom prijenosom protona (H^+) s plina reagensa. Koriste se i tekući reagensi s vrelištem ispod ili oko sobne temperature. U ovom radu za kemijsku ionizaciju analita korišten je pentan. Kemijskom ionizacijom uz tehniku MRM postignute su niske granice detekcije i određivanja tiola od nekoliko desetaka $ng\ L^{-1}$, dok su uz ionizaciju elektronima te vrijednosti bile još niže. Unatoč uspješnoj primjeni pentana za CI, EI je zbog niže granice određivanja najbolja tehnika ionizacije derivata sortnih tiola.³⁰⁵

Analiza nederivatiziranih sortnih tiola provodi se dinamičkom analizom para iznad otopine ili neposrednim injektiranjem na GC-kolonu pri niskim temperaturama.^{167, 169, 298} Dinamičkom analizom para iznad otopine analiti se ukoncentriravaju iz uzorka velikog volumena, dok se neposrednim injektiranjem na GC-kolonu pri niskim temperaturama izbjegava razgradnja analita.^{167, 351} Toplinska stabilnost analita poboljšava se derivatizacijom pa se primjenjuju uobičajeni načini injektiranja, kao što su djelomično unošenje uzorka,^{180, 313} izravno unošenje uzorka,^{284, 285, 312} pulsno izravno unošenje uzorka,³⁰³ izravno unošenje uzorka u nastavku za toplinsku desorpciju³⁰² i injektiranje velikog volumena.^{307, 309}

Separacija tiola plinskom kromatografijom provodi se na nepolarnim kolonama BPX-5¹⁷⁰ i DB-5MS³¹² ili polarnim kolonama HP-Innowax²⁸⁵ i DB-Wax.³¹³ Prilikom injektiranja uzorka velikog volumena koriste se „megabore“ kolone unutarnjeg promjera od 0,53 mm.¹⁶⁹ Osim jednodimenzijskom, sortni tioli analiziraju se i višedimenzijskom, najčešće dvodimenzijskom plinskom kromatografijom tehnikom odstranjivanja najzastupljenijeg sastojka i sveobuhvatnom plinskom kromatografijom.^{180, 298, 306} Unatoč povećanom razlučivanju tehnikom GC×GC, sortni tioli u slobodnom obliku, osobito 4-MSP, nisu detektirani zbog intenzivnog pozadinskog šuma, već su detektirani isključivo u obliku derivata.³⁰⁶ Nedavno je objavljen rad u kojem su nederivatizirani sortni tioli nakon izdvajanja iz vina afinitetnom kromatografijom analizirani tehnikom sveobuhvatne plinske kromatografije sa spektrometrijom masa s analizatorom vremena leta (**engl.** *Comprehensive Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry*, GC×GC-TOFMS), a granice detekcije spojeva bile su niže u usporedbi s analizom tehnikom GC-SCD.²⁹⁸

Prilikom analize sortnih tiola plinskom kromatografijom izbor detektora ovisi o raspoloživosti i ciljevima metode. Plamenoionizacijski detektor i spektrometar masa s analizatorom vremena leta i kvadrupolom (**engl.** *Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Q-TOFMS) te detektori selektivni za sumpor FPD,^{167, 352} PFPD^{64, 247, 269} i SCD^{45, 272, 298} češće se primjenjuju u kvalitativne svrhe, dok se detektori MS (Q), MS (QqQ) i spektrometar masa s kvadrupolnom stupicom za ione (**engl.** *Ion Trap Mass Spectrometry*, ITMS) redovito koriste za kvantifikaciju. Sumporov dioksid prisutan u vinu u masenim koncentracijama višim od 50 mg L⁻¹ može negativno utjecati na detekciju tiola kada se koriste detektori selektivni za sumpor.²⁵⁶

U identifikaciji tiola koriste se indeksi zadržavanja izračunati nakon detekcije analita PFPD-om.³⁰² Detektor SCD također se upotrebljava za analizu sortnih tiola zbog visoke selektivnosti i osjetljivosti, uz granicu detekcije nižu od 1 ng L^{-1} .²⁹⁸ Uvjeti kromatografske separacije optimirani tijekom početnih analiza uz detektor FPD i druge jednostavnije, jeftinije i dostupnije detektore mogu se primijeniti bez izmjene u kasnijim fazama analize uz detekciju spektrometrom masa.³⁵³

Većina kvantitativnih analiza vrši se vezanim sustavom plinski kromatograf-spektrometar masa uz tehniku EI i rjeđe CI.^{169, 284, 307, 309, 311} Praćenje odabranih iona (**engl. Selected Ion Monitoring**, SIM) češće se rabi od snimanja cjelokupnog spektra (**engl. Full Scan**), uz odabir kvantifikacijskog iona i dva kvalifikacijska iona u slučaju primarne fragmentacije. Tandemnom spektrometrijom masa uz praćenje višestrukih reakcija, praćenje odabranih reakcija ili praćenje uzastopnih reakcija postiže se bolja osjetljivost metode, ovisno o tehnici sekundarne fragmentacije (QqQ ili ITMS). Granice detekcije tiola 3-SH u vinima uz primjenu jednostruke fragmentacije bile su 30 ng L^{-1} ,³¹² 69 ng L^{-1} ,¹⁷⁶ 7 ng L^{-1} ,³⁰⁷ i 2 ng L^{-1} ,³⁰⁹ a primjenom MS/MS-a te su vrijednosti snižene do $1,9 \text{ ng L}^{-1}$,³⁰³ i $0,7 \text{ ng L}^{-1}$.¹⁶⁹

Tekućinska kromatografija rutinski se koristi za analizu nehlapljivih tiola poput glutationa i cisteina u vinu,^{354, 355} dok su metode analize sortnih tiola razvijene nedavno. Hlapljivost i mala zastupljenost čini sorte tiola prikladnijima za analizu plinskom kromatografijom nego vezanim sustavom tekućinska kromatografija-spektrometar masa. Da bi se provela analiza tekućinskim kromatografom, analite je potrebno prevesti u nehlapljive derivate. Neke od metoda tekućinske kromatografije imaju učinkovitost usporedivu s metodama plinske kromatografije. Derivati tiola redovno se razdvajaju u sustavu obrnutih faza, obično uz primjenu oktadecilsilanske (C_{18}) nepokretne faze. Najčešće korištene pokretne faze su smjesa vode i metanola^{326, 340} ili vode i acetonitrila.^{179, 310, 331} Metode analize tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti traju dvadesetak minuta,³⁰⁸ dok GC-metode traju oko sat vremena.¹⁸⁰ Tandemna spektrometrija masa glavna je tehnika detekcije tiola razdvojenih tekućinskom kromatografijom. Najbolja osjetljivost i selektivnost postiže se primjenom analizatora mase QqQ, Q-TOF i orbitalnom stupicom uz ionizaciju elektroraspršenjem. Trostruki kvadrupol koristi se za kvantifikaciju tehnikom MRM,^{179, 308, 331} dok je dvostruko pretraživanje iona prekursora (**engl. Double Precursor Ion Scan**, DPIS)

korišteno u identifikaciji.^{340, 341} Probir fragmentacija u razvoju metode MRM uključuje jedan kvantifikacijski par i barem jedan identifikacijski par, a prijelazi se odabiru analizom standardnih otopina derivata.¹⁷⁹ MRM odabranih fragmentacijskih parova rezultira kromatogramom s manje interferencija.³¹⁰ Primjena trostrukog kvadrupola uz tehniku MRM koristi se u analizi derivata konvencionalnih derivatizacijskih reagensa^{179, 180, 308, 331} ili izotopima obilježenih reagensa.³¹⁰ Potonji su korišteni u kombinaciji s dvostrukim pretraživanjem iona prekursora za analizu aromatičnih tiola u pivu, a nisu istraženi u vinu.^{340, 341}

Izotopima obilježeni derivati tiola tvore karakteristične fragmente s konstantnom razlikom mase, a njihov identitet može se utvrditi tehnikom DPIS s trostrukim kvadrupolom, i tehnikom Q-TOFMS.³⁴⁰ Tioli su uz detekciju spektrometrom masa s orbitalnom stupicom analizirani u uzorcima maslinovog ulja, vina, piva i kave.^{326, 327, 329} Fragmenti derivata ebselena prate obrazac masa izotopa selenija (⁸⁰Se, ⁷⁸Se) i mogu se lako identificirati.³²⁶ U kromatogramima snimljenima uz detekciju spektrometrom masa s orbitalnom stupicom šum osnovne linije bio je vrlo mali, a granice detekcije tiola 3-SH bile su vrlo niske, 0,1 ng kg⁻¹ u maslinovom ulju i 0,01 ng L⁻¹ u vinu.^{326, 327}

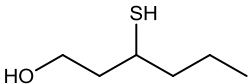
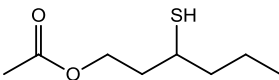
Metode analize uz separaciju plinskom kromatografijom uključuju složeniju pripremu uzoraka, ali su prikladnije od tekućinske kromatografije za istraživanje aromatskog profila i olfaktometrijsku analizu utjecaja analita na aromu proizvoda.³⁵⁶ Utjecaj matrice manji je kod metoda plinske kromatografije.²⁹⁸ Višedimenzijaska plinska kromatografija ima veliku moć razdvajanja, a dvodimenzijaskim tehnikama smanjuje se šum osnovne linije i utjecaj matrice.³⁵⁷ Analizom hlapljivih tiola u vinu i voću tehnikom GC×GC-TOFMS identificirano je nekoliko novih tiola.²⁹⁸

Osim plinske i tekućinske kromatografije, sortni tioli određeni su konvergencijskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz tandemnu spektrometriju masa nakon derivatizacije tiola DTDP-om.¹⁷⁹ U ovoj je metodi pokretna faza bio superkritični ugljikov dioksid. Tioli su identificirani tehnikom MRM uz trostruki kvadrupol. Granica detekcije sortnih tiola bila je niža od 5 ng L⁻¹.³³⁰

Smjer u kojem će se razvijati analiza sortnih tiola u vinu treba uključivati istraživanje i razvoj novih nepokretnih faza u plinskoj kromatografiji,³⁵⁸ alternativnih otapala za ekstrakciju,³⁵⁹ selektivnih sorbensa za ekstrakciju na čvrstoj fazi, polimernih sorbensa s molekularnim otiskom kao nepokretnih faza u afintitetnoj kromatografiji ili ekstrakciji na čvrstoj fazi, novih sorbensa za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi³⁶⁰ te testiranje nekorištenih i razvoj novih, selektivnih reagensa³⁶¹⁻³⁶⁹ za derivatizaciju koji ne zahtijevaju podešavanje pH-vrijednosti uzorka. Primjena vodljivih i fluorescentnih polimera³⁷⁰ osjetljivih za tiole predstavlja novi pristup kojim bi se izbjegla derivatizacija. Granica detekcije može se sniziti, a osjetljivost poboljšati primjenom orbitalne stupice ili Q-TOFMS detektora visokog razlučivanja.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Spojevi analizirani u ovom radu

Naziv	Struktura	Chemical Abstracts Service registar	Prag mirisne detekcije/ ng L ⁻¹	Vrelište/ °C
3-Sulfanilheksan-1-ol		51755-83-0	60	198,00
3-Sulfanilheksil-acetat		136954-20-6	4,2	186,00

3.2. Opće napomene

Kemikalije

- Kemikalije stupnja čistoće *pro analysi*:
 - [²H₃]-Acetil-klorid, 2-aminoetan-1-ol, askorbinska kiselina, bezvodni natrijev sulfat, [²H₁₀]-butan-1-ol, butilirani hidroksianisol, 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en, dimetilsulfoksid, etilendiamintetraoctena kiselina, etil-propiolat, heksametildisilazan, trietilamin, 2,3,4,5,6-pentafluorbenzil-bromid i *p*-toluensulfonska kiselina proizvodi su tvrtke Sigma Aldrich (St. Louis, MO, SAD).
 - Butan-1-al, oksalil-klorid i tiooctena kiselina nabavljeni su od tvrtke TCI (Zwijndrecht, Belgija).
 - Natrijev klorid i vinska kiselina proizvodi su tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka).
 - (Etoksikarbonilmetilen)trifenilfosforan proizvod je tvrtke AKSci (Union City, CA, SAD).
 - Litijev aluminijev deuterid nabavljen je od tvrtke CIL (Cambridge, Velika Britanija).

- Klorovodična kiselina i natrijev hidroksid nabavljeni su od tvrtke Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka).
- Otapala čistoće >99,9 %: dietil-eter, *n*-pentan i tetrahidrofuran proizvodi su tvrtke Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska); otapala acetonitril i metanol dobavljena su od tvrtke VWR Chemicals (Randor, PA, SAD); aceton i apsolutni etanol proizvodi su tvrtke Chem-Lab NV (Zedelgem, Belgija); diklormetan i *n*-heksan dobavljeni su od tvrtke Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka).
- Otapalo etil-acetat čistoće >99,999 % dobavljeno je od proizvođača Promochem (Wesel, Njemačka).
- Deuterirana otapala [²H₁]-CHCl₃ i [²H₆]-DMSO proizvodi su tvrtke CIL (Cambridge, Velika Britanija).
- Silikagel (230-400 mesh) i pločice za tankoslojnu kromatografiju Kieselgel 60F₂₅₄ proizvod su tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka).
- Enološki aditiv Sumpovin proizvod je tvrtke Inovent (Zagreb, Hrvatska); enološki aditivi Aromax, Aromax Gal, Aromax super i Noxitan dobavljeni su od proizvođača AEB Group (Brescia, Italija).

Standardi

- 3-Sulfanilheksan-1-ol, proizvod je tvrtke Acros Organics (Fair Lawn, NJ, SAD).
- 3-Sulfanilheksil-acetat proizvod je tvrtke Apollo Scientific (Stockport, Velika Britanija).

Instrumenti i pribor

- Plinski kromatograf s automatskim uzorkivačem „GC-2010 Plus” vezan sa spektrometrom masa „QP-2020“ (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Plinski kromatograf s automatskim uzorkivačem „GC-2010 Plus” vezan s tandemnim spektrometrom masa „TQ8050” s trostrukim kvadrupolom (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Plinski kromatograf s automatskim uzorkivačem „Nexis GC-2030” uz detektor kemiluminescencije sumpora serije „SCD-2030“ (Shimadzu, Kyoto, Japan).

- Vezani sustav za sveobuhvatnu plinsku kromatografiju „GC-2010 Plus” i spektrometriju masa „QP-2010 Ultra” (Shimadzu, Kyoto, Japan), opremljen “ZX2” modulatorom (ZOEX, Houston, TX, SAD) i injektorom „OPTIC-4” (GL Sciences, Eindhoven, Nizozemska).
- Spektrometar NMR Avance 300 (Bruker, Karlsruhe, Njemačka).
- Plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa „7890B/5977B” (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD).
- Analitička vaga „360EP” (Precisa, Dietikon, Švicarska).
- Ultrazvučna kupelj „USR 54 H Qualilab” (Merck Eurolab, Bruchsal, Njemačka).
- Rotacijski uparivač „R-100” (Büchi, Flawil, Švicarska).
- UV-lampa „UVL-24” (Analytik Jena, Jena, Njemačka).
- Centrifuga „Rotofix 32” (Hettich & Co., Tuttlingen, Njemačka).
- Vakuumska stanica za ekstrakciju na čvrstoj fazi za dvadeset uzoraka VacElut (Varian, Palo Alto, CA, SAD).
- Držač vlakna za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD).
- Aluminijsko postolje za SPME-bočice (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD).
- Magnetska miješalica „MR3001” (Heidolph, Schwabach, Njemačka).
- Digitalni pH-metar „7110 inoLAB” (Xylem Analytics, Rye Brook, NY, SAD).
- Indikatorske trake za procjenu pH-vrijednosti, raspon pH = 7-14 (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).
- Vlakno za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 2 cm (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD).
- Vlakno za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi 50/30 µm PA, 2 cm (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD).
- SPME-bočice sa PDMS/PTFE septumom (N20, 8mm), 20 mL (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).
- Mikropipete Blaubrand volumena 1-200 µL (Brand & Co., Wertheim, Njemačka).
- Mikroštrcaljke SGE volumena 10 µL (SGE Analytical, Milton Keynes, Velika Britanija).
- Automatizirani uparivač TurboVap II s postoljem za šest uzoraka (Biotage, Uppsala, Švedska).

- Kolonice za ekstrakciju na čvrstoj fazi trgovačkih naziva Mega BE-C18 BondElut (6 mL/1 g), tvrtke Agilent Technologies (Palo Alto, CA, SAD) te Supelclean ENVI-18 (6 mL/ 1 g) tvrtke Supelco Analytical (Bellefonte, PA, SAD).
- Dušik (99,9995 %), helij (99,9995 %), vodik (99,999 %) i kisik (99,999 %) (Messer, Bad Soden, Njemačka).

3.3. Uzorci vina

Modelno vino

Početna istraživanja derivatizacijskih reakcija provedena su u modelnom vinu pripremljenom otapanjem 2 g vinske kiseline u 12 % vodenoj otopini etanola i podešavanjem pH-vrijednosti na 3,2.

Neutralno vino

Neutralno vino, proizvedeno od sorte grožđa Grüner Veltliner za koje je poznato da ne sadrži sorte tiolo, korišteno je za optimiranje reakcija derivatizacije. Dobavljeno je od tvrtke Sonnleiten (Fels am Wagram, Austrija).

Sortna vina

Pokus je postavljen 2018. godine na znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, vinogorje Zagreb, regija Kontinentalna Hrvatska, podregija Prigorje-Bilogora.

Vina su proizvedena preradom grožđa sorte Sauvignon bijeli (*Vitis vinifera*) mase 150 kg. Berba je obavljena ručno, u trenutku tehnološke zrelosti grožđa. Muljanje i runjenje grožđa provedeno je mehaničkom muljačom-runjačom, pri čemu je smrznut reprezentativni uzorak 100 bobica za potrebe određivanja sortnih tiola. Prešanje masulja provedeno je hidrauličnom prešom. Mošt je podijeljen u šest uzoraka u spremnike od inoksa (serija A, B, C, D, E, F) od 20 L za nastavak vinifikacije.

U svaki je uzorak mošta prije taloženja dodano antioksidacijsko enološko sredstvo (**Tablica 3.1**). Primijenjeno je 5 različitih antioksidacijskih preparata: Sumpovin (10 % w/v, $K_2S_2O_5$) u dvije različite doze, Aromax (50 % w/v, $K_2S_2O_5$ i 50 % w/v, L-askorbinska kiselina), Aromax Super (50 % w/v, $K_2S_2O_5$, 35 % w/v, L-askorbinska kiselina, 15 % w/v, elagitanini i proantocijanidin), Aromax Gal (50 % w/v, $K_2S_2O_5$, 35 % w/v, L-askorbinska kiselina, 15 % w/v, galotanin) i Noxitan (50 % w/v, $K_2S_2O_5$ i 50 % w/v, enološki tanin).

Tablica 3.1. Istraženi uzorci eksperimentalnih vina s naznačenim tretmanima

Seriya	Naziv sredstva	Sastav	Doza
A	Sumpovin [®]	$K_2S_2O_5$ (kalijev metabisulfit)	1 mL L ⁻¹ (kontrola)
B	Sumpovin [®]	$K_2S_2O_5$	0,5 mL L ⁻¹
C	Aromax [®]	$K_2S_2O_5$ + askorbinska kiselina	0,2 g L ⁻¹
D	Aromax Super [®]	$K_2S_2O_5$ + askorbinska kiselina + proantocijanidin + elagitanin	0,2 g L ⁻¹
E	Aromax Gal [®]	$K_2S_2O_5$ + askorbinska kiselina + galotanin	0,2 g L ⁻¹
F	Noxitan [®]	$K_2S_2O_5$ + enološki tanin	0,2 g L ⁻¹

Nakon 24 sata taloženja, bistri dio mošta odvojen je od taloga zatvorenim pretokom u staklene posude od 10 L. Nakon odvajanja mošta pokrenuta je alkoholna fermentacija pri 15 °C primjenom selekcioniranog soja kvasca Excellence TXL (*Saccharomyces cerevisiae*) ($\gamma=0,2$ g L⁻¹), u staklenim bocama od 10 L uz dodatak fermentacijskog aktivatora Vitaferment na bazi amonijevih iona i vitamina B₁ ($\gamma=0,3$ g L⁻¹) i prihrane Oenostim na bazi vitamina, elektrolita, masnih kiselina i sterola.

Izuzev eksperimentalnih sortnih vina, sortni tioli analizirani su u komercijalno dostupnim austrijskim vinima sorte Sauvignon bijeli proizvođača Silberberg (Leibnitz, Austrija) koja su se razlikovala prema načinu provođenja berbe te kvascima korištenima u fermentaciji (**Tablica 3.2**).

Tablica 3.2. Komercijalni uzorci vina

Tip vina	Sorta	Lokacija	Godina berbe	Tehnološke karakteristike
Neutralno vino	Grüner Veltliner, Sonnleiten	Fels am Wagram, Štajerska, Austrija	2018	-
Sortno vino	Sauvignon bijeli, Silberberg	Leibnitz, Štajerska, Austrija		Strojno branje, kvasac „x5“
				Ručno branje, kvasac „x5“
			Ručno branje, kvasac „alba“	

3.4. Sinteza deuteriranih unutarnjih standarda

3.4.1. Priprava parcijalno deuteriranog sortnog tiola [$^2\text{H}_{10}$]-3-SH 6

3.4.1.1. Priprava etil-(E)-[3,4,4,5,5,6,6,6- $^2\text{H}_8$]heks-2-enoata 4

U okruglu tikvicu dodaju se suhi diklormetan ($V=20$ mL) i oksalil-klorid ($V=3,31$ mL; $n=40,98$ mmol) te se otopina ohladi na -78 °C. Lijevkom za dokapavanje doda se dimetilsulfoksid ($V=5,82$ mL; $n=81,97$ mmol) te se smjesa miješa magnetskom miješalicom 30 min. Smjesi se doda [$^2\text{H}_{10}$]-butan-1-ol **1** ($V=2,53$ mL; $n=27,12$ mmol) te se miješanje nastavi iduća 2 sata pri -78 °C. Lijevkom za dokapavanje doda se trietilamin ($V=19,04$ mL; $n=136,6$ mmol), reakcijska smjesa se zagrije do sobne temperature te se zatim doda (etoksikarbonilmetilen)trifenilfosforan **3** ($m=10,486$ g; $n=30,06$ mmol). Reakcijska smjesa se miješa magnetskom miješalicom dva dana na sobnoj temperaturi. Smjesa se zatim upari do malog volumena pri sniženom tlaku, doda se *n*-pentan ($V=20$ mL), smjesa se miješa magnetskom miješalicom 30 minuta, filtrira i upari do malog volumena. Koncentrat se pročisti kromatografijom na stupcu [silikagel, ψ (pentan, dietil-eter)=95:5]. Izoliran je etil-(E)-[3,4,4,5,5,6,6,6- $^2\text{H}_8$]-heks-2-enoat **4** ($m=4,33$ g; $\eta=80$ %) kao bezbojno ulje: ^1H NMR (300 MHz; [$^2\text{H}_1$]- CHCl_3) (δ/ppm): 5,80 (s, 1H, CH), 4,18 (q, 2H, $J=7,10$ Hz, CH_2), 1,26 (t, 3H, $J=7,10$ Hz, CH_3).

3.4.1.2. Priprava etil-3-(acetiltio)[3,4,4,5,5,6,6,6-²H₈]heksanoata 5

U okruglu tikvicu stavi se etil-(*E*)-[3,4,4,5,5,6,6,6-²H₈]-heks-2-enoat **4** ($m=4,30$ g; $n=28,6$ mmol), doda se suhi tetrahidrofuran ($V=25$ mL), trietilamin ($V=6,50$ mL; $n=46,6$ mmol) i tiooctena kiselina ($V=4,10$ mL; $n=5,82$ mmol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja tri dana pod argonom. Nakon hlađenja doda se dietil-eter ($V=10$ mL) i klorovodična kiselina (2 mol L⁻¹ HCl, $V=10$ mL) te se zatim reakcijska smjesa ispere zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata ($V=15$ mL). Organski sloj se suši na bezvodnom natrijevu sulfatu, filtrira te upari na mali volumen pri sniženom tlaku. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu [silikagel, ψ (pentan, dietil-eter)= od 95:5 do 90:10]. Izoliran je etil-3-(acetiltio)[3,4,4,5,5,6,6,6-²H₈]heksanoat **5** ($m=4,37$ g; $\eta=67$ %) kao bezbojno ulje: ¹H NMR (300 MHz; [²H₁]-CHCl₃) (δ /ppm): 4,12 (q, 2H, $J=7,10$ Hz, CH₂), 2,90-2,70 (q, 2H, $J=7,40$ Hz, CH₂), 2,26 (s, 3H, SCOCH₃), 1,27 (t, 3H, $J=7,10$ Hz, CH₃).

3.4.1.3. Priprava 3-sulfanil[1,1,3,4,4,5,5,6,6,6-²H₁₀]heksan-1-ola 6

U dvogrlu tikvicu stavi se litijev aluminijev deuterid ($m=0,507$ g; $n=12,4$ mmol), lijevkom za dokapavanje doda se suhi dietil-eter ($V=10$ mL) te se reakcijska smjesa miješa magnetskom miješalicom pri 0 °C pet minuta. Lijevkom za dokapavanje doda se otopina etil-3-(acetiltio)[3,4,4,5,5,6,6,6-²H₈]heksanoata **5** ($m=2,113$ g; $n=9,34$ mmol) u suhom dietil-eteru ($V=10$ mL). Reakcijska smjesa se miješa magnetskom miješalicom pri sobnoj temperaturi tri sata, zatim se doda dietil-eter ($V=10$ mL) i klorovodična kiselina (2 mol L⁻¹ HCl, $V=10$ mL) te se provodi ekstrakcija dietil-eterom ($V=3 \times 10$ mL). Spojene organske frakcije suše se nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriraju i upare pri sniženom tlaku na mali volumen. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu [silikagel, ψ (pentan, dietil-eter)= od 70:30 do 50:50]. Izoliran je 3-sulfanil[1,1,3,4,4,5,5,6,6,6-²H₁₀]heksan-1-ol **6** ($m=0,65$ g, $\eta=51$ %) kao bezbojno ulje: ¹H NMR (300 MHz; [²H₆]-DMSO) (δ /ppm): 1,96-1,62 (dd, 2H, $J_1=6,60$, $J_2=6,20$ Hz, CH₂), 1,76 (s, 1H, SH), 1,37 (s, 1H, OH). Spektar masa m/z ($I/\%$): 144 (30), 109 (32), 91 (31), 76 (100), 60 (78), 50 (47).

3.4.2. Priprava parcijalno deuteriranog sortnog tiola [$^2\text{H}_5$]-3-SHA 11

3.4.2.1. Priprava etil-(*E*)-heks-2-enoata 8

U okruglu tikvicu stavi se suhi diklormetan ($V=25$ mL) te se doda butan-1-al **7** ($V=2,13$ mL; $n=23,56$ mmol) i (etoksikarbonilmetilen)trifenilfosforan **3** ($m=8,40$ g; $n=23,98$ mmol). Reakcijska smjesa se miješa magnetskom miješalicom na sobnoj temperaturi preko noći. Smjesa se zatim upari do malog volumena pri sniženom tlaku. Koncentrat se pročisti kromatografijom na stupcu [silikagel, ψ (pentan, dietil-eter)=95:5]. Izoliran je etil-(*E*)-heks-2-enoat **8** u obliku bezbojnog ulja ($m=3,17$ g; $\eta=69$ %): ^1H NMR (300 MHz; [$^2\text{H}_1$]- CHCl_3) (δ/ppm): 6,65 (dt, 1H, $J_1=15,6$, $J_2=6,8$ Hz, C=OCHCH), 6,07 (d, 1H, $J=15,8$ Hz, C=OCH), 4,24 (q, 2H, $J=7,2$ Hz, OCH₂CH₃), 2,04-1,98 (m, 2H, CH=CHCH₂), 1,42-1,35 (m, 2H, CH₂CH₃), 1,37 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, OCH₂CH₃), 1,04 (t, 3H, $J=7,6$ Hz, CH=CHCH₂CH₂CH₃).

3.4.2.2. Priprava etil-3-(acetiltio)heksanoata 9

U okruglu tikvicu stavi se tiooctena kiselina ($V=3,17$ mL; $n=44,44$ mmol), etil-(*E*)-heks-2-enoat **8** ($m=3,16$ g; $n=19,41$ mmol) i *p*-toluensulfonska kiselina ($m=0,05$ g; $n=0,3$ mmol). Reakcijska smjesa se zagrijava pri 145 °C u atmosferi argona 30 sati. Nakon hlađenja reakcijska smjesa se razrijedi dodatkom dietil-etera ($V=20$ mL) i ispere klorovodičnom kiselinom (2 mol L⁻¹ HCl; $V=10$ mL), neutralizira zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata ($V=15$ mL) i ispere zasićenom otopinom natrijeva klorida. Organski sloj se osuši nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrira i upari do malog volumena pri sniženom tlaku. Koncentrat se pročisti kromatografijom na stupcu [silikagel, ψ (pentan, dietil-eter)= od 95:5 do 90:10]. Izoliran je etil-3-(acetiltio)heksanoat **9** ($m=4,20$ g; $\eta=72$ %) kao blijedožuto ulje: ^1H NMR (300 MHz; [$^2\text{H}_1$]- CHCl_3) (δ/ppm): 4,19 (q, 2H, $J=7,1$ Hz, OCH₂CH₃), 3,84 (m, 1H, SCH), 2,81 (dd, 2H, $J_1=6,7$, $J_2=5,3$ Hz, C=OCH₂CS), 2,40 (s, 3H, SC=OCH₃), 1,97-1,88, (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1,48-1,41 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1,38 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, OCH₂CH₃), 0,99 (t, 3H, $J=7,3$ Hz, CH₂CH₂CH₃).

3.4.2.3. Priprava 3-sulfanil[1,1-²H₂]heksan-1-ola 10

Lijevkom za dokapavanje otopina etil-3-(acetiltio)heksanoata **9** ($m=4,100$ g; $n=18,78$ mmol) u suhom dietil-eteru ($V=20$ mL) doda se suspenziji litijeva aluminijeva deuterida ($m=1,000$ g; $n=24,42$ mmol) u suhom dietil-eteru ($V=20$ mL) te se reakcijska smjesa miješa magnetskom miješalicom pri 0 °C u atmosferi argona 5 minuta. Reakcijska smjesa se zagrije na sobnu temperaturu i miješa magnetskom miješalicom tri sata te se zatim razrijedi dodatkom suhog dietil-etera ($V=10$ mL). Smjesi se doda klorovodična kiselina (2 mol L^{-1} HCl; $V=20$ mL) te se nastavi s miješanjem dok reakcijska smjesa ne postane bistra. Organski sloj se ekstrahira dietil-eterom ($V=3 \times 10$ mL). Ekstrakti se spoje i suše iznad bezvodnog natrijeva sulfata te se otapalo ukloni uparavanjem pri sniženom tlaku. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu [silikagel, $\psi(\text{pentan, dietil-eter})=$ od 70:30 do 50:50]. Izoliran je 3-sulfanil[1,1-²H₂]heksan-1-ol **10** ($m=1,74$ g; $\eta=70$ %) kao bezbojno ulje: ¹H NMR (300 MHz; [²H₁]-CHCl₃) (δ/ppm): 2,85 (m, 1H, SCH), 1,86 (dd, 1H, $J_1=14,2$, $J_2=4,3$ Hz, CD₂CHH), 1,58-1,36 (m, 5H, CHHCH(S)CH₂CH₂CH₃), 0,91 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, CH₂CH₂CH₃).

3.4.2.4. Priprava 3-sulfanil[1,1-²H₂]heksil-[8,8,8-²H₃]acetata 11

U dvogrllu tikvicu stavi se 3-sulfanil[1,1-²H₂]-heksan-1-ol **10** ($m=1,730$ g; $n=12,70$ mmol) i suhi diklormetan ($V=12$ mL) te se lijevkom za dokapavanje doda [²H₃]-acetil-klorid ($V=1,35$ mL; $n=19,04$ mmol). Reakcijska smjesa se miješa magnetskom miješalicom pri sobnoj temperaturi tri sata u atmosferi argona. Zatim se reakcijska smjesa ispere vodom ($V=10$ mL) i vodeni sloj se ekstrahira diklormetanom ($V=2 \times 10$ mL). Spojeni organski ekstrakti se suše iznad bezvodnog natrijeva sulfata i upare do malog volumena pri sniženom tlaku. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu [silikagel, $\psi(\text{pentan, dietil-eter})=$ 80:20]. Izoliran je ciljani produkt 3-sulfanil[1,1-²H₂]heksil-[8,8,8-²H₃]acetat **11** ($m=0,960$ g; $\eta=42$ %) kao bezbojno ulje: ¹H NMR (300 MHz; [²H₆]-DMSO) (δ/ppm): 2,87 (m, 1H, CHSH), 2,01 (dd, 1H, $J_1=14,3$, $J_2=4,5$ Hz, CD₂CHH), 1,71 (dd, 1H, $J_1=14,3$, $J_2=4,5$ Hz, CD₂CHH), 1,56-1,47 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,38 (s, 1H, SH), 0,92 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, CH₂CH₂CH₃). Spektar masa m/z ($I/\%$): 118 (100), 103 (100), 90 (100), 89 (100), 87 (100), 85 (100), 75 (100), 69 (100), 55 (100).

3.5. Plinskokromatografska analiza sortnih tiola u vinu

3.5.1. Priprava standardnih otopina

Ishodne standardne otopine 3-sulfanilheksan-1-ola i 3-sulfanilheksil-acetata masene koncentracije 1 g L^{-1} pripravljene su razrjeđenjem volumena čistih standarda u metanolu. Od ishodnih standardnih otopina pripravljene su otopine masene koncentracije 1 mg L^{-1} u metanolu od kojih su zatim pripravljeni radni standardi razrjeđivanjem alikvota u metanolu. Raspon masenih koncentracija otopina radnih standarda koje su poslužile za izradu baždarnih krivulja prikazan je u **Tablici 3.3**. Otopine deuteriranih izotopomera korištene za izotopno razrjeđenje priređene su otapanjem volumena čistih izotopomera u metanolu te naknadnim razrjeđivanjem. Sve ishodne otopine standarda i izotopomera pohranjene su pri -22 °C te su svježije otopine radnih standarda priređivane neposredno prije rada.

Tablica 3.3. Masene koncentracije radnih standarda sortnih tiola i izotopomera korištene za izradu baždarnih krivulja

Spoj	$\gamma/\text{ng L}^{-1}$
3-SH	0-1000
3-SHA	0-500
$[\text{}^2\text{H}_{10}]$ -3-SH	200
$[\text{}^2\text{H}_5]$ -3-SHA	100

3.5.2. Probni postupak derivatizacije sortnih tiola pentafluorbenzil-bromidom

Probna derivatizacija tiola PFBBr-om provedena je na sljedeći način: u acetonitril ($V=600 \text{ }\mu\text{L}$) su dodani analiti 3-SH ili 3-SHA ($V=2 \text{ }\mu\text{L}$) te zatim PFBBr ($V=100 \text{ }\mu\text{L}$) i trietilamin ($V=100 \text{ }\mu\text{L}$). Reakcijska smjesa miješana je magnetskom miješalicom pri sobnoj temperaturi 15 minuta. U smjesu je dodan etil-acetat ($V=5 \text{ mL}$) i zatim *n*-heksan ($V=5 \text{ mL}$) uz nastanak bijelog taloga trietilamonijeva bromida. Nakon miješanja magnetskom miješalicom pri sobnoj temperaturi 15 minuta, smjesa je isprana klorovodičnom kiselinom ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $V=10 \text{ mL}$).

Organski sloj je odijeljen i sušen iznad bezvodnog natrijeva sulfata te uparen pri sniženom tlaku do 0,5 mL.

Separacija plinskom kromatografijom uz tandemnu spektrometriju masa je provedena uz programirano zagrijavanje kolone od početnih 40 °C (sa zadržavanjem 1 minutu) do 250 °C brzinom od 10 °C min⁻¹, zatim do 310 °C brzinom od 25 °C min⁻¹, te izotermno na 310 °C sljedeću minutu.

Modificirani program programiranog zagrijavanja kolone kojim je skraćeno vrijeme analize bio je sljedeći: od početnih 40 °C (sa zadržavanjem 1 minutu) do 180 °C brzinom od 25 °C min⁻¹, zatim do 230 °C brzinom od 10 °C min⁻¹, zatim do 310 °C brzinom od 25 °C min⁻¹ te izotermno na 310 °C sljedeću minutu.

3.5.3. Probni postupak derivatizacije sortnih tiola etil-propiolatom

Probna derivatizacija tiola ETP-om provedena je na sljedeći način: u metanol ($V=500 \mu\text{L}$) su dodani etil-propiolat ($m=0,1 \text{ g}$, $n=1 \text{ mmol}$) i fosfatni pufer ($\text{pH}=9,0$; $V=9,5 \text{ mL}$) te zatim otopina tiola 3-SH ($m=9,6 \text{ mg}$, $n=0,072 \text{ mmol}$) ili 3-SHA ($m=9,8 \text{ mg}$, $n=0,055 \text{ mmol}$) u metanolu ($V=0,5 \text{ mL}$). Reakcijska smjesa je miješana magnetskom miješalicom 5 minuta pri sobnoj temperaturi te zatim ekstrahirana diklormetanom ($V=2 \times 10 \text{ mL}$). Organski sloj je osušen iznad bezvodnog natrijeva sulfata i uparen pri sniženom tlaku.

Separacija plinskom kromatografijom uz tandemnu spektrometriju masa je provedena uz programirano zagrijavanje kolone od početnih 60 °C (sa zadržavanjem 1 minutu) do 200 °C brzinom od 25 °C min⁻¹, zatim do 250 °C brzinom od 10 °C min⁻¹, zatim do 310 °C brzinom od 25 °C min⁻¹ te izotermno na 310 °C sljedeću minutu.

3.5.4. Postupak derivatizacije etil-propiolatom i ekstrakcije derivatiziranih sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi

U bocu volumena 100 mL dodano je 50 mL vina te je uzorak miješan magnetskom miješalicom 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Mikropipetom su dodane svježe pripravljene otopine unutarnjeg standarda [$^2\text{H}_{10}$]-3-SH i [$^2\text{H}_5$]-3-SHA te sortnih tiola 3-SH i 3-SHA u metanolu. Vinu je dodana otopina etil-propiolata ($c=100 \text{ mmol L}^{-1}$; $V=500 \text{ }\mu\text{L}$ u 1 mL etanola). Nakon miješanja pri 500 okretaja u minuti dvije minute, vino je zalučeno do vrijednosti $\text{pH}=10$ otopinom natrijeva hidroksida ($c=2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$). Miješanje je nastavljeno idućih 10 minuta te je vino zatim centrifugirano relativnom centrifugalnom silom od 1120 g idućih 15 minuta.

Za ekstrakciju na čvrstoj fazi korištene su kolonice Mega BE-C18 BondElut (6 mL/1 g) i Supelclean ENVI-18 (6 mL/1 g). Sorbens je kondicioniran ispiranjem s 10 mL metanola i 10 mL vode, a zatim je na njega nanesen uzorak centrifugiranog vina. Sorbens je zatim ispran s 5 mL vode i sušena pri sniženom tlaku 15 minuta. Derivati analita su eluirani sa sorbensa s 10 mL etil-acetata ili diklormetana. Eluat je sušen iznad bezvodnog natrijeva sulfata i uparen do volumena 0,5 mL primjenom automatskog uparivača.

3.5.5. Postupak mikroekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi iz para iznad otopine

Za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi iz para iznad otopine korištena su vlakna s dvije vrste sorbensa: DVB/CAR/PDMS StableFlex (50/30 μm , 2 cm) i PA (50/30 μm , 2 cm). Vlakna su prije ekstrakcije kondicionirana. Uzorak vina ($V=10 \text{ mL}$) i magnezijeva sulfata heptahidrata ($m=2 \text{ g}$) prenesen je u bočicu za ekstrakciju para iznad otopina volumena 20 mL. Uzorak je zalučeno otopinom natrijeva hidroksida ($c=1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$) do pH -vrijednosti 7,0 nakon čega je mikropipetom dodano 10 μL otopine unutarnjeg standarda [$^2\text{H}_{10}$]-3-SH ($\gamma=200 \text{ ng L}^{-1}$) i [$^2\text{H}_5$]-3-SHA ($\gamma=100 \text{ ng L}^{-1}$) te 10 μL otopine sortnih tiola različitih masenih koncentracija. Posudica je zatvorena čepom od PDMS/PTFE-septuma. Nakon 5 minuta uravnotežavanja otopine na 40 °C uz miješanje na magnetskoj miješalici brzinom od 600 okretaja u minuti, SPME-vlakno je injektirano kroz PTFE-septum i izloženo parama iznad otopine uzorka. Nakon 30 minuta, vlakno je injektirano u injektor plinskog kromatografa.

3.5.6. Postupak mikroekstrakcije ETP-derivata sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi iz para iznad otopine

Za mikroekstrakciju derivata na čvrstoj fazi iz para iznad otopine korištena su vlakna sa sorbentom DVB/CAR/PDMS StableFlex (50/30 μm , 2 cm). Vlakna su prije ekstrakcije kondicionirana. Mikroekstrakcija je obavljena na način da je eluat ($V=10$ mL) pripremljen ekstrakcijom na čvrstoj fazi (opisano u poglavlju 3.5.4) prenesen u bočicu za ekstrakciju iz para iznad otopine volumena 20 mL te uparen do suha u struji dušika. Suhom ostatku su zatim dodani voda ($V=10$ mL) i natrijev klorid ($m=2$ g). Posudica je zatvorena čepom od PDMS/PTFE-septuma. Nakon 5 minuta uravnotežavanja otopine na 80 °C uz miješanje na magnetskoj miješalici brzinom od 600 okretaja u minuti, SPME-vlakno je injektirano kroz PTFE-septum i izloženo parama iznad otopine uzorka. Nakon 30 minuta, vlakno je injektirano u injektor plinskog kromatografa.

3.5.7. Analiza sortnih tiola plinskom kromatografijom uz detekciju tandemnom spektrometrijom masa s trostrukim kvadrupolom

Ekstrakt ETP-derivata sortnih tiola u etil-acetatu pripremljen nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi te ukoncentriran do 0,5 mL analiziran je plinskom kromatografijom uz detekciju tandemnim spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom na koloni Rxi-5MS (**Tablica 3.4**).

Tablica 3.4. Radni uvjeti plinskokromatografske analize ETP-derivata sortnih tiola uz detekciju analita tandemnom spektrometrijom masa

Instrument	GC-2010 plus, TQ8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolona	Rxi-5 MS (Restek, Bellefonte, PA, SAD)
<ul style="list-style-type: none"> • Nepokretna faza 	umreženi poli(5 % difenil - 95 % dimetilsiloksan)
<ul style="list-style-type: none"> • Duljina kolone 	30 m
<ul style="list-style-type: none"> • Unutarnji promjer kolone 	0,25 mm
<ul style="list-style-type: none"> • Debljina filma nepokretne faze 	0,25 μm

Tablica 3.4. (Nastavak)	
Temperaturni program kolone	programirano zagrijavanje kolone od početnih 60 °C (sa zadržavanjem 1 minutu) do 275 °C brzinom od 10 °C min ⁻¹ , zatim do 310 °C brzinom od 25 °C min ⁻¹ , te izotermno na 310 °C sljedeće 3 minute
Temperatura injektora	220 °C
Injektirani volumen	1 µL
Tehnika injektiranja	Izravno unošenje
Pokretna faza, protok	Helij, 1,20 mL min ⁻¹
Vrijeme odgode otapala “ <i>solvent delay time</i> ”	7 min
Temperatura međuspoja plinskog kromatografa i spektrometra masa	270 °C
Temperatura ionskog izvora	200 °C
Raspon masa, <i>m/z</i>	50-350
Brzina snimanja spektara masa	0,3 s ⁻¹
Način ionizacije	Strujom elektrona (10 µA), energije 70 eV
Napon detektora	1,7 kV
Detekcija spojeva	SIM, MRM
Rezolucija kvadrupola	Q1: visoka; Q3:visoka

3.5.8. Analiza sortnih tiola plinskom kromatografijom uz detektor kemiluminescencije sumpora

Sortni tioli su analizirani plinskom kromatografijom uz detektor kemiluminescencije sumpora na koloni Rtx-5MS (**Tablica 3.5**). Analiti su ekstrahirani izravno iz vina, bez provođenja derivatizacije, primjenom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine.

Tablica 3.5. Radni uvjeti plinskokromatografske analize sortnih tiola uz detektor kemiluminescencije sumpora

Instrument	Nexis GC-2030, SCD-2030 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolona	Rtx-5MS (Restek, Bellefonte, PA, SAD)
<ul style="list-style-type: none"> nepokretna faza 	umreženi poli(5 % difenil - 95 % dimetilsiloksan)
<ul style="list-style-type: none"> duljina kolone 	30 m
<ul style="list-style-type: none"> promjer kolone 	0,25 mm
<ul style="list-style-type: none"> debljina nepokretne faze 	1 μm
Pokretna faza, protok	Helij, 1 mL min ⁻¹
Make-up plin, protok	Dušik, 10 mL min ⁻¹
Temperatura injektora	250 °C
Temperaturni program kolone	programirano zagrijavanje kolone od početnih 35 °C (sa zadržavanjem 1 minutu) do 250 °C brzinom od 8 °C min ⁻¹ , zatim do 280 °C brzinom od 20 °C min ⁻¹ , te izotermno na 280 °C sljedeće 2 minute
Volumen injektiranja	1 μL
Tehnika injektiranja	Izravno unošenje
Temperatura detektora	850 °C
Reakcijski plin, protok	Ozon generiran <i>in situ</i> , 30 mL min ⁻¹
Reakcijski plin, protok	Vodik, 40 mL min ⁻¹
Tlak generatora ozona	51,2 kPa

3.5.9. Analiza sortnih tiola sveobuhvatnom plinskom kromatografijom uz detekciju spektrometrijom masa

Eluat derivata sortnih tiola u etil-acetatu dobiven nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi i ukoncentriran do 0,5 mL analiziran je sveobuhvatnom plinskom kromatografijom uz detekciju spektrometrom masa na koloni Rxi-1HT (1D) i Rtx-200 (2D) (**Tablica 3.6**). Rezultati su obrađeni programom ChromSquare 2.4 (Chromaleont, Messina, Italija).

Tablica 3.6. Radni uvjeti sveobuhvatne plinskokromatografske analize sortnih tiola uz detekciju analita spektrometrijom masa

Instrument	GC-QP2010 Plus-Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolona (1D)	Rxi-1HT (Restek, Bellefonte, PA, SAD)
• nepokretna faza	polidimetilsiloksan
• duljina kolone	30 m
• promjer kolone	0,25 mm
• debljina nepokretne faze	0,25 μm
Kolona (2D)	Rtx-200 (Restek, Bellefonte, PA, SAD)
• nepokretna faza	umreženi poli(trifluorpropilmetil)siloksan
• duljina kolone	2 m
• promjer kolone	0,15 mm
• debljina filma nepokretne faze	0,15 μm
Pokretna faza, protok	Helij, 1,01 mL min ⁻¹
Make-up plin, protok	Dušik, 9 mL min ⁻¹
Temperatura injektora	220 °C
Temperatura detektora	250 °C
Temperaturni program kolone	programirano zagrijavanje kolone od početnih 60 °C (sa zadržavanjem 1 minutu) do 220 °C brzinom od 5 °C min ⁻¹ , zatim do 290 °C brzinom od 25 °C min ⁻¹

Tablica 3.6. (Nastavak)

Volumen injektiranog uzorka	1 μL
Tehnika injektiranja	Izravno unošenje
Insert	Stakleni OPTIC, 0,7 mm
Raspon masa, m/z	35-350
Detekcija spojeva	SIM
Frekvencija modulacije	3 s^{-1}
Temperatura modulatora	280 $^{\circ}\text{C}$
Trajanje pulsa	0,35 s

3.5.10. Određivanje aromatskog profila uzoraka eksperimentalnih vina

Radi utvrđivanja aromatskog profila vina i grupiranja vina na temelju sličnosti, uzorak vina ($V=1$ mL) prenesen je u bočicu za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi iz para iznad otopine volumena 20 mL prethodno propuhanu dušikom. Hlapljive komponente arome ekstrahirane su primjenom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pri 40 $^{\circ}\text{C}$, u trajanju od 30 minuta te analizirane vezanim sustavom plinski kromatograf – spektrometar masa na koloni Rxi-5MS (**Tablica 3.7**).

Tablica 3.7. Radni uvjeti plinskokromatografske analize hlapljivih spojeva uz detekciju spektrometrijom masa

Instrument	GC-2010 Plus, MS-QP2020 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolona	Rxi-5MS (Restek, Bellefonte, PA, SAD)
<ul style="list-style-type: none"> Nepokretna faza 	umreženi poli(5 % difenil - 95 % dimetilsiloksan)
<ul style="list-style-type: none"> Duljina kolone 	30 m
<ul style="list-style-type: none"> Unutarnji promjer kolone 	0,25 mm
<ul style="list-style-type: none"> Debljina filma nepokretne faze 	1 μm

Tablica 3.7. (Nastavak)	
Temperaturni program kolone	programirano zagrijavanje kolone od početnih 30 °C (sa zadržavanjem 1 minutu) do 240 °C brzinom od 5 °C min ⁻¹ , zatim do 290 °C brzinom od 20 °C min ⁻¹ , te izotermno na 290 °C sljedeću minutu
Temperatura injektora	270 °C
Pokretna faza, protok	Helij, 11,7 mL min ⁻¹
Temperatura međuspoja plinskog kromatografa i spektrometra masa	270 °C
Temperatura ionskog izvora	200 °C
Tehnika injektiranja	Izravno unošenje
Način ionizacije	Strujom elektrona (10 µA), energije 70 eV
Raspon masa, <i>m/z</i>	35-350
Brzina snimanja spektara masa	3,33 s ⁻¹
Detekcija spojeva	Cjelokupan spektar (<i>Full scan</i>)
Vrijednosti <i>m/z</i> prema kojima su bilježeni ioni	Prema unaprijed definiranoj bazi podataka fragmentnih iona

3.6. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata napravljena je pomoću programa MS Office Excel (Microsoft, Redmond, WA, SAD). Rezultati utjecaja antioksidansa na aromatski profil vina obrađeni su programom Unscrambler 9.7 (CAMO A/S, Trondheim, Norveška). Napravljena je analiza varijance i analiza glavnih komponenti (**engl.** *Principal Component Analysis*, PCA) kako bi se utvrdili klasteri zapažanja i otkrila odstupanja. Regresijskom analizom istražena je korelacija dodatka antioksidansa i zastupljenosti tiola u eksperimentalnim uzorcima vina.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U okviru ovog rada razvijene su metode kvalitativne i kvantitativne analize sortnih tiola koji su ključne komponente arome vina sorte Sauvignon bijeli. Analizirana su eksperimentalna vina proizvedena od sorte Sauvignon bijeli na pokušalištu Jazbina i komercijalna austrijska vina dobivena od iste sorte. Analize su provedene plinskom kromatografijom uz detekciju tandemnom spektrometrijom masa ili detektorom kemiluminescencije sumpora te sveobuhvatnom plinskom kromatografijom uz spektrometar masa kao detektor. Kalibracija je provedena primjenom dodatka standarda i izotopnim razrjeđenjem deuteriranim izotopomerima sortnih tiola.

Validacija metode obuhvatila je optimiranje plinskokromatografskih uvjeta: određivanje linearnosti odziva detektora, granice detekcije i granice određivanja pojedinačnih analita, njihovog analitičkog povrata te preciznosti i točnosti analitičkih rezultata.

Optimiranje metode uključivalo je probir uvjeta derivatizacije i ekstrakcije na čvrstoj fazi: primjenom dvaju derivatizacijskih reagensa, primjenom različitih baza prilikom reakcije derivatizacije, primjenom različitih aditiva i postupaka kojima bi se spriječila degradacija analita, istraživanjem trajanja reakcije derivatizacije te primjenom različitih otapala za eluiranje derivata sa sorbensa za ekstrakciju na čvrstoj fazi. Svi istraživani analiti eluirani su sa sorbensa u prvoj frakciji, a interferirajući spojevi zaostali su na sorbensu. Optimirani su i uvjeti za praćenje višestrukih reakcija što je uključivalo pronalazak prikladnih fragmentacijskih prijelaza fragmentnih iona tiola i prikladne energije fragmentacije pri kojima je osjetljivost detekcije spektrometrijom masa bila najbolja.

Uspoređena je djelotvornost mikroekstrakcije sortnih tiola na čvrstoj fazi iz para iznad otopine ekstrakcijom analita iz vina bez provedbe derivatizacije, zatim iz eluata nakon derivatizacije i ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE i HS-SPME) te iz ekstrakta nakon derivatizacije i ekstrakcije tekuće-tekuće (LLE i HS-SPME).

4.1. Sinteza deuteriranih unutarnjih standarda

Sinteza deuteriranih izotopomera sortnih tiola korištenih za izotopno razrjeđenje provedena je prema objavljenim postupcima^{147,371} uz modifikacije. Priprava deuteriranog izotopomera [²H₁₀]-3-SH **6** (Dodatak, **Slika 8.1**) provedena je klasičnom Swernovom oksidacijom koja je katalizirana trietilaminom i uključuje reakciju perdeuteriranog butan-1-ola **1** s oksalil-kloridom, koji prethodno formira reaktivni dimetilklorsulfonijev klorid s dimetilsulfoksidom pri niskoj temperaturi. Aldehidni međuprodukt **2** nije izoliran, već je neposredno provedena Wittigova reakcija s (etoksikarbonilmetilen)trifenilfosforanom **3** u diklormetanu te je izoliran etilni ester **4**. U sljedećem koraku, provedena je adicija tiooctene kiseline u tetrahidrofuranu katalizirana trietilaminom čime je dobiven tioacetat **5** u dobrom iskorištenju. U posljednjem su koraku tioacetat i etilni ester u spoju **5** prevedeni u sulfanilnu odnosno hidroksilnu skupinu redukcijom litijevim aluminijskim deuteridom suspendiranim u suhom dietil-eteru te je dobiven unutarnji standard [²H₁₀]-3-sulfanilheksan-1-ol **6** uz ukupno iskorištenje reakcijskog postupka od 15 %.

Struktura spoja **6** potvrđena je spektroskopskim tehnikama (Dodatak, **Slika 8.2**). Visok stupanj izotopne supstitucije otežava karakterizaciju spojeva isključivo spektroskopijom ¹H NMR. Međutim, u spektru ¹H NMR spoja **6** otopljenog u perdeuteriranom dimetilsulfoksidu mogu se uočiti karakteristični singleti protona sulfhidrilne skupine pri 1,76 ppm te hidroksilne skupine pri 1,37 ppm. U spektru se pojavljuje još dublet dubleta između 1,96 ppm i 1,62 ppm koji odgovara metilenskim protonima. Karakterizacijom vezanim sustavom plinski kromatograf-spektrometar masa za spoj **6** utvrđeno je prikladno vrijeme zadržavanja uz fragmentacijski uzorak u spektru masa koji odgovara rezultatima objavljenima u ranijoj literaturi.¹⁴⁷ Signali fragmentnih iona odgovaraju prirodnoj distribuciji izotopa sumpora i potvrđuju stupanj obogaćenja deuterijem. Najistaknutiji fragmentni ioni zabilježeni su pri *m/z* 144,2 (molekulski ion), zatim *m/z* 109,2 koji ne odgovara gubitku sumporovodika *m/z* 34, već gubitku sulfhidrilnog radikala *m/z* 33, karakterističnom³⁷² za sekundarne alifatske tiole. Signal pri *m/z* 76,1 odgovara gubitku skupine -CD₂OH (Dodatak, **Slika 8.3**).

Deuterirani izotopomer [²H₅]-3-SHA **11** pripremljen je postupkom koji je uključivao Wittigovu reakciju butan-1-ala **7** s (etoksikarbonilmetilen)trifenilfosforanom **3** na ranije

opisan način (Dodatak, **Slika 8.4**). U pripravljeni β -nezasićeni etilni ester **8** uvedena je tioacetatna skupina Michaelovom adicijom tiooctene kiseline uz dodatak katalitičke količine *p*-toluensulfonske kiseline. Redukcijom tioacetatne i esterske skupine tioacetata **9** litijevim aluminijskim deuteridom pripravljen je produkt **10** obogaćen s dva atoma deuterija, te je u posljednjem koraku provedeno acetiliranje [$^2\text{H}_3$]-acetil-kloridom u diklormetanu i uvedena su tri dodatna atoma deuterija. Željeni izotopomer 3-sulfanil[1,1- $^2\text{H}_2$]heksil-[8,8,8- $^2\text{H}_3$]acetat **11** pripravljen je uz ukupno iskorištenje reakcijskog postupka od 26 %.

Spektroskopijom ^1H NMR i spektrometrijom masa potvrđena je struktura spoja **11** (Dodatak, **Slika 8.5** i **8.6**). U spektru ^1H NMR može se pri 2,87 ppm uočiti slabo razlučen multiplet protona metilenske skupine susjedne sulfhidrilnoj skupini, dva dubleta dubleta pri 2,01 ppm odnosno 1,71 ppm koji odgovaraju protonima metilenske skupine susjedne deuteriranoj metilenskoj skupini u alkilnom lancu, još jedan multiplet u području od 1,56 ppm do 1,47 ppm koji potječe od četiri protona metilenskih skupina heksilnog lanca, singlet protona sulfhidrilne skupine pri 1,38 ppm te konačno triplet pri 0,92 ppm koji odgovara protonima terminalne metilne skupine heksilnog lanca. Karakterizacijom vezanim sustavom plinski kromatograf-spektrometar masa za spoj **11** utvrđeno je prikladno vrijeme zadržavanja uz fragmentacijski uzorak u spektru masa koji odgovara rezultatima objavljenima u ranijoj literaturi.³⁷¹ Signali fragmentnih iona odgovaraju prirodnoj distribuciji izotopa sumpora. Signal koji odgovara molekulskom ionu nije uočen, dok je zabilježen karakterističan signal pri m/z 135, koji odgovara gubitku acilne skupine $\text{CD}_3\text{C}(=\text{O})-$, m/z 103 koji odgovara dodatnoj fragmentaciji skupine $-\text{CD}_2\text{O}-$ te m/z 69 koji odgovara gubitku sulfhidrilnog radikala iz sekundarnog tiola. Zabilježen je i signal pri m/z 118 koji odgovara mogućem gubitku acetilne skupine $\text{CD}_3\text{COO}-$ iz tiola **11** odnosno pri m/z 85 koji odgovara naknadnom gubitku sulfhidril-radikala u sljedećem koraku.

4.2. Optimiranje derivatizacije i ekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi

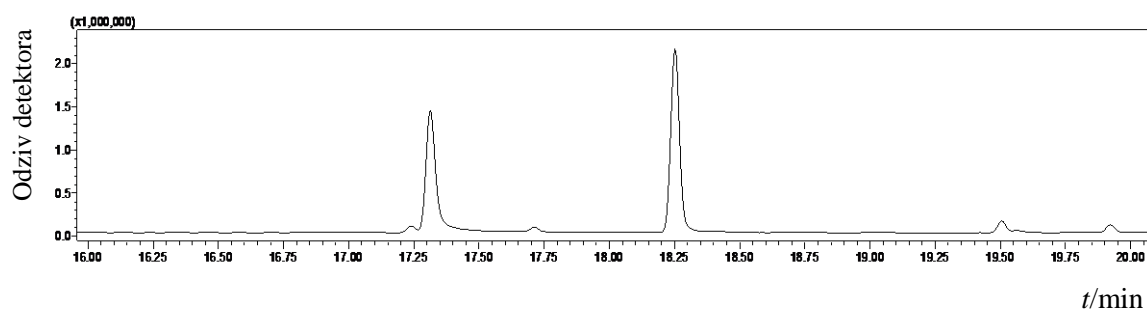
Svi eksperimenti optimiranja ekstrakcije sortnih tiola na čvrstoj fazi provedeni su s malim volumenom organskog otapala, modelnim vinom i neutralnim vinom u koje je dodana poznata masena koncentracija 3-SH, 3-SHA i njihovih izotopomera. Radi izbora

derivatizacijskog reagensa najprije su istražene reakcije s nerazrijeđenim standardima u malom volumenu prikladnog otapala, a zatim u 50 mL modelnog i neutralnog vina. Ostali koraci optimiranja provedeni su u istom volumenu modelnog i neutralnog vina. Nakon ekstrakcije provedena je plinskromatografska analiza uzoraka uz radne uvjete opisane u poglavlju 3.5.7 ili posebno naznačene uvjete. Istražena je ovisnost djelotvornosti ekstrakcije sortnih tiola iz vina o vrsti derivatizacijskog reagensa, bazama korištenim prilikom reakcije derivatizacije, trajanju reakcije derivatizacije, dodatku aditiva prilikom derivatizacije te vrsti i volumenu otapala za eluiranje derivata sa sorbensa za ekstrakciju.

4.2.1. Izbor derivatizacijskog reagensa

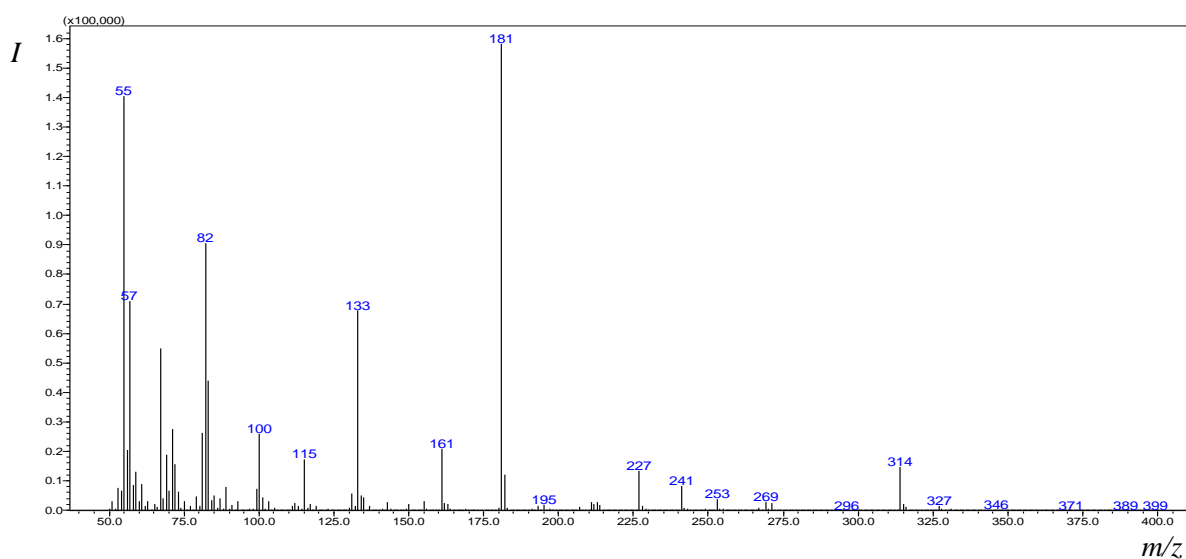
Ishod derivatizacije testiran je primjenom dvaju različitih derivatizacijskih reagensa, 2,3,4,5,6-pentafluorbenzil-bromida i etil-propiolata. Svi kromatogrami i spektri masa snimljeni su na instrumentu GC-2010 plus na koloni Rxi-5MS uz tandemni spektrometar masa TQ-8050 (poglavlje 3.5.7).

Ukoncentrirani ekstrakt derivata sortnih tiola s PFBBr-om pripremljen prema opisu u poglavlju 3.5.2 je injektiran u plinski kromatograf. Signali derivata opaženi su pri $t_R = 17,32$ min (3-SH-PFBBr) odnosno $t_R = 18,25$ min (3-SHA-PFBBr). Nakon derivatizacije pojedinačnih sortnih tiola PFBBr-om, isti je postupak proveden sa smjesom sortnih tiola u modelnom vinu, uz iste uvjete plinskromatografske separacije (Slika 4.1).

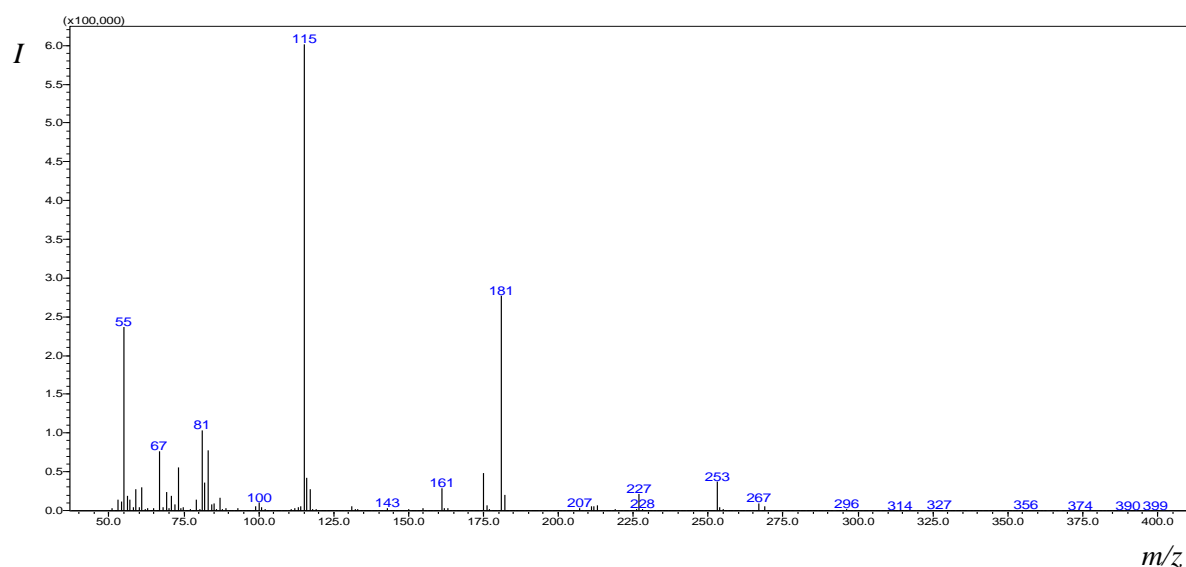


Slika 4.1. GC-MS/MS-kromatogram derivata sortnih tiola s PFBBr-om ekstrahiranih iz modelnog vina

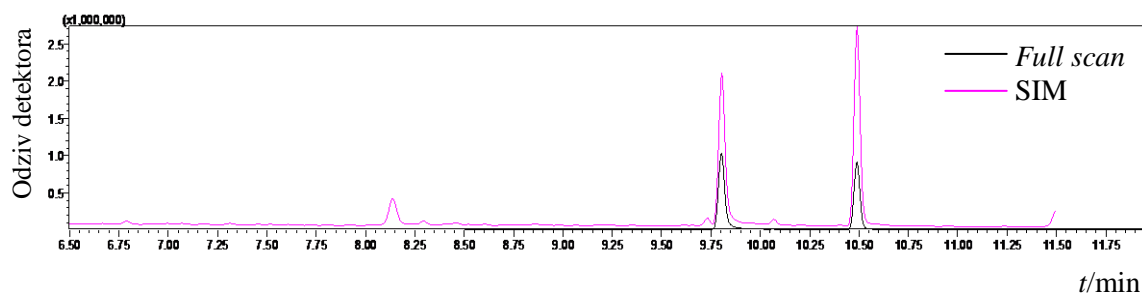
Na temelju spektara masa derivata (**Slika 4.2** i **4.3**) razvijena je SIM-metoda detekcije sortnih tiola praćenjem odabranih fragmentnih iona vrijednosti m/z : 314, 181, 133 i 55 za derivat 3-SH-PFBBr, te vrijednosti m/z : 253, 181, 115 i 55 za derivat 3-SHA-PFBBr. Plinskromatografska separacija derivatiziranih tiola je provedena uz modificirano programirano zagrijavanje kolone (poglavlje **3.5.2**). Tako je skraćeno trajanje analize uz vrijednosti vremena zadržavanja $t_R=9,81$ min za derivat 3-SH-PFBBr i $t_R=10,49$ min za derivat 3-SHA-PFBBr (**Slika 4.4** i Dodatak, **Slika 8.7**).



Slika 4.2. Spektar masa derivata 3-SH-PFBBr



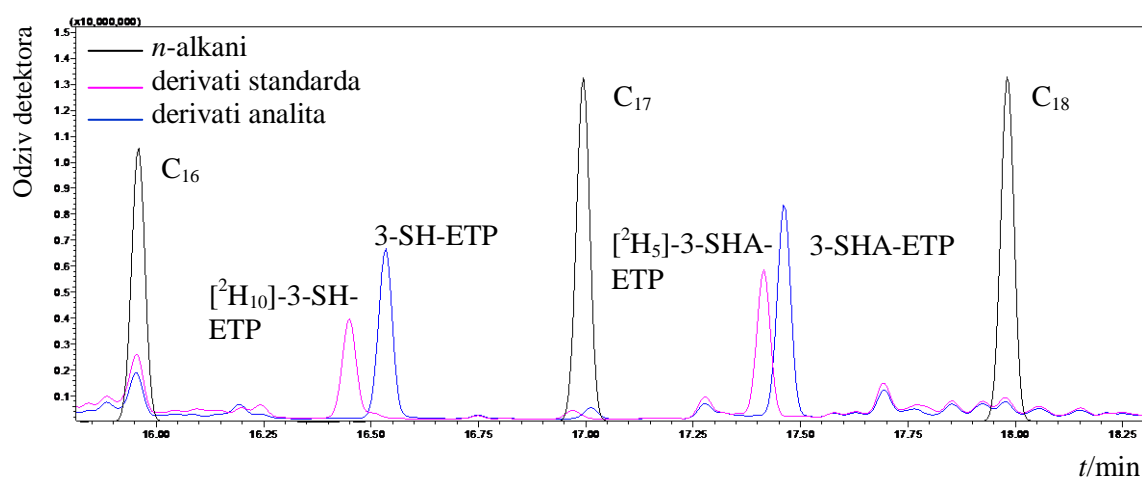
Slika 4.3. Spektar masa derivata 3-SHA-PFBBr



Slika 4.4. GC-MS/MS-kromatogram derivata sortnih tiola s PFBBr-om ekstrahiranih iz modelnog vina

U daljnjim je pokusima modelno vino zamijenjeno neutralnim vinom. Međutim, nakon provedbe derivatizacije dodanih tiola PFBBr-om, signali derivata nisu detektirani u *full scan*- (Dodatak, **Slika 8.8**) i SIM-kromatogramima te ovaj reagens nije korišten za daljnji razvoj metode.

Nakon provedbe derivatizacije ETP-om, od ukoncentriranih otopina koje su sadržavale derivat pojedinog sortnog tiola (postupak pripreve opisan u poglavlju **3.5.3**) pripravljene su otopine masene koncentracije 10 mg L^{-1} razrjeđenjem u *n*-heksanu. Otopine volumena $1 \mu\text{L}$ injektirane su u plinski kromatograf i analizirane tehnikom *full scan*. Signal derivata 3-SHA-ETP zabilježen je pri $t_R = 17,45 \text{ min}$, dok je signal derivata 3-SH-ETP zabilježen pri $t_R = 16,52 \text{ min}$ (**Slika 4.5**).



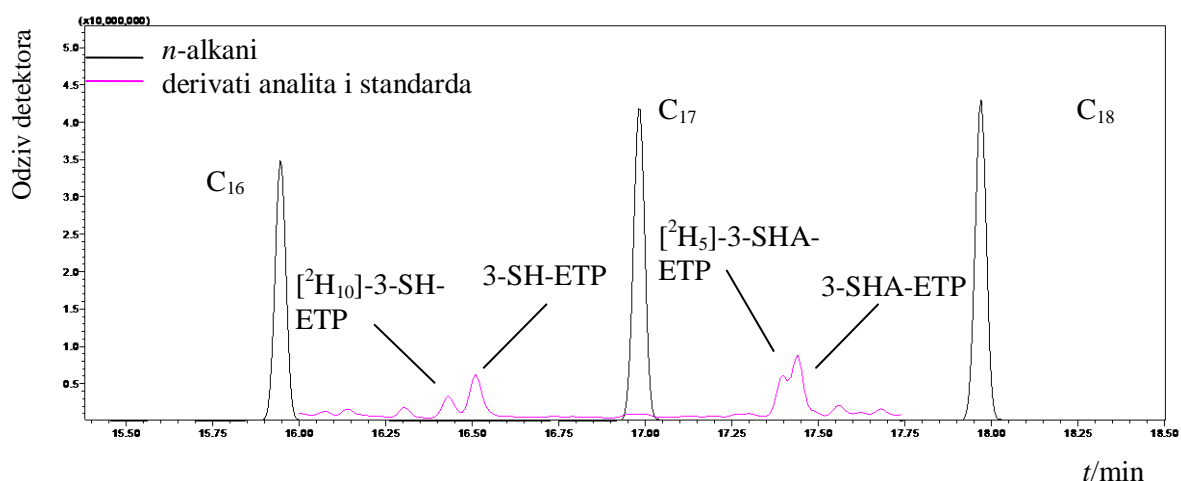
Slika 4.5. GC-MS/MS-kromatogrami *n*-alkana (C_{16} - C_{18}), ETP-derivata sortnih tiola i derivata unutarnjih standarda. Masene koncentracije svih spojeva $\gamma = 10 \text{ mg L}^{-1}$

Uz vremena zadržavanja, određeni su indeksi zadržavanja sortnih tiola usporedbom vremena zadržavanja analita s vremenima zadržavanja *n*-alkana (C₁₂-C₂₀), masenih koncentracija pojedinačnih alkana $\gamma=10 \text{ mg L}^{-1}$. Vremena zadržavanja i indeksi zadržavanja derivata sortnih tiola i derivata deuteriranih izotopomera navedeni su u **Tablici 4.1**.

Tablica 4.1. Vremena zadržavanja i indeksi zadržavanja ETP-derivata sortnih tiola i derivata deuteriranih izotopomera na koloni Rxi-5MS uz uvjete opisane u poglavlju 3.5.7

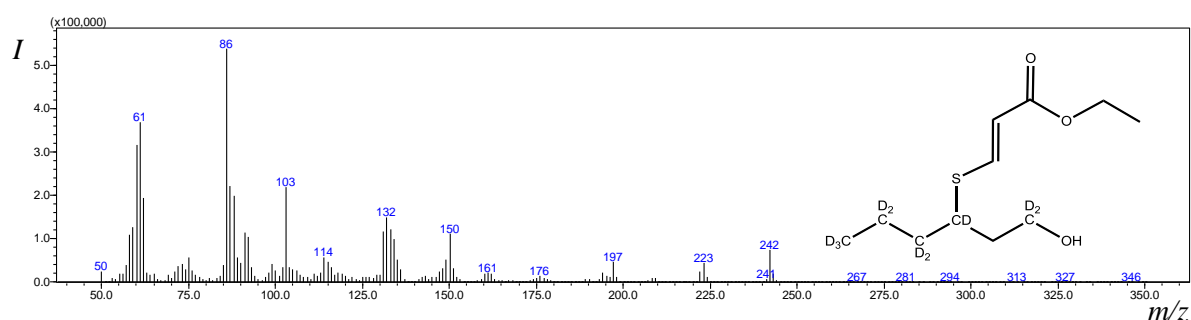
Spoj	t_R / min	<i>RI</i>
3-SH-ETP	16,52	1854
[² H ₁₀]-3-SH-ETP	16,45	1847
3-SHA-ETP	17,45	1946
[² H ₅]-3-SHA-ETP	17,41	1942

Sortni tioli 3-SH i 3-SHA zatim su derivatizirani ETP-om istovremeno, u malom volumenu otapala. Otopina masene koncentracije 2 mg L^{-1} pripravljena je razrjeđenjem koncentriranog organskog ekstrakta metanolom te analizirana sustavom GC-MS/MS uz tehniku *full scan* (Slika 4.6).

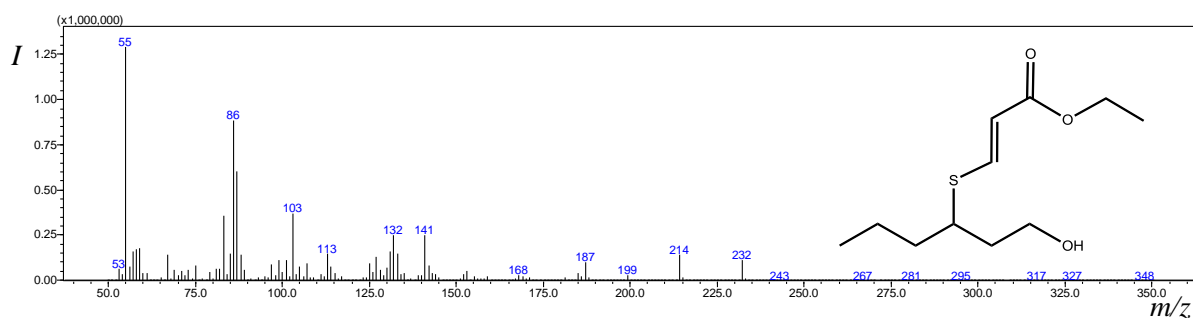


Slika 4.6. GC-MS/MS-kromatogrami *n*-alkana i smjese derivata sortnih tiola i unutarnjih standarda. Masene koncentracije *n*-alkana $\gamma= 10 \text{ mg L}^{-1}$, masene koncentracije tiola i unutarnjih standarda $\gamma= 2 \text{ mg L}^{-1}$

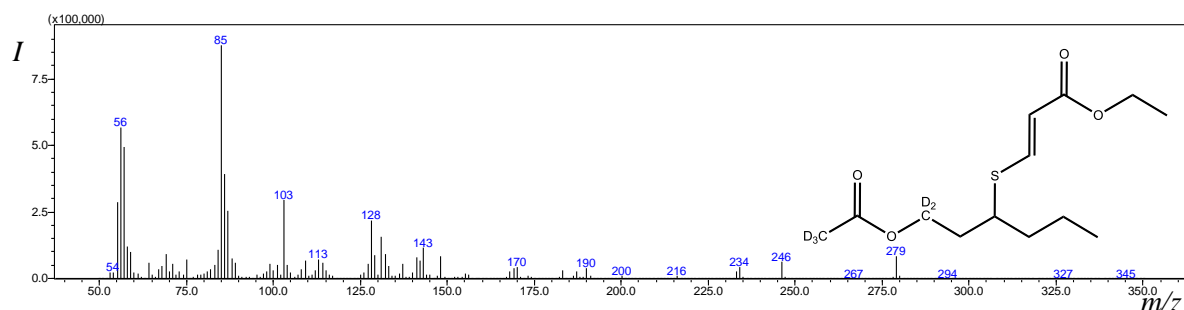
Na temelju spektara masa derivata (**Slike 4.7-4.10**) razvijena je metoda detekcije analiziranih spojeva praćenjem odabranih fragmentnih iona vrijednosti m/z : 232, 214, 187, 141, 132, 103, 86 i 55 za derivat 3-SH-ETP, te vrijednosti m/z : 274, 241, 168, 141, 127, 103, 83 i 55 za derivat 3-SHA-ETP.



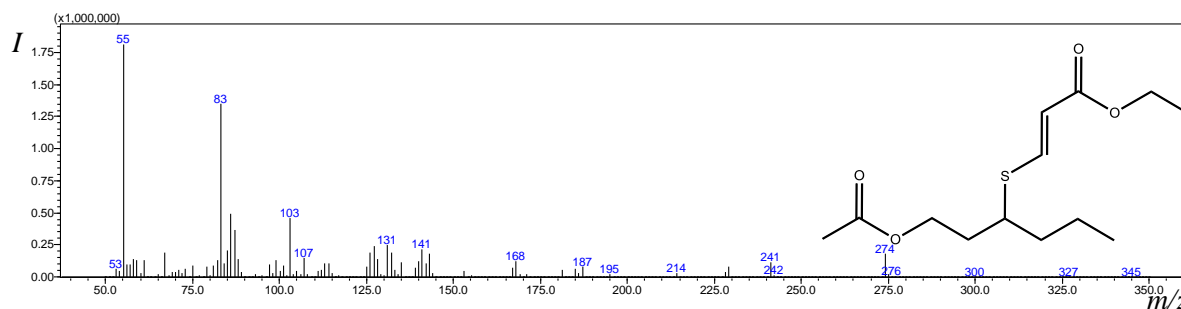
Slika 4.7. Spektar masa derivata unutarnjeg standarda $[^2\text{H}_{10}]$ -3-SH-ETP. Vrijednosti m/z fragmentnih iona korištene u analizi tehnikom SIM: 242, 223, 197, 150, 132, 114, 86, 51



Slika 4.8. Spektar masa derivata 3-SH-ETP. Vrijednosti m/z fragmentnih iona korištene u analizi tehnikom SIM: 232, 214, 187, 141, 132, 103, 86, 55

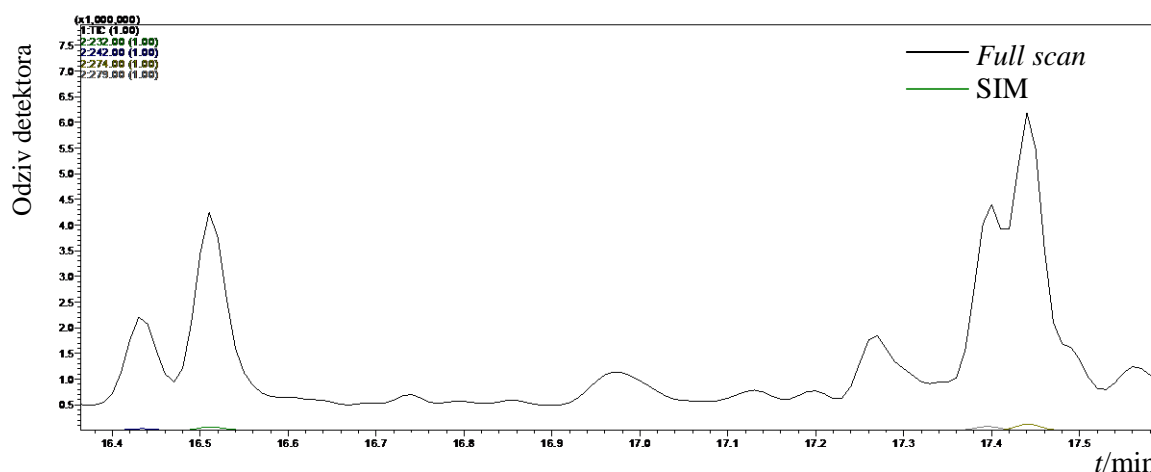


Slika 4.9. Spektar masa derivata unutarnjeg standarda $[^2\text{H}_5]$ -3-SHA-ETP. Vrijednosti m/z fragmentnih iona korištene u analizi tehnikom SIM: 279, 246, 190, 142, 125, 112, 85, 56

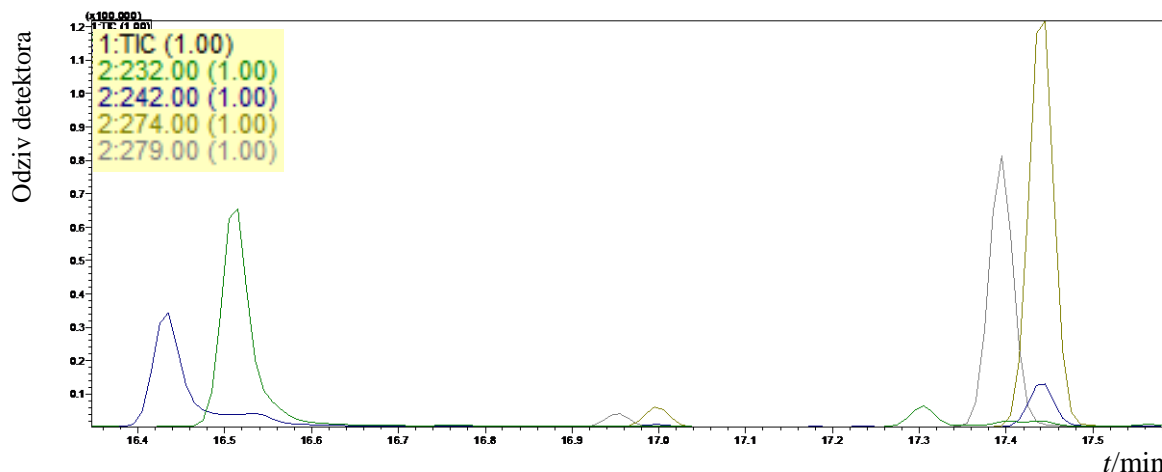


Slika 4.10. Spektar masa derivata 3-SHA-ETP. Vrijednosti m/z fragmentnih iona korištene u analizi tehnikom SIM: 274, 241, 168, 141, 127, 103, 83, 55

Derivatizacijom sortnih tiola u smjesi s deuteriranim izotopomerima ne postiže se potpuno razdvajanje derivata 3-SHA-ETP i $[^2\text{H}_5]$ -3-SHA-ETP (**Slika 4.11**). Snimanjem GC-MS/MS kromatograma tehnikom SIM postiže se dobro razdvajanje svih analita zbog različitih vrijednosti m/z pri kojima su fragmentni ioni detektirani (**Slika 4.12**) uz povećanu osjetljivost mjerenja i smanjenje interferencija. Vrijednosti m/z odabranih fragmentnih iona naznačene su unutar kromatograma.



Slika 4.11. GC-MS/MS-kromatogram smjese ETP-derivata analita i unutarnjih standarda ekstrahiranih iz neutralnog vina. U SIM-kromatogramu signali fragmentnih iona jedva zamjetni pri apscisi. Masene koncentracije derivata $\gamma = 2 \mu\text{g L}^{-1}$



Slika 4.12. Uvećanje SIM-kromatograma prikazanog na Slici 4.11

Zatim je provedena derivatizacija etil-propiolatom u modelnom vinu ($V=50$ mL) obogaćenom s $2 \mu\text{g L}^{-1}$ sortnih tiola 3-SH i 3-SHA prema postupku opisanom u poglavlju 3.5.4. Koncentrirana otopina derivata razrijeđena je metanolom te je $1 \mu\text{L}$ injektiran u plinski kromatograf i analiziran tehnikom SIM. Isti postupak proveden je i u neutralnom vinu. U oba je slučaja uočena prisutnost tiola 3-SH i 3-SHA pri očekivanim vremenima zadržavanja (Dodatak, Slika 8.9) te je etil-propiolat izabran kao prikladan reagens za derivatizaciju sortnih tiola.

Kromatografski signal ETP-derivata izotopomera bio je uvijek manjeg intenziteta u odnosu na signal ETP-derivata pripadnog analita (Slike 4.6 i 4.11). Opažanje je potvrđeno provođenjem derivatizacije u modelnom vinu i analizom derivata vezanim sustavom GC-MS/MS nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi. Masene koncentracije dodanih analita 3-SH i 3-SHA bile su identične koncentracijama dodanih izotopomera. Ova se pojava može pripisati sekundarnom kinetičkom izotopnom učinku koji se događa zbog zamjene procija deuterijem na skupinama bliskima sulfhidrilnoj skupini, koja stupa u reakciju derivatizacije. Kinetički izotopni učinci prisutni su zbog utjecaja izotopa na vibracijske frekvencije molekule koja sudjeluje u kemijskoj reakciji, čime obično raste energetska barijera, a time i količina energije potrebne da molekula supstrata dosegne prijelazno stanje.³⁷³ Sekundarni kinetički izotopni učinak u pravilu je značajno slabiji od primarnog, osim kod deuteriranih spojeva, gdje omjer konstante brzine reakcije deuteriranog i nedeuteriranog supstrata može biti i do 1,4.^{374,375} U ovom je

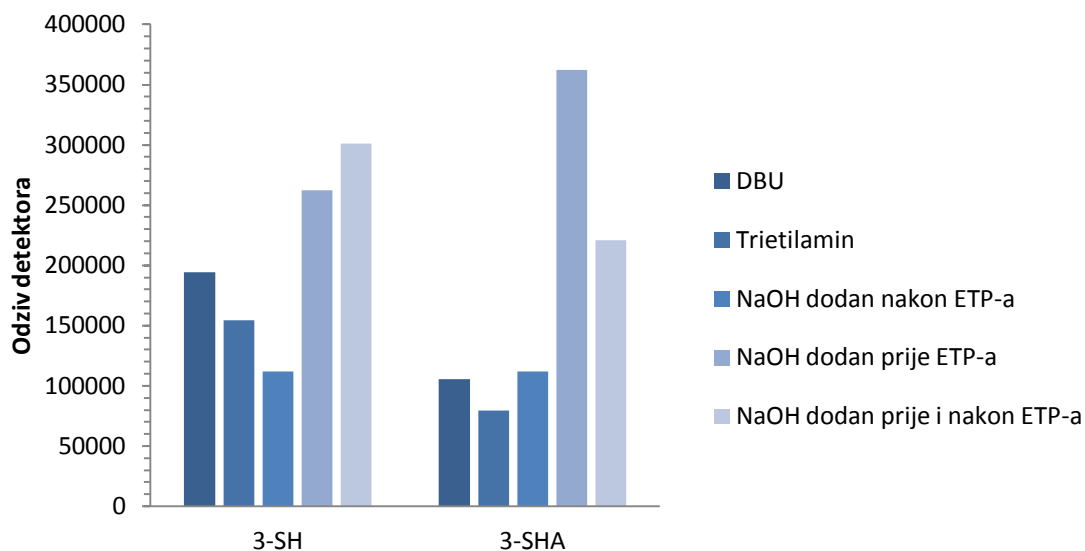
radu pronađen približno stalan odnos površina kromatografskih signala ETP-derivata analita i deuteriranih analoga, te su za izradu baždarnih krivulja površine signala analita normalizirane. Na taj način sekundarni kinetički izotopni učinak nije značajnije utjecao na kvantifikaciju sortnih tiola.

4.2.2. Utjecaj dodatka različitih baza na ishod derivatizacije sortnih tiola s etil-propiolatom

Kinetika reakcije derivatizacije etil-propiolatom određena je početnim korakom bazno kataliziranog deprotoniranja tiola,³¹⁸ nakon kojeg slijedi nukleofilni napad tiolatnog iona na trostruku vezu etil-propiolata. Stoga je istražen utjecaj različitih baza na učinkovitost derivatizacije sortnih tiola u neutralnom vinu.

Baza je dodana u neutralno vino nakon standardnog dodatka sortnih tiola ($\gamma=500 \text{ ng L}^{-1}$), unutaršnjeg standarda ($\gamma=500 \text{ ng L}^{-1}$) i derivatizacijskog reagensa. Kada su kao baze primijenjeni DBU i trietilamin (Et_3N) nije uočeno povećanje signala derivata, dok uz primjenu 2-aminoetan-1-ola signali derivata u kromatogramima nisu nađeni. Kao što je vidljivo iz **Slike 4.13**, najbolje iskorištenje derivatizacije uz manji šum osnovne kromatografske linije postignuto je jednokratnim dodatkom vodene otopine natrijeva hidroksida ($c=2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$). Testiran je i postupak s obrnutim redoslijedom dodavanja reagensa, kojim je nakon dodatka standarda uzorku dodana otopina natrijeva hidroksida da bi se deprotonirali tioli, a zatim etil-propiolat. Međutim, ovim je postupkom učinkovitost derivatizacije bila najlošija što se može pripisati brzom degradaciji deprotoniranog tiola i nukleofilnom napadu na druge supstrate u vinskoj matrici. Postupkom u kojem je otopina natrijeva hidroksida ponovno dodana 5 minuta nakon početka derivatizacije poboljšana je derivatizacija sortnog tiola 3-SH, ali je primijećeno sniženje koncentracije derivata tiola 3-SHA, uzrokovano hidrolizom acetatnog estera u ovom analitu.

U daljnjim istraživanjima otopina natrijeva hidroksida dodavana je jednokratno prije dodatka reagensa za derivatizaciju, čime je postignut kompromis između učinkovitosti derivatizacije obaju analita.



Slika 4.13. Odziv detektora za derivate sortnih tiola 3-SH i 3-SHA pripravljene derivatizacijom s etil-propiolatom u neutralnom vinu uz primjenu različitih baza

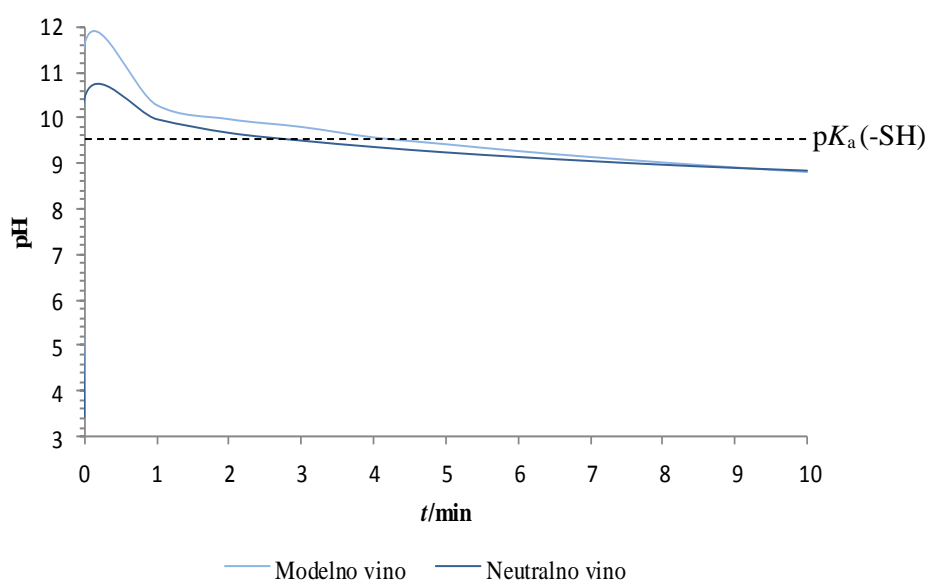
4.2.3. Trajanje reakcije derivatizacije sortnih tiola s etil-propiolatom

Zbog redovite prisutnosti otopljenih soli i kiselina u vinskoj matrici vino može djelovati kao pufer. Reakcija derivatizacije ovisna je o svojstvima medija u kojem se provodi pa je istražen utjecaj dodatka baze na tijek reakcije derivatizacije etil-propiolatom praćenjem promjene vrijednosti pH tijekom trajanja reakcije (Dodatak, **Slika 8.10**). Reakcija derivatizacije sortnih tiola (poglavlje 2.6.3) inicirana je deprotoniranjem sulfhidrilne skupine, čija je pK_a vrijednost približno 9,5. Probna reakcija provedena je u modelnom i neutralnom vinu u koje su dodane otopine radnog standarda sortnih tiola.

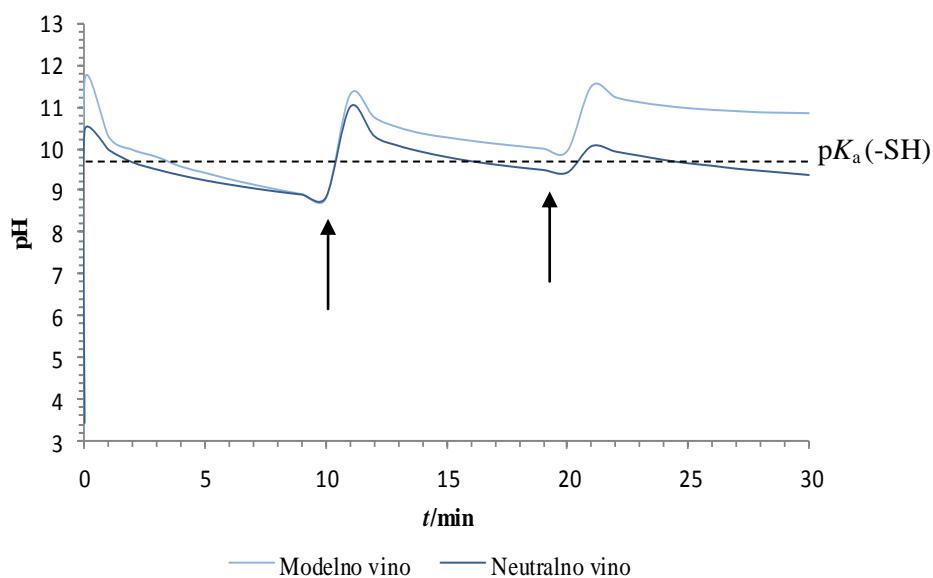
Naglo sniženje vrijednosti pH uočeno je jednu minutu nakon dodatka baze, nakon čega slijedi usporeno opadanje. Nakon 5 minuta, vrijednost pH snižava se ispod vrijednosti pK_a

sulfhidrilne skupine (**Slika 4.14**), te se reakcija derivatizacije dalje ne odvija. Reakcija je zatim provedena uz ponovljeno dodavanje otopine natrijeva hidroksida nakon 10 i 20 minuta. Nakon svakog zalučivanja otopine opažen je nagli porast vrijednosti pH, praćen naglim sniženjem unutar jedne minute, koje zatim postaje usporeno (**Slika 4.15**). Kako neutralno vino za razliku od modelnog posjeduje osobine pufera, nagle su promjene vrijednosti pH bile mnogo izraženije u modelnom vinu, čija se vrijednost pH nakon ponovljenog dodavanja baze ne snižava se ispod vrijednosti pK_a sulfhidrilne skupine.

Dodatne reakcije derivatizacije provedene su u neutralnom vinu uz produženje trajanja do 30 minuta ili ponovljeno dodavanje baze nakon početnih 5 minuta trajanja reakcije. Međutim, kromatografskom analizom nije uočen porast signala ETP-derivata sortnih tiola te je kao konačno vrijeme trajanja reakcije derivatizacije odabrano vrijeme od 10 minuta. Ponovljeno dodavanje baze uzrokuje već ranije uočeno sniženje masene koncentracije tiola 3-SHA, što se pripisuje bazno kataliziranoj hidrolizi acetatne skupine.

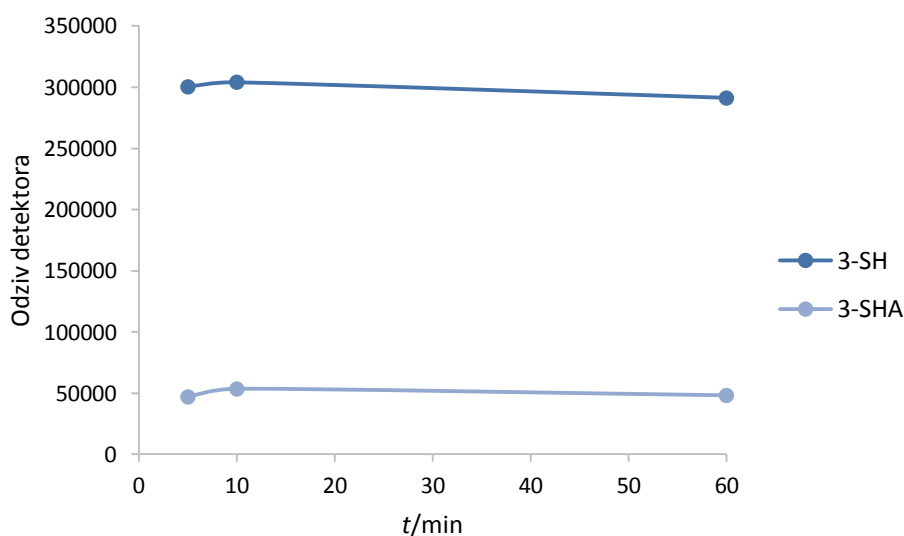


Slika 4.14. Promjena vrijednosti pH tijekom trajanja reakcije derivatizacije sortnih tiola etilpropiolatom u modelnom i neutralnom vinu. Iscrtkana linija označava vrijednost pK_a sulfhidrilne skupine



Slika 4.15. Promjena vrijednosti pH tijekom trajanja reakcije derivatizacije sortnih tiola etil-propiolatom u modelnom i neutralnom vinu uz naznačeno dodavanje baze nakon početnih 10 i 20 minuta trajanja reakcije derivatizacije

Dodatni test utjecaja vremena derivatizacije na djelotvornost ekstrakcije proveden je miješanjem uzoraka neutralnog vina u koje je dodan reagens i baza pri sobnoj temperaturi u trajanju od 5, 10 i 60 minuta. Uzorak vina sadržavao je 500 ng L^{-1} pojedinog sortnog tiola. Najveća učinkovitost postignuta je uz trajanje reakcije od 10 minuta (**Slika 4.16**).

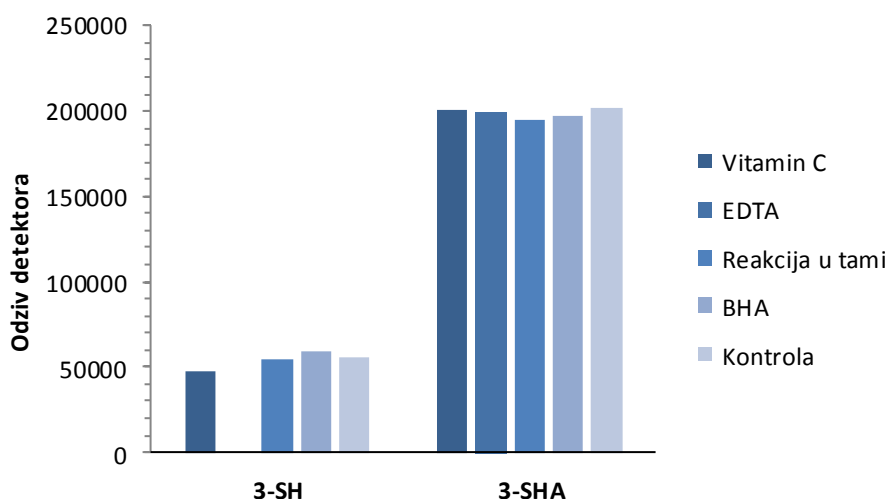


Slika 4.16. Utjecaj trajanja reakcije derivatizacije na djelotvornost ekstrakcije sortnih tiola na čvrstoj fazi

4.2.4. Utjecaj aditiva na ishod derivatizacije sortnih tiola s etil-propiolatom

Sortni tioli podložni su oksidaciji u prisutnosti zraka i svjetla te je istražena ovisnost djelotvornosti njihove ekstrakcije iz vina o dodatku različitih aditiva i postupaka sa zaštitnim djelovanjem (**Slika 4.17**). Provedena je ekstrakcija na čvrstoj fazi uz derivatizaciju etil-propiolatom i eluiranje diklormetanom. Butilirani hidroksianisol (BHA) dodan je u vino ($m=18$ mg, $V=0,5$ mL etanola) prije derivatizacijskog reagensa. U ovom je postupku bilo potrebno homogenizirati uzorak u ultrazvučnoj kupelji. Učinak BHA bio je neznatan u usporedbi s kontrolnom reakcijom koja je provedena bez primjene aditiva. Sljedeći je test proveden uz dodatak askorbinske kiseline ($m=500$ mg) u modelno vino ($V=50$ mL) prije dodatka derivatizacijskog reagensa, gdje također nije uočen pozitivan utjecaj na derivatizaciju i kvantifikaciju sortnih tiola. Ranije je predložen²⁸⁰ dodatak etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) radi sprječavanja oksidacije određenih tiola prije ili za vrijeme trajanja derivatizacije. Dodatak EDTA ($m=500$ mg) u modelno vino ($V=50$ mL) nije pokazao značajan učinak na stabilnost sortnog tiola 3-SHA, dok signal tiola 3-SH nije detektiran. Reakcijom derivatizacije provedenom u tami htjelo se istražiti i spriječiti moguću degradaciju sortnih tiola pod djelovanjem svjetla. Ovim se pristupom neznatno povisila masena koncentracija detektiranog

tiola 3-SH, dok je kod tiola 3-SHA uočeno sniženje. Daljnje optimiranje metode provedeno je bez dodatka aditiva u uzorke vina.

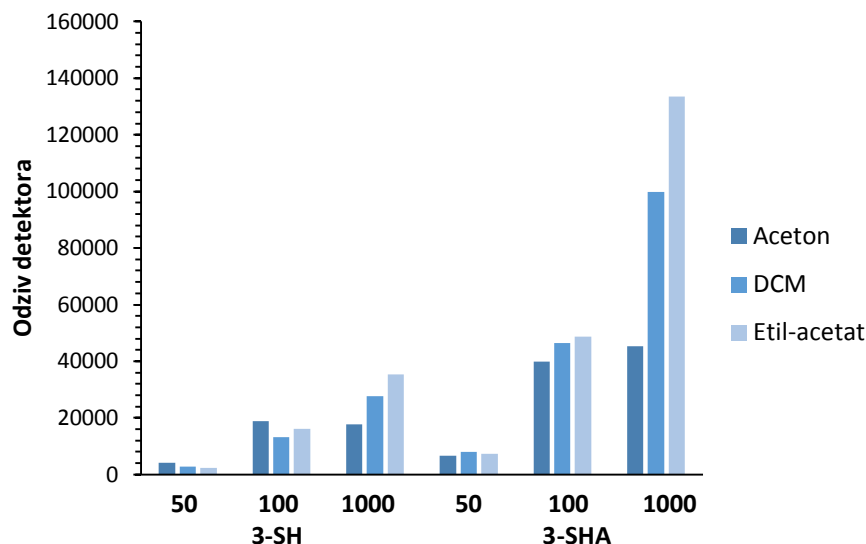


Slika 4.17. Odziv detektora za derivate sortnih tiola 3-SH i 3-SHA nakon provođenja reakcije derivatizacije etil-propiolatom u modelnom vinu uz dodatak različitih aditiva

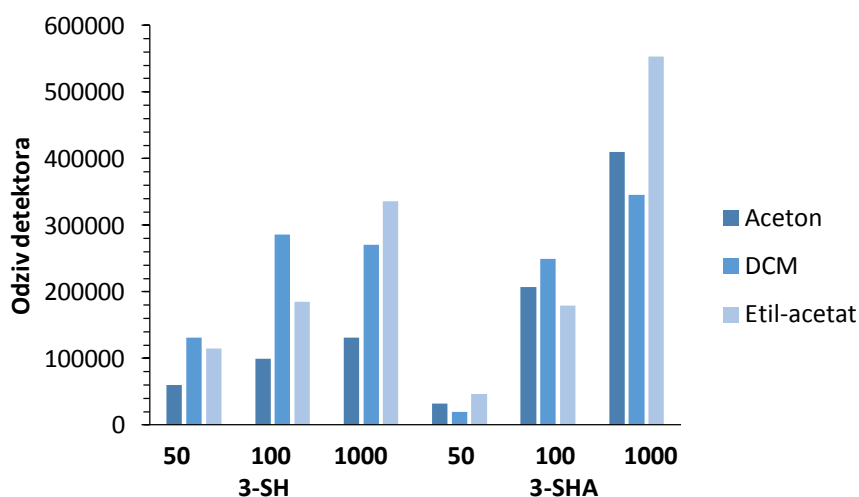
4.2.5. Utjecaj eluensa na djelotvornost ekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi

Utjecaj vrste eluensa na djelotvornost ekstrakcije sornih tiola na čvrstoj fazi testiran je primjenom različitih otapala za eluiranje njihovih ETP-derivata sa sorbensa nakon propuštanja uzorka kroz kolonicu. Uspoređena su otapala etil-acetat, diklormetan, aceton te smjesa pentana i dietil-etera ($\psi=1:3$). Analiti eluirani etil-acetatom plinskokromatografski su analizirani uz optimirani temperaturni program kolone opisan u poglavlju 3.5.7, dok je u slučaju ostalih otapala početna temperatura kolone prilagođena vrelištu otapala. U kromatogramima analita eluiranih sa smjesom pentana i dietil-etera nedostajao je signal derivata tiola 3-SH. **Slike 4.18** i **4.19** prikazuju djelotvornost eluiranja derivata oba sortna tiola prema vrijednostima površine kromatografskih signala zabilježenih pri masenim koncentracijama tiola u vinu od 50 ng L^{-1} , 500 ng L^{-1} i 1000 ng L^{-1} . Primjenom acetona nije postignuto zadovoljavajuće eluiranje derivata tiola kada su tioli u vina dodani u srednjoj i najvišoj masenoj koncentraciji. Zbog sličnog učinka pri najnižim masenim koncentracijama

sortnih tiola u vinu, za razvoj GC-MS/MS metode uz tehniku MRM odabrani su kao eluensi etil-acetat i diklormetan.

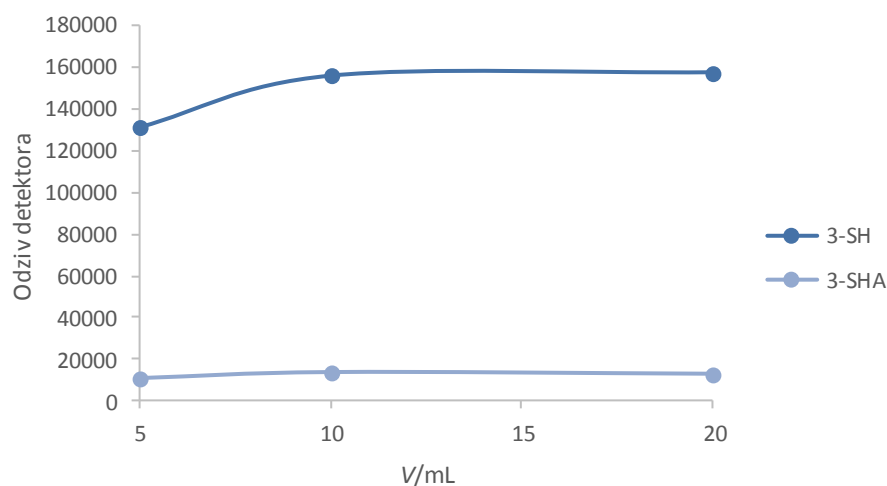


Slika 4.18. Odziv detektora za ETP-derivate sortnih tiola 3-SH i 3-SHA ekstrahirane iz modelnog vina na čvrstoj fazi i eluirane s različitim eluensima. Masene koncentracije sortnih tiola u vinu: $\gamma=50 \text{ ng L}^{-1}$, 500 ng L^{-1} i 1000 ng L^{-1}



Slika 4.19. Odziv detektora za ETP-derivate sortnih tiola 3-SH i 3-SHA ekstrahirane iz neutralnog vina na čvrstoj fazi i eluirane s različitim eluensima. Masene koncentracije sortnih tiola u vinu: $\gamma=50 \text{ ng L}^{-1}$, 500 ng L^{-1} i 1000 ng L^{-1}

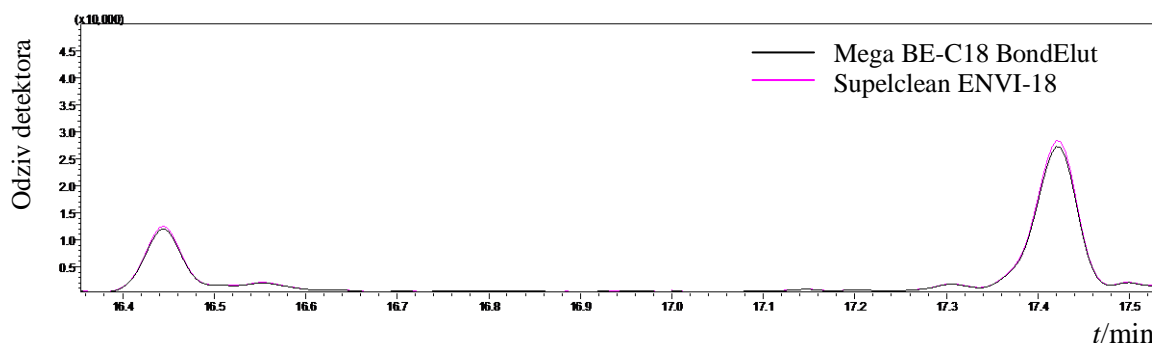
Kako je primjenom etil-acetata postignuta relativno najveća učinkovitost eluiranja derivata sa sorbensa, istražen je utjecaj volumena otapala na učinkovitost ekstrakcije. Derivati zadržani na sorbentu nakon propuštanja derivatiziranog uzorka eluirani su volumenom od 5 mL, 10 mL i 20 mL etil-acetata. **Slika 4.20** prikazuje odzive detektora za ETP-derivate tiola eluirane sa sorbensa različitim volumenima otapala. Povećanje volumena otapala nije rezultiralo poboljšanom ekstrakcijom derivata, te je odziv detektora u kromatogramima uzoraka pripremljenih eluiranjem s 20 mL otapala bio unutar očekivanih vrijednosti odstupanja metode. Daljnji postupci provedeni su uz primjenu 10 mL etil-acetata za eluiranje ETP-derivata sortnih tiola sa sorbensa.



Slika 4.20. Odziv detektora za ETP-derivate sortnih tiola 3-SH i 3-SHA ekstrahirane iz neutralnog vina na čvrstoj fazi i eluiranje sa sorbensa različitim volumenima etil-acetata

4.2.6. Izbor sorbensa za ekstrakciju sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi

Vrsta sorbensa primijenjenog za ekstrakciju na čvrstoj fazi može utjecati na djelotvornost ekstrakcije analita. Uspoređena je djelotvornost sorbensa za ekstrakciju sortnih tiola iz vina primjenom dviju vrsta komercijalno dostupnih kolonica, Mega BE-C18 BondElut (6 mL/1 g) te Supelclean ENVI-18 (6 mL/1 g). S obzirom na sličnost sorbensa u kolonicama, razlike u djelotvornosti ekstrakcije nisu bile značajne (**Slika 4.21**). GC-MS/MS-kromatogrami s boljim omjerom signala analita i šuma osnovne linije zabilježeni su primjenom kolonica Supelclean ENVI-18, koje su stoga izabrane za ekstrakciju sortnih tiola iz vina.



Slika 4.21. GC-MS/MS-kromatogrami ETP-derivata sortnih tiola 3-SH i 3-SHA ekstrahiranih iz neutralnog vina na čvrstoj fazi primjenom dviju različitih komercijalno dostupnih kolonica

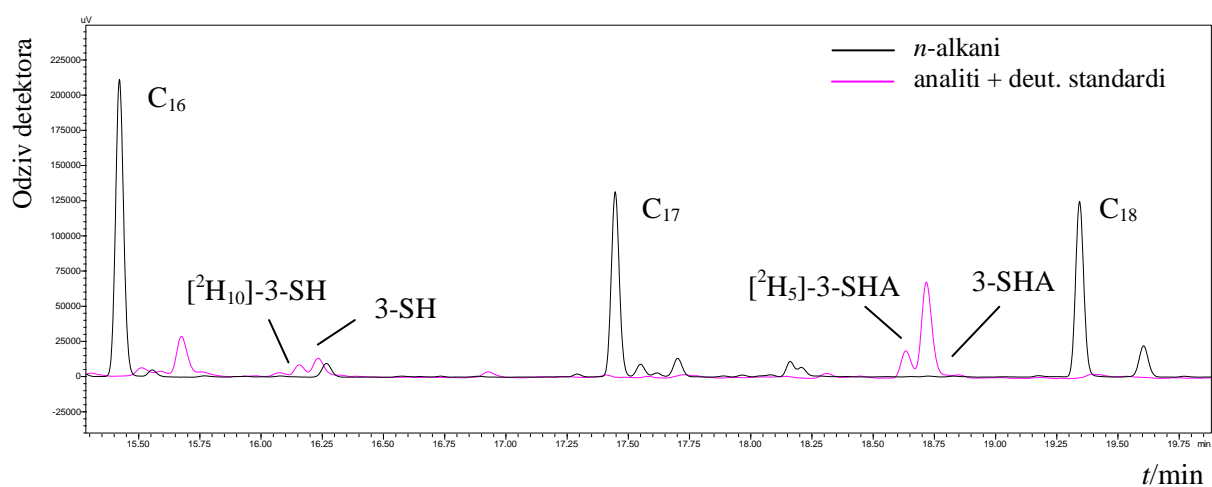
4.3. Mikroekstrakcija sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi iz para iznad otopine

4.3.1. HS-SPME nederivatiziranih sortnih tiola

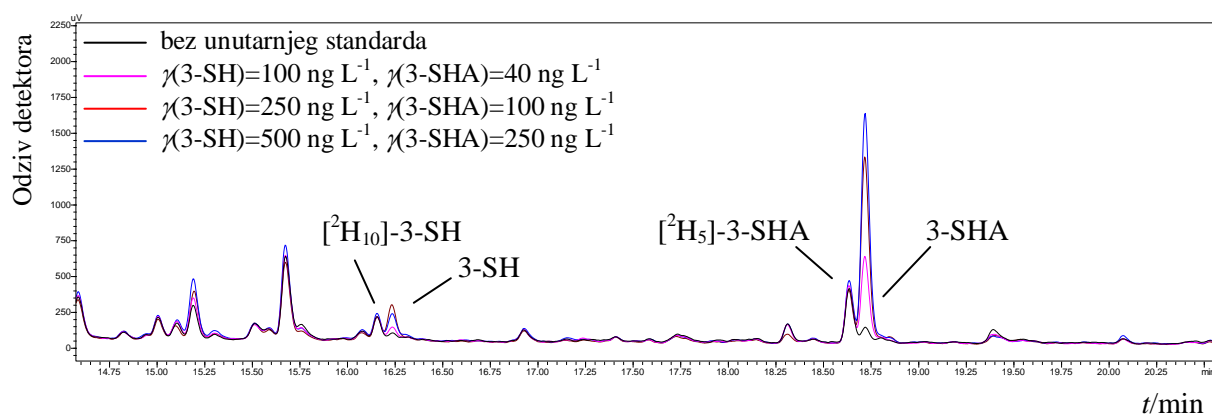
Sortni tioli smatraju se polarnim analitima relativno visokih vrelišta za koje je najbolja učinkovitost ekstrakcije u ranijim istraživanjima postignuta primjenom sorbensa DVB/CAR/PDMS.²⁹⁵⁻²⁹⁷ Iz tog je razloga u ovom radu usporedba različitih vrsta sorbensa ograničena isključivo na ovo trokomponentno vlakno i PA vlakno, o kojem ima vrlo malo izvještaja u ranijoj literaturi. Zbog slabe učinkovitosti ranije objavljenih metoda početna ekstrakcija analita iz vina metodom HS-SPME napravljena je s uzorcima vina obogaćenih radnim standardom visoke masene koncentracije ($\gamma=20 \mu\text{g L}^{-1}$). Parametri metode HS-SPME preuzeti su iz rada Fedrizzi i suradnika,¹⁷⁵ dok su spojevi analizirani plinskom kromatografijom uz detektor kemiluminescencije sumpora. Izlaganje sorbensa parama iznad otopine provedeno je nakon unošenja uzorka vina u bočicu za mikroekstrakciju, korekcije vrijednosti pH dodatkom vodene otopine natrijeva hidroksida ($c=1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$) i dodatka soli (poglavlje 3.5.5). Vlakno je zatim injektirano u injektor GC-SCD-a te su spojevi analizirani uz uvjete opisane u **Tablici 3.5**. GC-SCD-kromatogrami su prikazani na **Slikama 4.22** i **4.23**. Uz sorte tiola i unutarnje standarde analizirane su i otopine *n*-alkana ($\text{C}_{12}\text{-C}_{20}$), masenih koncentracija pojedinačnih alkana $\gamma=10 \text{ mg L}^{-1}$. Vremena zadržavanja sortnih tiola i deuteriranih izotopomera navedeni su u **Tablici 4.2**.

Tablica 4.2. Vremena zadržavanja sortnih tiola i njihovih izotopomera određena tehnikom GC-SCD na koloni Rtx-5MS.

Spoj	t_R / min
3-SH	16,15
[² H ₁₀]-3-SH	16,22
3-SHA	18,71
[² H ₅]-3-SHA	18,62



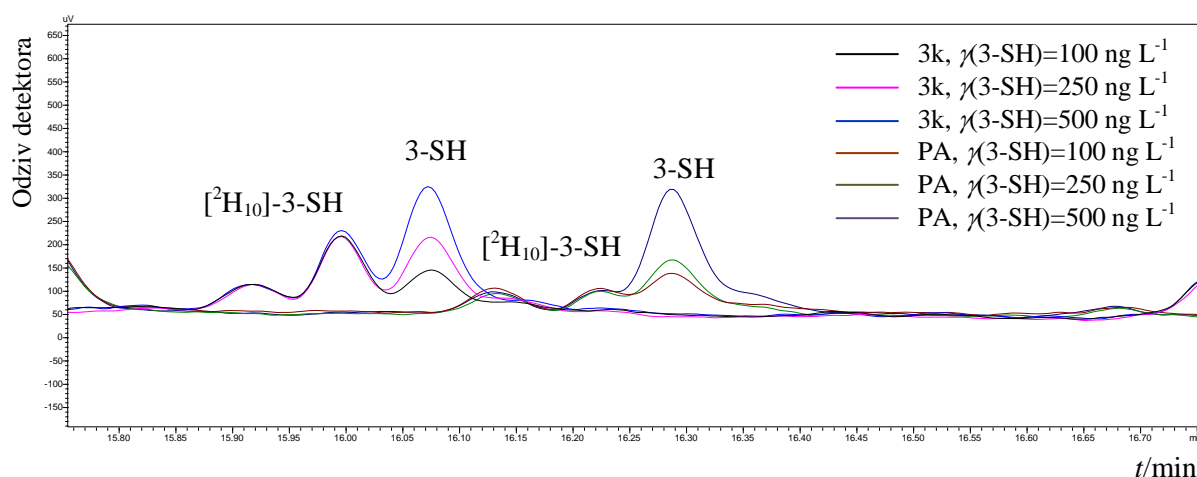
Slika 4.22. GC-SCD-kromatogrami *n*-alkana (C₁₆-C₁₈) i smjese sortnih tiola i unutarnjih standarda. Masena koncentracija svih spojeva u metanolu $\gamma=20 \mu\text{g L}^{-1}$



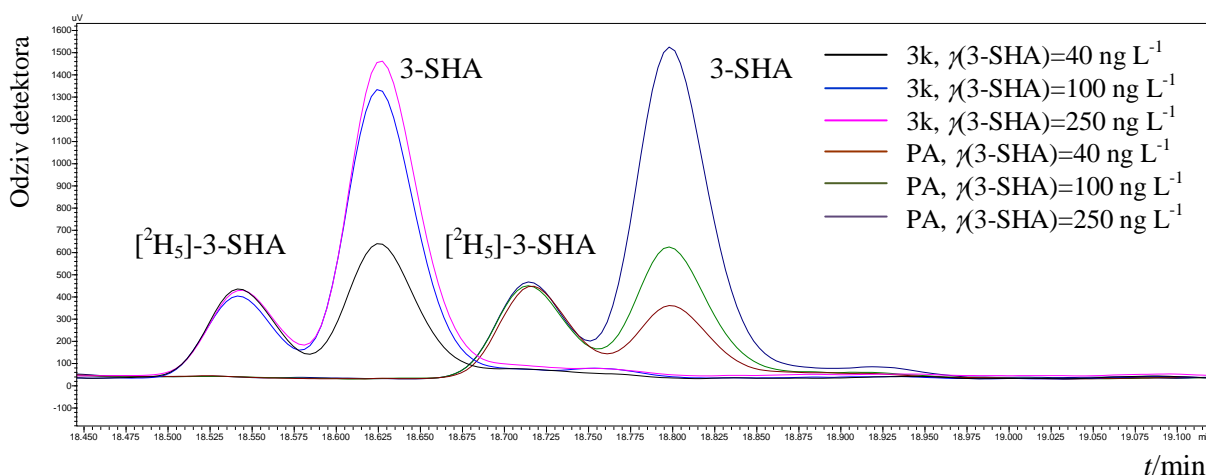
Slika 4.23. GC-SCD-kromatogram nederivatiziranih sortnih tiola i unutarnjih standarda ekstrahiranih iz neutralnog vina tehnikom HS-SPME (sorbens DVB/CAR/PDMS). Masene koncentracije unutarnjeg standarda: γ ([²H₁₀]-3-SH)=200 ng L⁻¹, γ ([²H₅]-3-SHA)=100 ng L⁻¹

Kromatogrami analita ekstrahiranih iz neutralnog vina tehnikom HS-SPME primjenom dviju različitih vrsta sorbensa prikazani su na **Slici 4.24**. Kromatografski signali analita zabilježeni su pri tri razine obogaćenja vina, najvišoj: $\gamma(3\text{-SH})=500 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$; srednjoj: $\gamma(3\text{-SH})=250 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$ i najnižoj: $\gamma(3\text{-SH})=100 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=40 \text{ ng L}^{-1}$.

a)

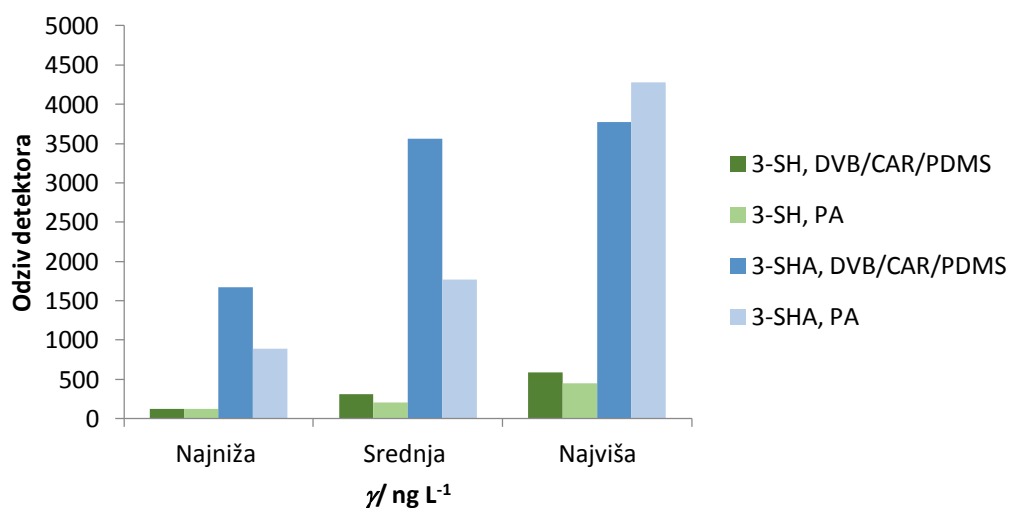


b)



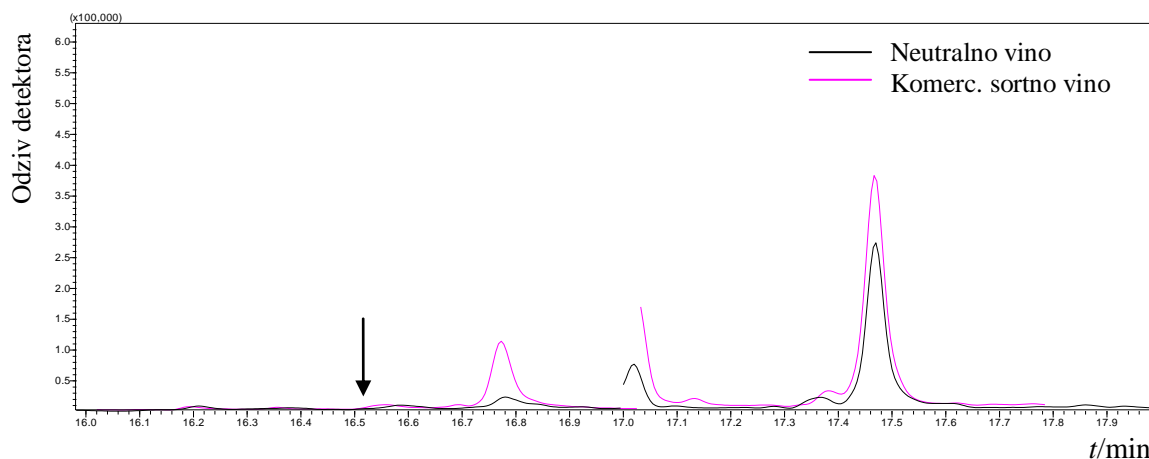
Slika 4.24. GC-SCD-kromatogram analita a) 3-SH i b) 3-SHA ekstrahiranih iz neutralnog vina tehnikom HS-SPME primjenom dviju različitih vrsta sorbensa: DVB/CAR/PDMS (3k) i PA – polikarilat. Masene koncentracije unutarnjeg standarda: $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$. Vremena zadržavanja ne odgovaraju stvarnima; signali su namjerno razmaknuti zbog preglednosti

Iz **Slike 4.25** vidljiva je bolja učinkovitost trokomponentnog vlakna DVB/CAR/PDMS za ekstrakciju sortnog tiola 3-SH pri srednjoj i najvišoj razini obogaćenja neutralnog vina te tiola 3-SHA pri najnižoj i srednjoj razini. Poliakrilatno vlakno bilo je djelotvornije od vlakna DVB/CAR/PDMS samo pri najvišoj razini obogaćenja uzorka neutralnog vina sortnim tiolom 3-SHA.



Slika 4.25. Učinkovitost mikroekstrakcije sortnih tiola iz para iznad otopine neutralnog vina primjenom dvaju različitih sorbensa. Masene koncentracije analita dodanih u vino bile su najviša: $\gamma(3\text{-SH})=500 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$, srednja: $\gamma(3\text{-SH})=250 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$ i najniža: $\gamma(3\text{-SH})=100 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=40 \text{ ng L}^{-1}$

Testiran je i postupak analize nederivatiziranih sortnih tiola uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi iz para iznad otopine i detekciju tandemnim spektrometrom masa. Parametri metode HS-SPME opisani su u poglavlju 3.5.5. Ovim pristupom u uzorcima je detektiran samo sortni tiol 3-SHA pri očekivanom vremenu zadržavanja, dok tiol 3-SH nije bilo moguće detektirati niti nakon dodatka najviše koncentracije standarda (**Slika 4.26**).

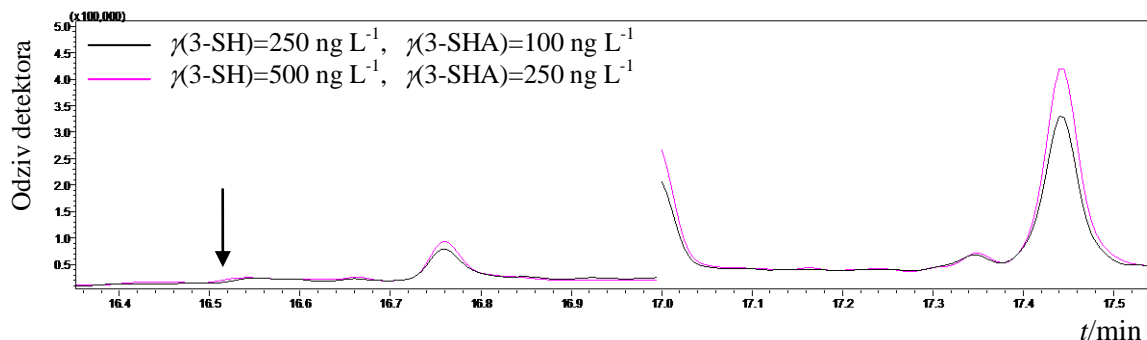


Slika 4.26. GC-MS/MS-kromatogram sortnih tiola ekstrahiranih iz vina u koje su dodani u najvišoj masenoj koncentraciji, $\gamma(3\text{-SH})=500 \text{ ng L}^{-1}$ i $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$. Ekstrakcija iz neutralnog i komercijalnog vina tehnikom HS-SPME primjenom vlakna DVB/CAR/PDMS. Kromatogram snimljen tehnikom MRM. Strelicom je označeno vrijeme zadržavanja 3-SH

4.3.2. HS-SPME derivata sortnih tiola

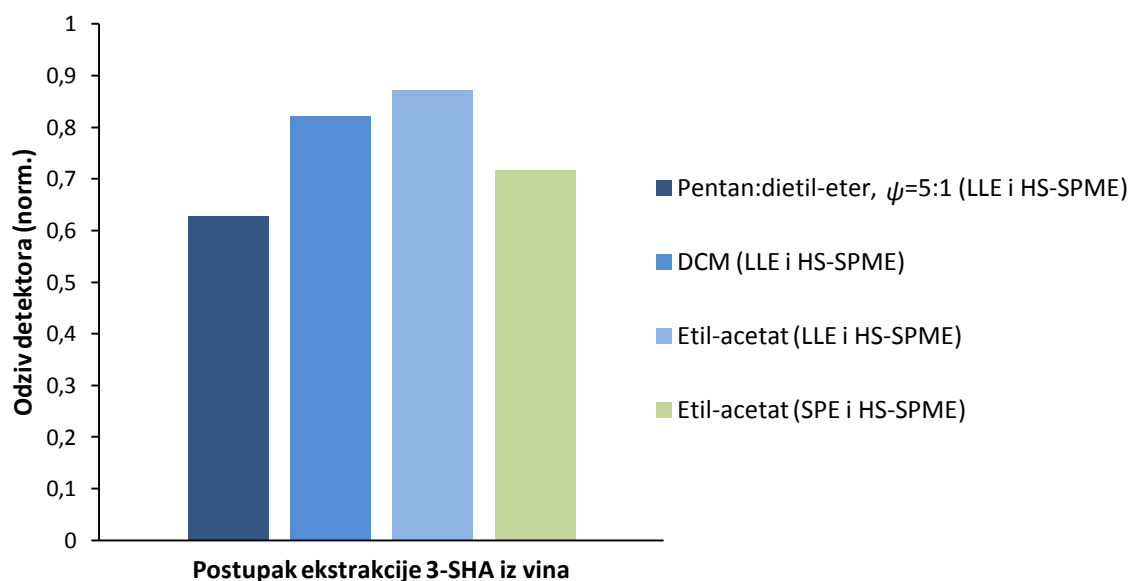
Istražena je učinkovitost mikroekstrakcije sortnih tiola iz para iznad otopine na sorbentu DVB/CAR/PDMS nakon njihove derivatizacije u neutralnom vinu. Radni i unutarnji standardi dodani su u vino prije postupka derivatizacije. Za mikroekstrakciju su primijenjena dva različita postupka. Sve analize provedene su tehnikom GC-MS/MS uz detekciju i identifikaciju analita optimiranom tehnikom MRM (poglavlje 4.4.1).

U prvom je postupku (opisanom u poglavlju 3.5.6) provedena ekstrakcija derivatiziranih analita na čvrstoj fazi, s koje su eluirani etil-acetatom. Eluat je uparen do suha, a zatim su dodani voda i natrijev klorid nakon čega je slijedilo izlaganje vlakana parama iznad otopine (Slika 4.27). Ovom metodom u kromatogramu nije pronađen signal derivata tiola 3-SH, dok je signal derivata tiola 3-SHA detektiran pri očekivanom vremenu zadržavanja.

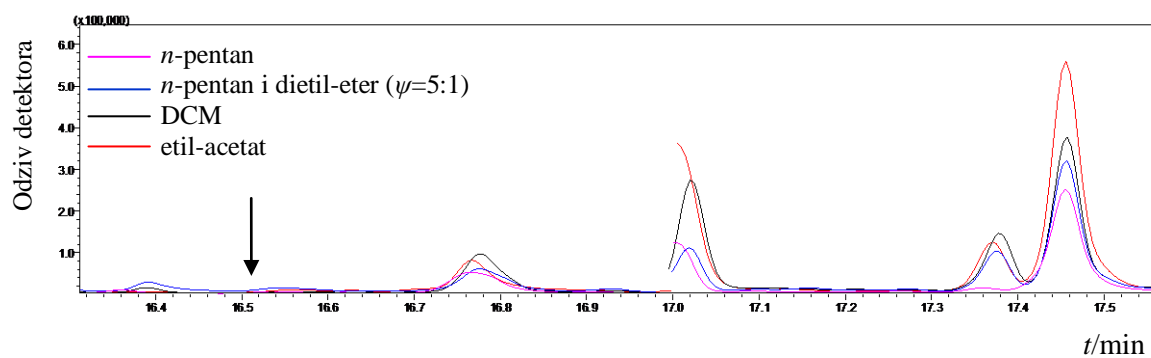


Slika 4.27. GC-MS/MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola snimljen tehnikom MRM nakon ekstrakcije analita iz neutralnog vina tehnikom SPE uz eluiranje etil-acetatom i zatim iz eluata tehnikom HS-SPME. Masene koncentracije unutarnjih standarda: $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$. Strelicom je označeno vrijeme zadržavanja ETP-derivata 3-SH

Drugim postupkom, centrifugirani uzorak neutralnog vina u kojem je provedena derivatizacija sortnih tiola (poglavlje 3.5.4) ekstrahiran je organskim otapalom ($V=10 \text{ mL}$), uz dodatak zasićene vodene otopine natrijeva klorida ukoliko je nastala emulzija. Organski sloj prenesen je u bočicu za ekstrakciju iz para iznad otopine i uparen do suha u struji dušika. Uspoređena je učinkovitost otapala u koraku ekstrakcije tekuće-tekuće te su derivati sortnih tiola iz vina ekstrahirani etil-acetatom, diklormetanom ili smjesom pentana i dietil-etera ($\psi=5:1$). Posljednje je otapalo primijenjeno zbog značajnog smanjenja polarnosti analita nakon derivatizacije s etil-propiolatom te se ekstrakcijom s relativno nepolarnom fazom željelo istražiti poboljšava li se prijelaz spojeva iz vodene faze uzorka u organsku fazu. Suhom ostatku zatim su dodani natrijev klorid i voda nakon čega je slijedilo izlaganje sorbena parama iznad otopine. Kao što je vidljivo iz **Slike 4.28**, najveća je učinkovitost ekstrakcije tekuće-tekuće postignuta primjenom etil-acetata. Međutim, niti jednim od opisanih postupaka u kromatogramu nije detektiran signal ETP-derivata sortnog tiola 3-SH (**Slika 4.29**), čak niti kada je masena koncentracija standardnog dodatka bila $20 \mu\text{g L}^{-1}$. To se može pripisati većoj polarnosti, odnosno slabijem afinitetu ETP-derivata ovog sortnog tiola za adsorpciju na trokomponentni sorbens. Kromatografski signal derivata sortnog tiola 3-SHA detektiran je pri očekivanom vremenu zadržavanja.

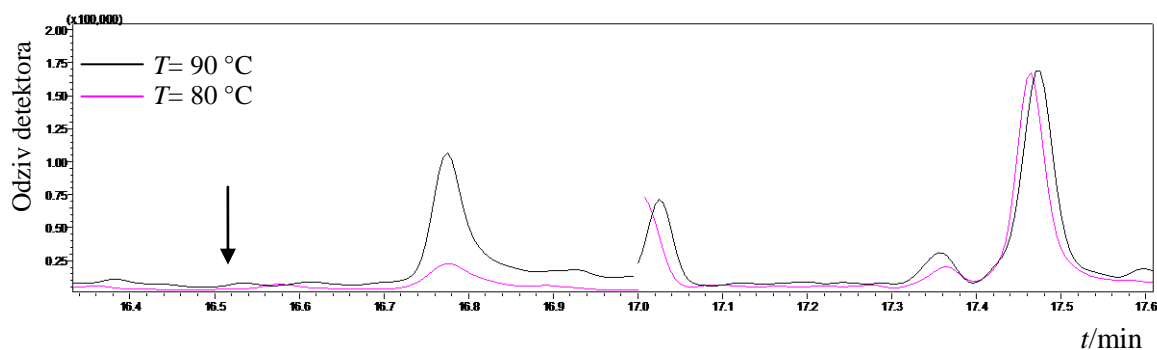


Slika 4.28. Odziv detektora određen tehnikom GC-MS/MS za derivat sortnog tiola 3-SHA-ETP ekstrahiran tehnikom HS-SPME nakon ekstrakcije spoja iz neutralnog vina različitim otapalima ili na čvrstoj fazi. Masena koncentracija dodanog standarda $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$



Slika 4.29. GC-MS/MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola snimljen tehnikom MRM nakon ekstrakcije analita iz neutralnog vina tehnikom LLE i zatim iz ekstrakta tehnikom HS-SPME. Masene koncentracije dodanog standarda $\gamma(3\text{-SH})=500 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$ i unutarnjih standarda $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$. Strelicom je označeno vrijeme zadržavanja ETP-derivata 3-SH

Uspoređene su dvije vrijednosti temperature pri kojoj je provedeno izlaganje SPME-vlakna parama iznad otopine uzorka, 80 °C i 90 °C. Učinkovitost ekstrakcije ETP-derivata sortnog tiola 3-SHA bila je slična pri obje radne temperature, dok derivat tiola 3-SH nije detektiran (Slika 4.30).



Slika 4.30. GC-MS/MS-kromatogram ETP-derivata tiola snimljen tehnikom MRM nakon ekstrakcije iz neutralnog vina etil-acetatom i zatim iz ekstrakta tehnikom HS-SPME pri 80 °C i 90 °C. Masene koncentracije dodanog standarda $\gamma(3\text{-SH})=100 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma(3\text{-SHA})=50 \text{ ng L}^{-1}$ i unutarnjih standarda $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$. Strelicom je označeno vrijeme zadržavanja ETP-derivata 3-SH

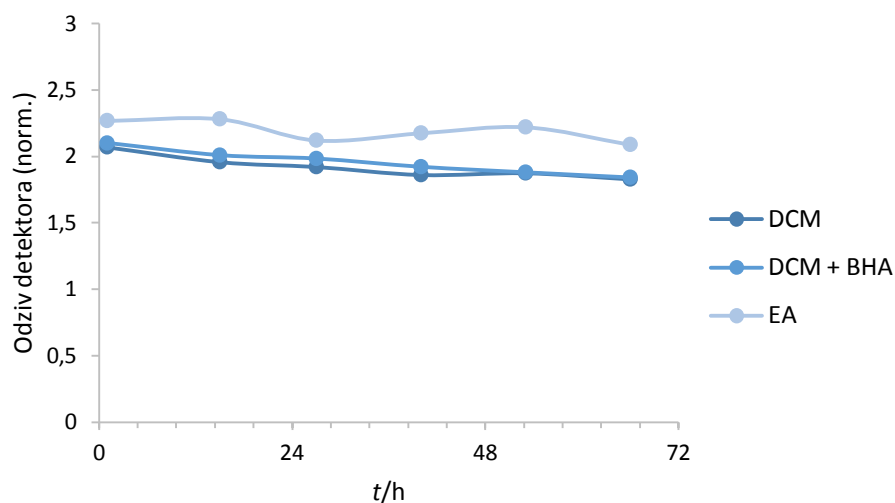
Razvidno je da se pomoću obje metode može identificirati i kvantificirati sortni tiol 3-SHA u obliku derivata, dok drugi sortni tiol nije bilo moguće detektirati niti u neutralnom niti u realnom (Dodatak, **Slike 8.11 i 8.12**) vinu. Zbog jednostavnosti postupka i detekcije signala sortnog tiola 3-SH u kromatogramima, sortni tioli su iz realnih uzoraka vina ekstrahirani isključivo tehnikom HS-SPME bez derivatizacije, uz analizu tehnikom GC-SCD.

4.4. Kvantifikacija sortnih tiola u vinu primjenom SPE i GC-MS/MS (QqQ)-analize

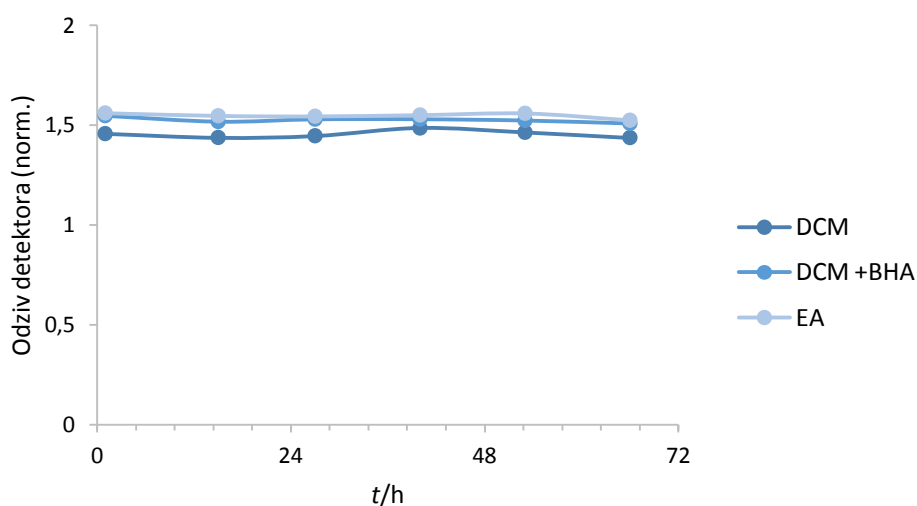
4.4.1. Stabilnost ETP-derivata sortnih tiola

Stabilnost ETP-derivata sortnih tiola istražena je optimiranom metodom derivatizacije i ekstrakcije na čvrstoj fazi (poglavlje 3.5.4) uz plinskokromatografsku analizu i detekciju tandemnim spektrometrom masa. Derivatizacija je provedena u neutralnom vinu, a derivati su sa SPE-sorbensa eluirani etil-acetatom ili diklormetanom. Analize su provedene razrjeđenjem ukoncentriranog eluata u etil-acetatu ili diklormetanu uz dodatak ili bez dodatka antioksidansa BHA ($m=18$ mg; $n=0,1$ mmol). Otopine za analizu pohranjene su u staklenim bočicama volumena 1,5 mL pri 4 °C i analizirane u približno jednakim vremenskim razmacima unutar 3 dana nakon provedbe derivatizacije i ekstrakcije. Na **Slici 4.31** vidljivo je da je uz pohranu pri 4 °C razgradnja derivata 3-SHA-ETP zanemariva te se razlike u odzivu detektora između mjerenja mogu pripisati relativnoj standardnoj devijaciji metode. U slučaju derivata 3-SH-ETP opaženo je blago sniženje masene koncentracije otprilike 10 sati nakon provedbe derivatizacije. Iz tog su razloga ekstrakti analizirani neposredno nakon ekstrakcije kada je to bilo moguće, ili su do analize pohranjeni pri -22 °C kako bi se smanjila mogućnost razgradnje. Dodatak antioksidansa BHA u otopinu s diklormetanom nije imao značajan učinak na stabilnost derivata 3-SH-ETP i 3-SHA-ETP. ETP-derivati sortnih tiola bili su najstabilniji uz primjenu etil-acetata kao otapala za eluiranje derivata sa sorbensa.

a)



b)



Slika 4.31. Promjena odziva detektora za derivate (a) 3-SH-ETP i (b) 3-SHA-ETP ovisno o vremenu provedbe analize nakon derivatizacije i o otapalima korištenima za ekstrakciju derivata iz vina na čvrstoj fazi i razrjeđenje ekstrakta

4.4.2. Razvoj MS/MS-metode za određivanje sortnih tiola praćenjem višestrukih reakcija

Povećanje osjetljivosti detekcije analita prilikom analize spektrometrom masa može se postići tehnikom MRM. U tu je svrhu najprije provedena derivatizacija sortnih tiola i deuteriranih

standarda u modelnom vinu i ekstrakcija spojeva na čvrstoj fazi. Ekstrakti su najprije analizirani GC-MS/MS-om tehnikom *full scan* u rasponu m/z od 50 do 350 kako bi se prema snimljenim spektrima masa (**Slike 4.7-4.10**) identificirali molekularni ioni analita.

Nakon odabira karakterističnih jedinstvenih signala m/z , provedeno je pretraživanje iona produkata (**engl. product ion scan, PIS**) tandemnom spektrometrijom masa u rasponu zadržavanja spojeva na plinskromatografskoj koloni od 16,00 min do 17,85 min kako bi se identificirali fragmentni ioni nastali iz molekularnih iona koji su korišteni kao dijagnostički ioni. U **Tablici 4.3** prikazani su specifični fragmentni ioni korišteni za identifikaciju i kvantifikaciju sortnih tiola. Optimirana je energija fragmentacije (**engl. Collision Energy, CE**) postupnim povećanjem vrijednosti od 3 eV do 30 eV u inkrementima od po 3 eV te su za svaki molekularni ion odabrane vrijednosti energija pri kojima su zabilježeni signali fragmentnih iona produkata najvećeg intenziteta u spektrima masa.

Tablica 4.3. Vrijednosti m/z pri kojima su identificirani fragmentni ioni prekursori korišteni u tehnici PIS snimanja spektara masa

Spoj	Molekularni ion	Dijagnostički ion	Dijagnostički ion
	m/z	m/z	m/z
3-SH-ETP	232,10	214,10	187,10
[² H ₁₀]-3-SH-ETP (unutarnji standard)	242,15	223,15	197,15
3-SHA-ETP	274,10	241,15	229,10
[² H ₅]-3-SHA-ETP (unutarnji standard)	279,15	246,20	234,10

Zatim je razvijena MRM-metoda detekcije i identifikacije sortnih tiola primjenom programa SmartMRM (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ovim su programom na temelju spektara masa snimljenih tehnikom PIS odabrani skupovi fragmentacijskih prijelaza za svaki analit i unutarnji standard, prema kojima su konstruirane tri MRM-metode (MRM1-3), temeljene na

različitim fragmentacijskim prijelazima i energijama fragmentacije. Odabrani fragmentacijski prijelazi i optimirane krivulje ovisnosti maksimuma intenziteta pojedinih prijelaza o energiji fragmentacije izračunati su programom i prikazani su u Dodatku u **Tablicama 8.1 i 8.2**. Krivulje optimiranja ovisnosti intenziteta prijelaza o energiji fragmentacije prikazane su u Dodatku na **Slici 8.13**. Ovim se postupkom odabiru prikladne energije fragmentacije i eliminira dio testiranih fragmentacijskih prijelaza usporedbom intenziteta signala fragmentnih iona u spektrima masa.

Učinkovitost pojedinih MRM-metoda istražena je analizom ekstrakta neutralnog vina u koje su dodani standardi sortnih tiola u tri različite masene koncentracije: $\gamma(3\text{-SH})=100 \text{ ng L}^{-1}$, 250 ng L^{-1} i 500 ng L^{-1} te $\gamma(3\text{-SHA})=50 \text{ ng L}^{-1}$, 100 ng L^{-1} i 250 ng L^{-1} , dok su masene koncentracije unutarnjih standarda u svim uzorcima bile jednake: $\gamma([{}^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$ te $\gamma([{}^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$. Nakon derivatizacije sortnih tiola i unutarnjih standarda i ekstrakcije tehnikom SPE, svaki je eluat razdijeljen u tri bočice i analiziran pojedinim MRM-metodama.

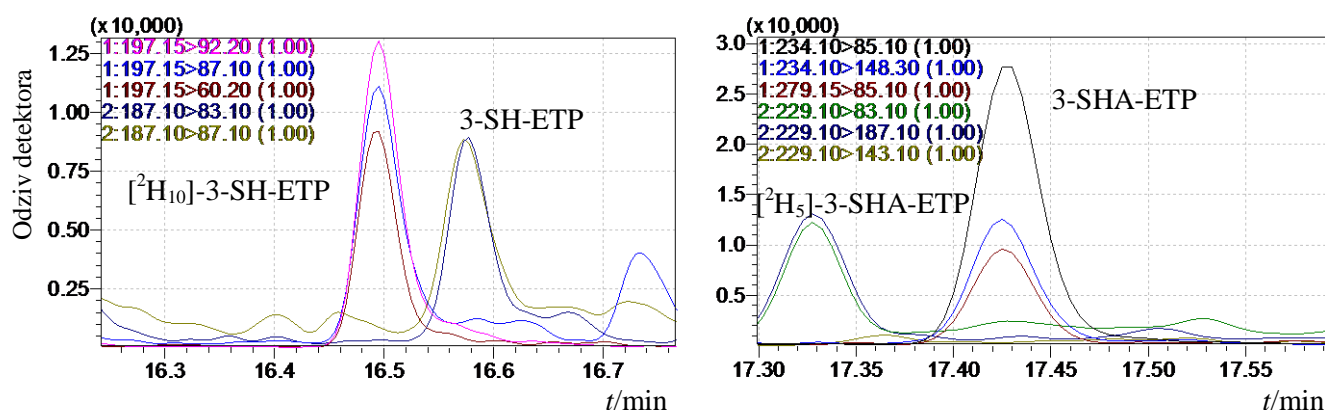
Određeni prijelazi odbačeni su nakon optimiranja intenziteta prijelaza i energije fragmentacije (Dodatak, **Slika 8.13**). Analit 3-SH kvantificiran je pri fragmentacijskom prijelazu m/z : $187,10 \rightarrow 83,10$; unutarnji standard $[{}^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH}$ kvantificiran je pri fragmentacijskom prijelazu m/z : $197,15 \rightarrow 92,20$; analit 3-SHA kvantificiran je pri fragmentacijskom prijelazu m/z : $229,10 \rightarrow 143,10$, dok je unutarnji standard $[{}^2\text{H}_5]\text{-3-SHA}$ kvantificiran pri fragmentacijskom prijelazu m/z : $234,10 \rightarrow 85,10$. Za svaki analit i unutarnji standard ustanovljena su dva dodatna dijagnostička prijelaza koja su korištena pri identifikaciji spojeva. Fragmentacijski prijelazi korišteni u optimiranoj MRM-metodi za kvantificiranje sortnih tiola ekstrahiranih iz vina i njihove optimalne energije fragmentacije navedene su u **Tablici 4.4**.

Tablica 4.4. Fragmentacijski prijelazi korišteni u odabranoj MRM-metodi (MRM1) analize sortnih tiola u eksperimentalnim vinima uz pripadne optimirane vrijednosti energije fragmentacije

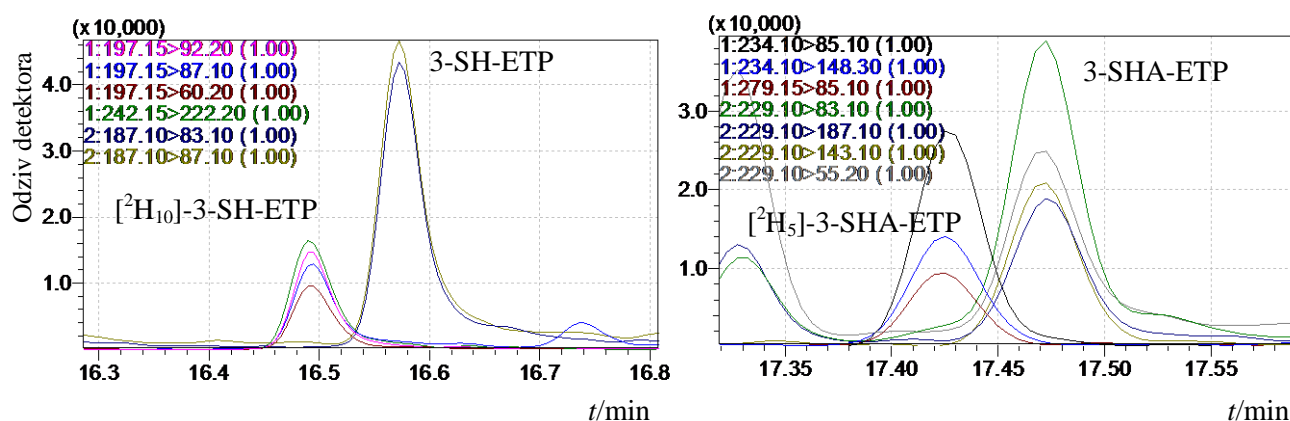
Spoj	<i>t</i> /min	Kvantifikacijski prijelaz <i>e/z</i>	<i>CE</i> /eV	1. Referencijski prijelaz <i>e/z</i>	<i>CE</i> /eV	2. Referencijski prijelaz <i>e/z</i>	<i>CE</i> /eV
3-SH-ETP	od 16,00	187,10→83,10	6,00	187,10→87,10	12,00	187,10→55,10	18,00
[² H ₁₀]-3-SH-ETP	do 17,00	197,15→92,20	6,00	197,15→87,10	9,00	197,15→60,20	21,00
3-SHA-ETP	od 17,00	229,10→143,10	6,00	229,10→83,10	12,00	229,10→55,20	24,00
[² H ₅]-3-SHA-ETP	do 17,75	234,10→85,10	12,00	279,15→85,10	21,00	234,10→148,30	6,00

t - raspon vremena zadržavanja na plinskrokromatografskoj koloni

Praćenjem višestrukih reakcija postignuto je djelotvorno razdvajanje analita i unutarnjih standarda. **Slike 4.32** i **4.33** prikazuju kromatograme praćenih fragmentacijskih prijelaza analita u uzorcima koji nisu obogaćeni standardnim dodatkom, te pri najvišoj razini standardnog dodatka, kao i praćenih prijelaza deuteriranih standarda. Kromatogram ETP-derivata sortnih tiola snimljen praćenjem odabranih višestrukih reakcija pri pet koncentracijskih razina standardnog dodatka prikazan je u Dodatku, **Slika 8.14**.



Slika 4.32. GC-MS/MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola i unutarnjih standarda snimljen tehnikom MRM s naznačenim prijelazima korištenima za identifikaciju spojeva u uzorcima eksperimentalnih vina. Uzorci nisu obogaćeni standardnim dodatkom, masene koncentracije dodanog unutarnjeg standarda: χ ([²H₁₀]-3-SH)=200 ng L⁻¹ te χ ([²H₅]-3-SHA)=100 ng L⁻¹

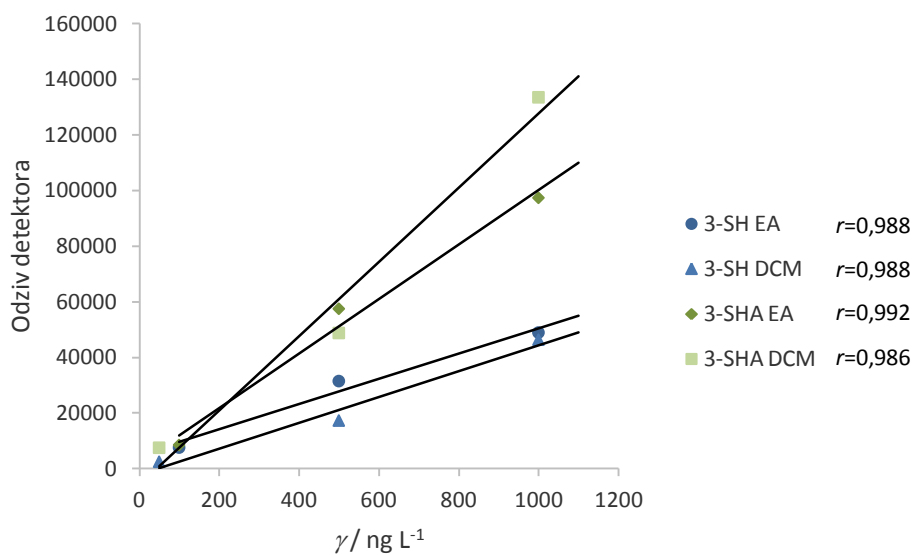


Slika 4.33. GC-MS/MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola i unutarnjih standarda snimljen tehnikom MRM za uzorke eksperimentalnog vina s najvišim masenim koncentracijama dodanih standarda: $\gamma(3\text{-SH})=500 \text{ ng L}^{-1}$ te $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$. Masene koncentracije dodanog unutarnjeg standarda: $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$ te $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$

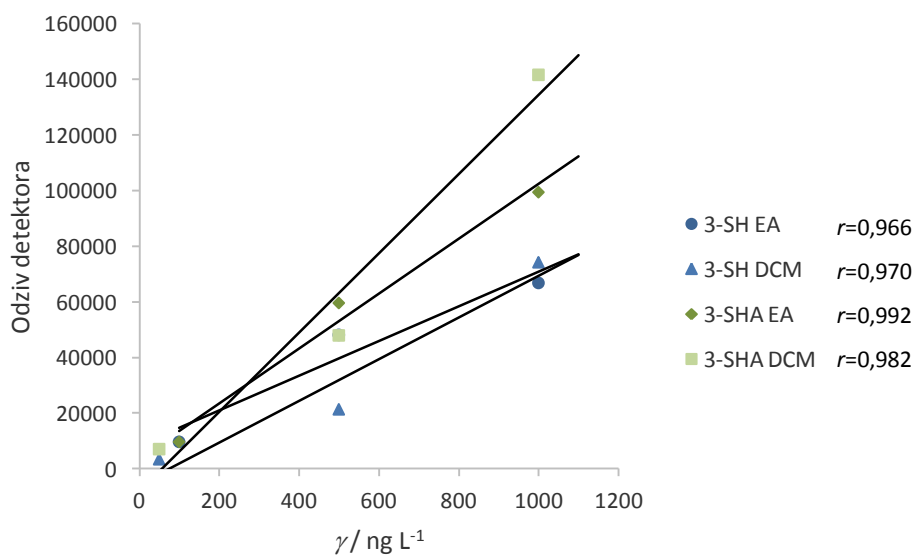
Primjenom tehnike MRM poboljšani su osjetljivost i selektivnost metode, čime je omogućeno određivanje nižih masenih koncentracija analita u realnim uzorcima vina. Radi postizanja što nižih vrijednosti granice detekcije i određivanja sortnih tiola u vinu uspoređena je učinkovitost triju MRM-metoda analizom spojeva eluiranih sa SPE-sorbensa etil-acetatom i diklormetanom (poglavlje 4.2.5) prilikom ekstrakcije na čvrstoj fazi.

S obzirom na sastav neutralnog vina čija je matrica sličnija sastavu eksperimentalnih vina nego modelnih vina i očekivani raspon masenih koncentracija sortnih tiola u eksperimentalnim vinima, kao prikladniji eluens korišten u analizi eksperimentalnih vina odabran je etil-acetat. Unatoč tome, razvijene MRM-metode istražene su analizom eluata pripremljenih u oba otapala uz tri koncentracijske razine dodatka standarda (Slika 4.34) kako bi se provjerilo utječe li izbor otapala na linearnost odziva detektora i omjer signala i šuma osnovne linije u snimljenim kromatogramima te postigla najveća osjetljivost analize.

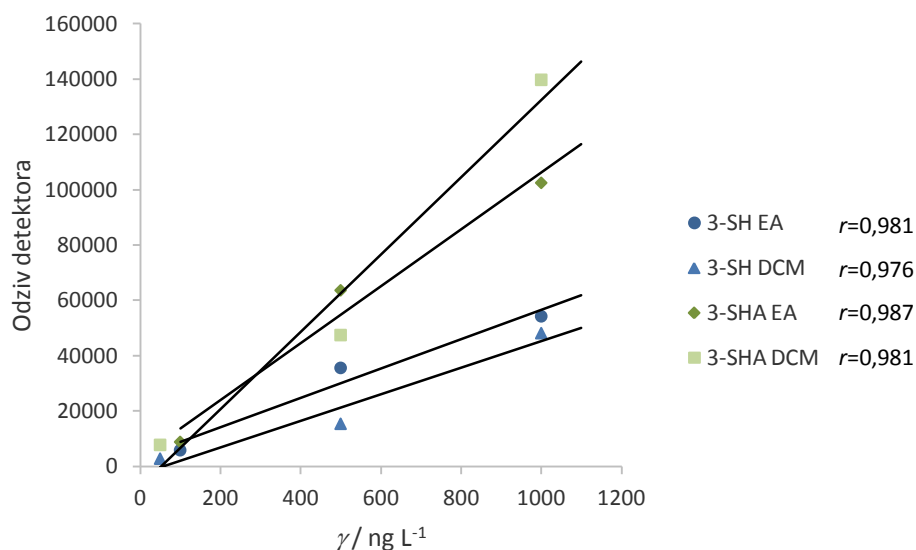
a)



b)



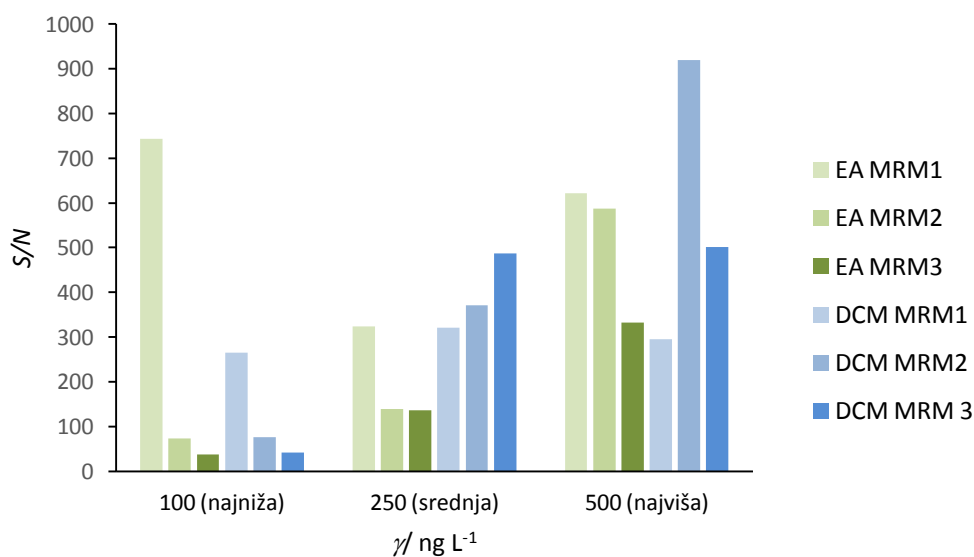
c)



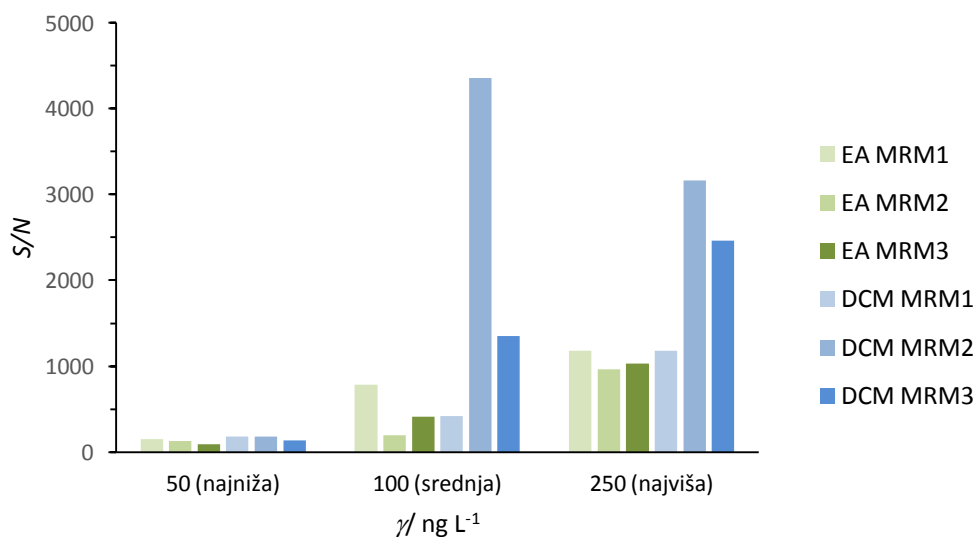
Slika 4.34. Linearnost odziva detektora pri analizi otopina ETP-derivata sortnih tiola nakon provedbe derivatizacije u neutralnom vinu i eluiranja sa SPE-sorbensa primjenom dvaju različitih otapala. a) 1. MRM-metoda; b) 2. MRM-metoda; c) 3. MRM-metoda. (EA – etil-acetat, DCM – diklormetan)

Uspoređene su vrijednosti omjera signala i šuma osnovne linije u kromatogramima snimljenima različitim MRM-metodama. Na **Slici 4.35a** prikazane su vrijednosti omjera postignute primjenom triju MRM-metoda uz eluiranje tiola 3-SH sa SPE-sorbensa etil-acetatom odnosno diklormetanom. Na **Slici 4.35b** prikazane su iste vrijednosti za sortni tiol 3-SHA. Iako su metodama MRM2 i MRM3 pri analizi eluata u diklormetanu postignute veće vrijednosti omjera signala i šuma, optimirana metoda provedena je isključivo uz eluiranje spojeva etil-acetatom. Razlog su veće vrijednosti omjera signala i šuma pri najnižoj masenoj koncentraciji dodanog tiola 3-SHA, koji ima niži mirisni prag detekcije od tiola 3-SH. Uz povoljniji omjer signala i šuma, metoda MRM1 korištena je prilikom analize eksperimentalnih vina zbog boljih parametara regresijskog pravca (**Slika 4.34a**) u odnosu na druge dvije MRM-metode.

a)



b)

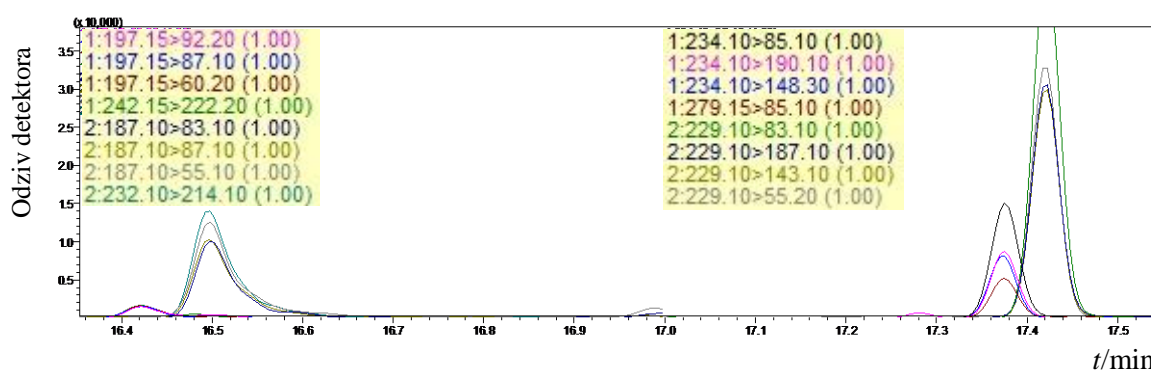


Slika 4.35. Usporedba omjera signala i šuma osnovne kromatografske linije prilikom analize otopina derivata tiola a) 3-SH, b) 3-SHA primjenom triju MRM-metoda i uz eluiranje spojeva sa SPE-sorbensa s dva različita otapala (EA – etil-acetat, DCM – diklormetan). Analiza provedena pri tri koncentracijske razine

4.4.3. Linearnost odziva tandemnog spektrometra masa i granice detekcije i određivanja sortnih tiola u vinu

Optimirani su uvjeti plinskokromatografske analize sortnih tiola 3-SH i 3-SHA na plinskokromatografskoj koloni Rxi-5MS uz detekciju spojeva tandemnom spektrometrijom masa s trostrukim kvadrupolom. U **Tablici 4.1** prikazan je redoslijed ispiranja sortnih tiola i deuteriranih izotopomera s plinskokromatografske kolone i njihova vremena i indeksi zadržavanja. Standardi za deuterirane izotopomere ne postoje na tržištu te su ovi spojevi identificirani analizom standardnih otopina i usporedbom spektara masa sa spektrima izvornih sortnih tiola, na temelju razlika masa fragmentnih iona prisutnih zbog poznatog stupnja deuteriranja.

Uspješno su unutar 20 minuta razdvojeni derivati analita 3-SH i izotopomera analita. Nije bilo moguće u potpunosti razdvojiti derivate analita 3-SHA i njegovog izotopomera (**Slika 4.11**). S obzirom na specifičnost detekcije spojeva spektrometrijom masa (SIM, MRM) bilo je moguće detektirati i identificirati ovaj analit i njegov izotopomer praćenjem specifičnih fragmentnih iona (**Slika 4.12**) odnosno praćenjem višestrukih reakcija (**Slika 4.36**). Karakteristični fragmentni ioni korišteni su za razvoj MRM metode za kvantifikaciju obaju sortnih tiola i deuteriranih izotopomera.

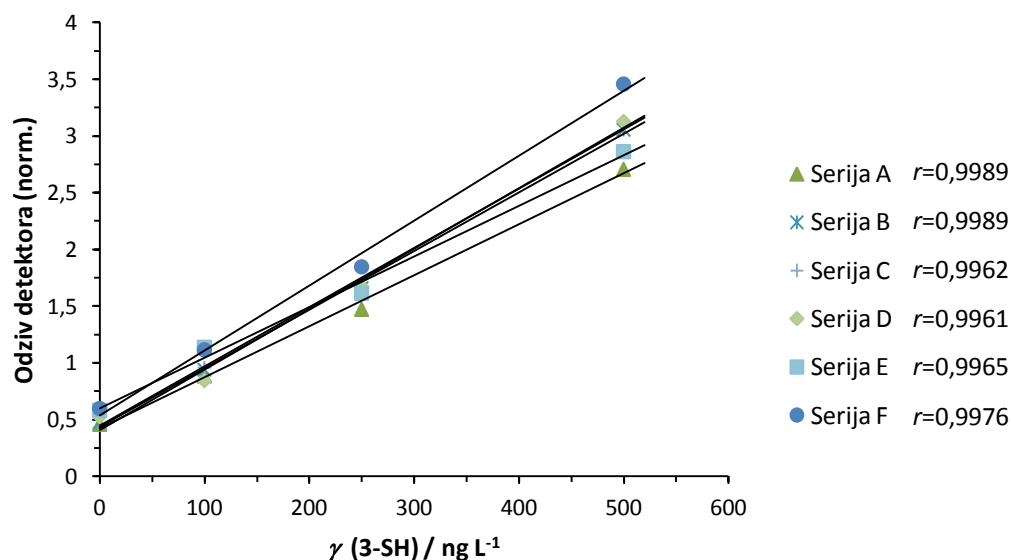


Slika 4.36. GC-MS/MS-kromatogram fragmentnih iona smjese ETP-derivata sortnih tiola i unutarnjih standarda snimljen tehnikom MRM uz naznačene odabrane praćene prijelaze

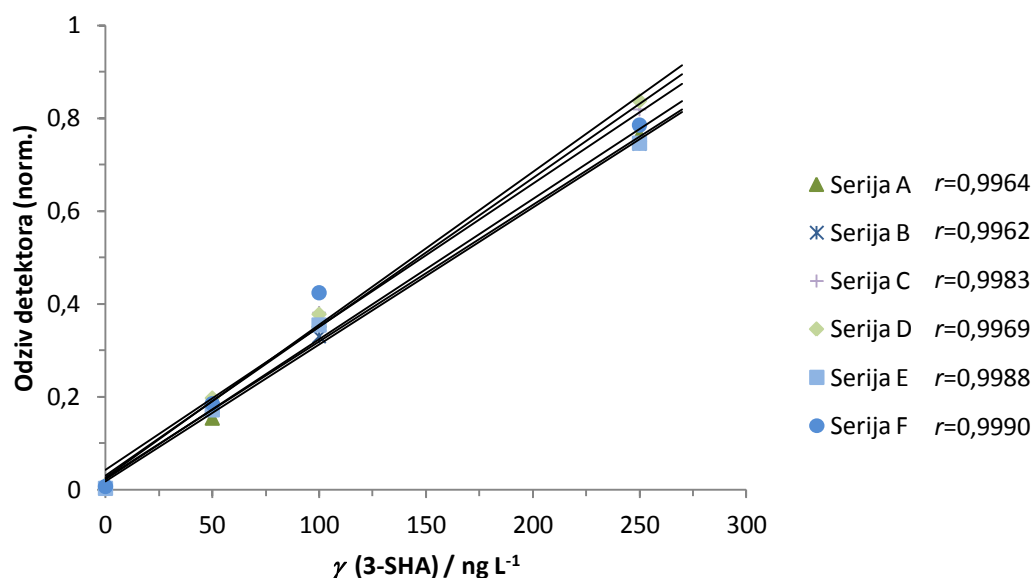
Linearnost odziva tandemnog spektrometra masa istražena je analizom niza ETP-derivata sortnih tiola pripremljenih u modelnom vinu u koje su dodane standardne otopine sortnih tiola uz derivatizaciju etil-propiolatom, ekstrakciju na čvrstoj fazi i eluiranje etil-acetatom. Masene koncentracije standardnih otopina sortnih tiola prikazane su u **Tablici 3.3**. Linearnom regresijom normaliziranih površina kromatografskih signala i masenih koncentracija pojedinih spojeva u standardnim otopinama od 50 ng L^{-1} do 1000 ng L^{-1} za sortni tiol 3-SH te od 10 ng L^{-1} do 50 ng L^{-1} za sortni tiol 3-SHA utvrđen je linearan odziv MS/MS-a za oba spoja uz koeficijente korelacije r u rasponu od 0,995 do 0,999.

Zbog primjene normalizacije odziva detektora (kromatografskog signala) za analizirane tirole odzivom detektora za unutarnji standard, masene koncentracije sortnih tiola određene su iz nagiba baždarnih pravaca konstruiranih zasebno za svaku seriju eksperimentalnih vina A-F. Tako je dodatno istražena linearnost odziva spektrometra masa analizom eluata eksperimentalnih vina. Odziv detektora bio je linearan (**Slika 4.37**) za oba sortna tiola u istraženom koncentracijskom području. Koeficijenti korelacije r odziva detektora (normalizirane površine kromatografskih signala) i masene koncentracije tiola u uzorku bili su u rasponu od 0,9961 do 0,9989 za tiol 3-SH i od 0,9962 do 0,9990 za tiol 3-SHA.

a)



b)



Slika 4.37. Baždarni pravci za plinskromatografsko određivanje a) 3-SH i b) 3-SHA u vinu tehnikom GC-MS/MS uz derivatizaciju tiola etil-propiolatom. Masene koncentracije unutarnjih standarda: $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$

Granice detekcije i određivanja spojeva u vinima određene su iz kromatograma ETP-derivata ekstrahiranih iz uzoraka vina u koje su sortni tioli dodani u poznatim masenim koncentracijama. Ekstrakti su pripremljeni nakon derivatizacije etil-propiolatom, a granice detekcije i određivanja određene su prema formulama u radu Metafa i suradnika.³⁷⁶ Granice detekcije određene su kao omjer trostrukog umnoška relativne standardne devijacije signala standarda i nagiba regresijskog pravca, a granice određivanja kao omjer deseterostrukog umnoška relativne standardne devijacije signala standarda i nagiba regresijskog pravca (**Tablica 4.5**). Postignute granice detekcije sortnih tiola analiziranih uz primjenu derivatizacije i detekcije MS/MS-om slične su ranije objavljenim vrijednostima, uz nekolicinu metoda kojima je postignuta veća osjetljivost analize sortnih tiola.²⁷² Unatoč značajnom povećanju osjetljivosti analize razvojem MRM-metode, granica određivanja sortnog tiola 3-SHA nije snižena ispod njegovog mirisnog praga detekcije ($4,2 \text{ ng L}^{-1}$) te metoda nije u potpunosti ispunila zahtjeve praćenja prisutnosti ovog analita u vinima.

Tablica 4.5. Linearnost odziva MS/MS-a i granice detekcije i određivanja sortnih tiola 3-SH i 3-SHA u eksperimentalnim vinima

	Serijski Analit	A	B	C	D	E	F
Raspon masenih koncentracija u radnim standardima/ ng L⁻¹	3-SH	0-500					
	3-SHA	0-250					
Koeficijent korelacije <i>r</i>	3-SH	0,9989	0,9989	0,9962	0,9961	0,9965	0,9976
	3-SHA	0,9964	0,9962	0,9983	0,9969	0,9988	0,9990
Jednadžba regresijskog pravca	3-SH	y= 0,0045+0,4259	y= 0,0052+0,4326	y= 0,0052+0,449	y= 0,0053+0,4092	y= 0,0045+0,6011	y= 0,0057+0,5383
	3-SHA	y= 0,003+0,0217	y= 0,0029+0,0176	y= 0,0032+0,0306	y= 0,0033+0,0262	y= 0,0029+0,0246	y= 0,0031+0,0423
GD/ ng L⁻¹	3-SH	4,99					
	3-SHA	1,80					
GO/ ng L⁻¹	3-SH	16,65					
	3-SHA	6,02					

4.4.4. Djelotvornost ekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi

Djelotvornost i ponovljivost postupka analize sortnih tiola u vinu određena je analizom eksperimentalnih vina u koja su dodani standardi sortnih tiola poznatih masenih koncentracija na tri razine: $\gamma(3\text{-SH})=500 \text{ ng L}^{-1}$, 250 ng L^{-1} i 50 ng L^{-1} , odnosno $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$, 100 ng L^{-1} i 10 ng L^{-1} neposredno prije derivatizacije i ekstrakcije na čvrstoj fazi te uz primjenu odabrane MRM-metode za kvantifikaciju spojeva MS/MS-om. Masene koncentracije pojedinih sortnih tiola određene u ekstraktima korigirane su za masenu koncentraciju istih spojeva izvorno prisutnih u uzorcima. U **Tablici 4.6** prikazane su srednje vrijednosti i relativne standardne devijacije analitičkih povrata sortnih tiola iz eksperimentalnih vina A-F pri različitim masenim koncentracijama pojedinog spoja u uzorcima vina. Analitički povrati spojeva eluiranih sa SPE-sorbensa etil-acetatom bili su u rasponu od 68 % do 114 % uz relativne standardne devijacije od 1 % do 19 % za tiol 3-SH, te u rasponu od 88 % do 113 % uz relativne standardne devijacije od 1 % do 12 % za tiol 3-SHA. Analitički povrati spojeva eluiranih sa SPE-sorbensa diklormetanom imali su veći raspon, od 65 % do 119 % za tiol 3-SH te od 62 % do 100 % za tiol 3-SHA. Pri najvišim masenim koncentracijama tiola 3-SH analitički povrati bili su od 99 % do 100 %, pri srednjim od 84 % do 91 % te pri najnižim od 68 % do 114 %. Analitički povrati tiola 3-SHA pri najvišim masenim koncentracijama bili su od 98 % do 103 %, pri srednjim od 88 % do 103 % te pri najnižim od 95 % do 113 %. Relativne standardne devijacije bile su uglavnom veće pri analizi tiola 3-SH.

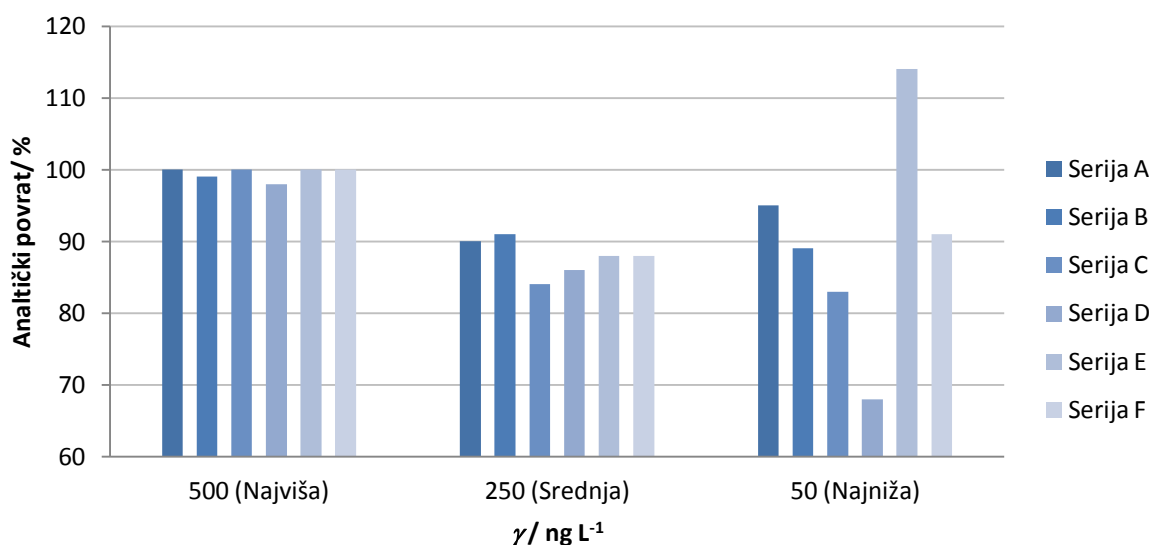
Tablica 4.6. Analitički povrati sortnih tiola iz eksperimentalnih vina A-F određeni primjenom SPE i GC-MS/MS-analize. Prikazane su srednje vrijednosti i relativne standardne devijacije triju određivanja. Masene koncentracije dodanog standarda 3-SH i 3-SHA: najviša (500 ng L^{-1} i 250 ng L^{-1}), srednja (250 ng L^{-1} i 100 ng L^{-1}), najniža (50 ng L^{-1} i 10 ng L^{-1})

Uzorak vina	Koncentracija tiola u vinu	Povrat / %	RSD / %	Povrat / %	RSD / %
		3-SH		3-SHA	
A	Najviša	100	6	100	1
	Srednja	90	11	94	8
	Najniža	95	18	95	7

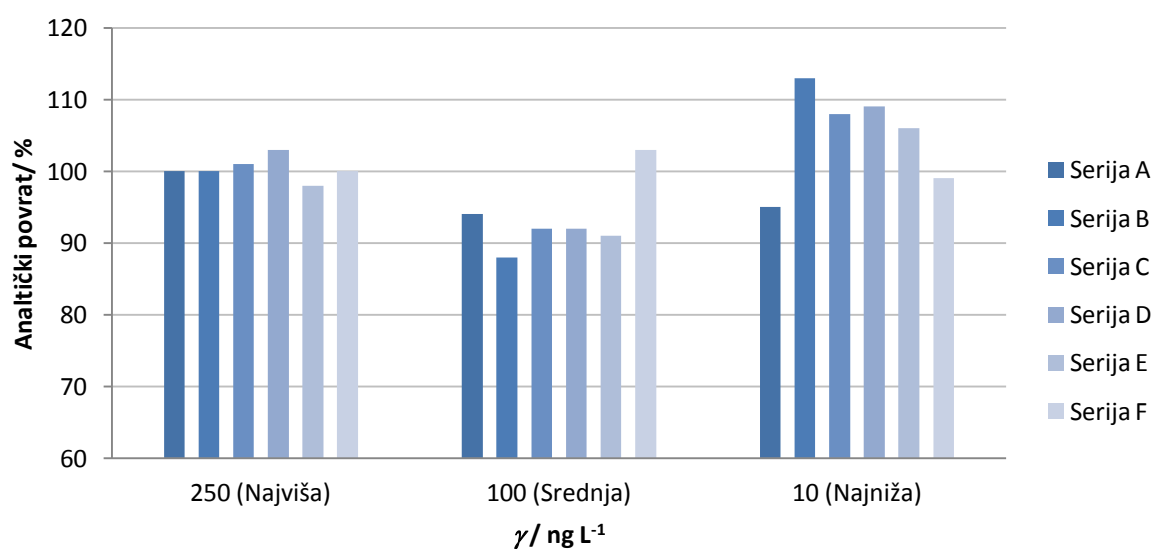
Tablica 4.6. (Nastavak)

Uzorak vina	Koncentracija tiola u vinu	Povrat / %	RSD / %	Povrat / %	RSD / %
		3-SH		3-SHA	
B	Najviša	99	10	100	6
	Srednja	91	14	88	2
	Najniža	89	1	113	8
C	Najviša	100	4	101	3
	Srednja	84	1	92	4
	Najniža	83	1	108	12
D	Najviša	98	5	103	2
	Srednja	86	1	92	1
	Najniža	68	9	109	6
E	Najviša	100	3	98	1
	Srednja	88	4	91	9
	Najniža	114	19	106	7
F	Najviša	100	7	100	4
	Srednja	88	2	103	6
	Najniža	91	7	99	2

Za oba sortna tiola najveće su razlike analitičkih povrata zabilježene pri najnižoj razini obogaćenja uzorka dodatkom standarda tiola (**Slike 4.38** i **4.39**). Djelotvornost i ponovljivost ekstrakcije na čvrstoj fazi za oba su analita zadovoljavajuće, posebice ako se uzmu u obzir niske masene koncentracije sortnih tiola u eksperimentalnim vinima te provedba reakcije derivatizacije kojom se analiti kemijski modificiraju.



Slika 4.38. Usporedba analitičkih povrata tiola 3-SH određenih primjenom SPE i GC-MS/MS-analize nakon dodatka standarda u eksperimentalna vina A-F u tri različite masene koncentracije



Slika 4.39. Usporedba analitičkih povrata tiola 3-SHA određenih primjenom SPE i GC-MS/MS-analize nakon dodatka standarda u eksperimentalna vina A-F u tri različite masene koncentracije

4.4.5. Sadržaj sortnih tiola u uzorcima eksperimentalnih vina

Eksperimentalna vina analizirana u ovom radu proizvedena su od grožđa sorte Sauvignon bijeli (*Vitis vinifera L.*) s vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sauvignon bijeli je sorta bijeloga grožđa koja se uglavnom koristi za proizvodnju aromatičnih i suhih vina. Naglašene arome, jedna je od osnovnih bijelih sorti i uzgaja se u Austriji, Francuskoj, Hrvatskoj, Italiji i Kaliforniji, kao i u većini vinskih regija svijeta. Na specifičnu aromu Sauvignona bijelog značajno utječe klima, jer vina iz toplijih područja imaju tropsku, voćnu aromu, a u hladnijim područjima biljnu i zemljanu aromu.

U mošt od kojeg je proizvedena svaka serija eksperimentalnih vina prije taloženja je dodano 5 različitih (**Tablica 3.1**) enoloških antioksidacijskih preparata: Sumpovin, u dvije različite doze (serija A i B), Aromax (serija C), Aromax super (serija D), Aromax Gal (serija E) i Noxitan (serija F). Funkcija navedenih preparata je očuvanje i zadržavanje arome bijelih sorti grožđa te sprječavanje oksidacije aromatičnih spojeva u vinu, prije i za vrijeme alkoholne fermentacije.

Sumpovin je preparat kalijeva metabisulfita (10 %, w/v) čijim otapanjem u vodi se oslobađa 50 mg SO₂ po litri vina te koji onemogućava razvoj bakterija i divljih kvasaca koji se nalaze na bobicama grožđa te nakon procesa muljanja i prešanja dospijevaju u mošt gdje se lako razmnožavaju. Djeluje antioksidativno, odnosno sprječava posmeđivanje mošta, a time i smanjenje kakvoće vina. Primijenjen je u seriji A kao kontroli u uobičajenoj dozi od 1 mL L⁻¹ te u seriji B u dvostruko nižoj dozi.

Aromax je preparat kalijeva metabisulfita (50 %, w/v) i L-askorbinske kiseline (50 %, w/v) koji sprječava oksidaciju primarnih aroma uklanjanjem kisika iz mošta, uglavnom terpena, koji se mogu brzo degradirati u prisustvu otopljenog kisika neposredno kod muljanja i prešanja grožđa.

Aromax Super je preparat kalijeva metabisulfita (50 %, w/v), L-askorbinske kiseline (35 %, w/v) te smjese proantocijanidina i elagitanina (15 %, w/v). Ovaj preparat služi uklanjanju

peroksida koji nastaju pomoću oksidacijskih enzima te na taj način štiti aromatski potencijal bijelih vina i inhibira nastanak acetaldehida u vinu. U usporedbi s preparatima sulfite kiseline, zbog primjene kalijeva metabisulfita kao izvora hidrogensulfita ovim proizvodom snižava se sadržaj sumporovog dioksida u vinu.

Aromax Gal je preparat kalijeva metabisulfita (50 %, w/v), L-askorbinske kiseline (35 %, w/v) te pročišćenog galotanina (15 %, w/v). Osim vezanja kisika, štiti bijele moštove od promjene boje inhibicijom aktivnosti polifenol-oksidaza kao što su lakaza i tirozinaza. Inhibira razvoj autohtonih kvasaca i sprječava pojavu spontane fermentacije.

Noxitan je preparat kalijeva metabisulfita (50 %, w/v) i enološkog tanina (50 %, w/v) povećane aktivnosti protiv radikalskih vrsta, posebice nastanka peroksid-radikala, čime učinkovito čuva boju, primarne arome i aromatske prekursore vina.

Optimirane metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS i HS-SPME uz analizu sustavom GC-SCD korištene su da bi se odredile masene koncentracije sortnih tiola u šest serija eksperimentalnih vina. Vina su odabrana na temelju senzornih svojstava koja ukazuju na prisutnost sortnih tiola u ovim vinima. Uzorci serije A tretirani standardnim postupkom sumporenja pripravkom kalijeva metabisulfita služili su kao kontrola. Serija B tretirana je dvostruko manjom dozom pripravka kalijeva metabisulfita. Serije C-E tretirane su komercijalnim pripravcima aditiva u kojima kao izvor hidrogensulfita služi kalijev metabisulfit. Unutar ovih serija, aditiv dodan u seriju D sadržavao je još askorbinsku kiselinu, proantocijanidine i elagitanine, serija E askorbinsku kiselinu i galotanine, a serija F smjesu kalijeva bisulfita i enološki tanin, bez askorbinske kiseline. Serije D-F poslužile su za usporedbu učinka različitih vrsta tanina (elagitanini, galotanini i enološki tanin) u očuvanju sortnih tiola. Uzorci su bili iz berbe 2018. godine. Svi aditivi dodani su u mošt prije provedbe vinifikacije.

Istražen je utjecaj dodatka aditiva na aromatski profil i masene koncentracije sortnih tiola u proizvedenim vinima. Sastav i doze dodanih aditiva prikazani su u **Tablici 3.1**. U **Tablicama 4.7** i **4.8** prikazane su prosječne masene koncentracije sortnih tiola određene u vinima primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS.

Tablica 4.7. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SH u uzorcima eksperimentalnih vina određene vezanim sustavom plinski kromatograf - tandemni spektrometar masa (kolona Rxi-5MS) uz derivatizaciju tiola etil-propiolatom i ekstrakciju derivata na čvrstoj fazi

Seriya vina	$\gamma^a / \text{ng L}^{-1}$	RSD / %
A	94,8	7,3
B	86,8	13,5
C	86,9	16,8
D	76,9	3,8
E	135,0	3,3
F	95,0	13,0

^a srednja vrijednost triju određivanja

Tablica 4.8. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SHA u uzorcima eksperimentalnih vina određene vezanim sustavom plinski kromatograf - tandemni spektrometar masa (kolona Rxi-5MS) uz derivatizaciju tiola etil-propiolatom i ekstrakciju derivata na čvrstoj fazi

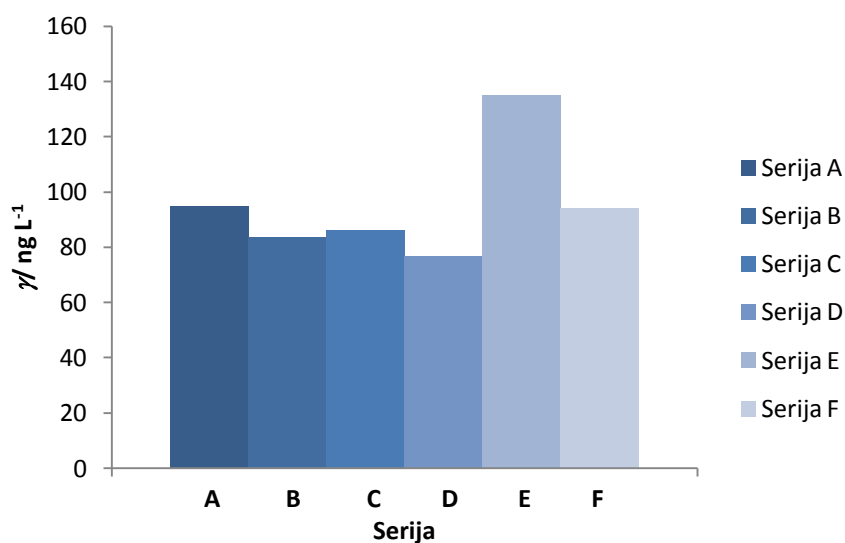
Seriya vina	$\gamma^a / \text{ng L}^{-1}$	RSD / %
A	7,2	1,4
B	6,1	3,5
C	9,7	3,9
D	8,0	1,8
E	8,4	4,4
F	13,8	1,7

^a srednja vrijednost triju određivanja

Predviđeno je da antioksidansi štite sorte tiola od degradacije jer djeluju kao zamjenski supstrat u reakcijama s *o*-kinonima, a brzine tih reakcija veće su od brzine reakcija *o*-kinonima sa sortnim tiolima.²³⁵ Nadalje, antioksidansi se dodaju u vino u masenoj koncentraciji do nekoliko mg L^{-1} , dok je masena koncentracija sortnih tiola obično od desetak do stotinjak ng L^{-1} i rijetko prelazi desetak $\mu\text{g L}^{-1}$ (**Tablica 2.8**). Istraživanjem kinetike reakcije kinona 4-metilkatehola sa spojevima nukleofilnog karaktera u vinu kao što su sortni tioli i različiti antioksidansi, utvrđeno je da hidrogensulfidni ion i glutation reagiraju s *o*-

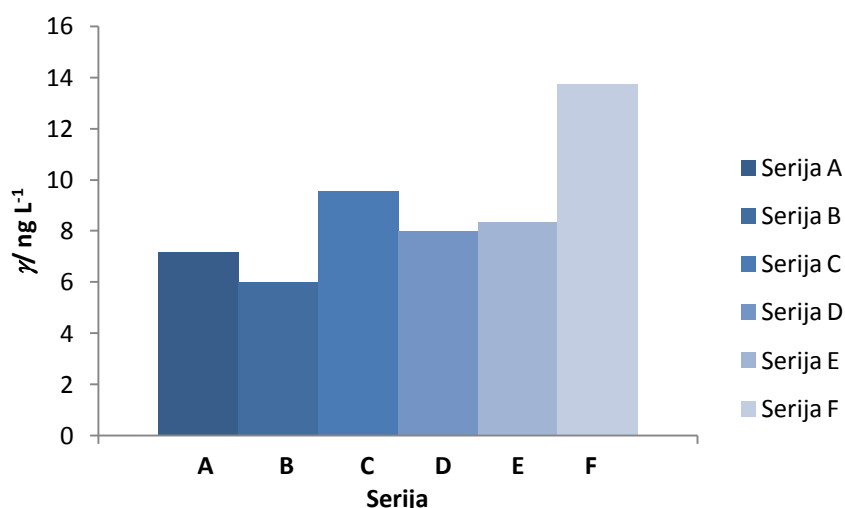
kinonima oko šest puta brže od tiola 3-SH, dok među sortnim tiolima konstanta brzine reakcije raste što je sulfanilna skupina manje sterički zaklonjena.²²⁸ Kada se u vino dodaje askorbinska kiselina, poželjno je primijeniti i tretman sumporenja vina radi redukcije nastalog vodikova peroksida i dehidroaskorbinske kiseline.²²⁹

Najbolje očuvanje sortnog tiola 3-SH (**Slika 4.40**) postignuto je u vinima tretiranim smjesom kalijeva metabisulfita, askorbinske kiseline i galotanina (serija E), dok je slabije očuvanje postignuto primjenom kalijeva metabisulfita i enološkog tanina (serija F). Primjenom smjese kalijeva metabisulfita i askorbinske kiseline (serija C) očuvanje tiola 3-SH nije bilo učinkovito. U vinima serije C su masene koncentracije tiola 3-SH bile niže nego u kontroli te se može zaključiti da sama askorbinska kiselina nije dovoljna za očuvanje sortnih tiola u vinu. Tretman vina antioksidacijskim preparatom koji je sadržavao još i proantocijanidine i elagitanine (serija D) rezultirao je vinima s najnižom koncentracijom ovog tiola. Prema nekim su autorima proantocijanidini imali pozitivan učinak na stabilnost aromatičnih spojeva, ali samo u crnim vinima, dok kod bijelih vina i sortnih tiola ovaj učinak nije toliko izražen.³⁷⁷ U serijama D-F zaštitno djelovanje tanina na tiol 3-SH postignuto je samo primjenom galotanina, dok ostali tanini nisu imali pozitivan učinak. Prema ranijim istraživanjima, prisutnost elagitanina u vinima negativno utječe na koncentracije sortnih tiola zbog ireverzne adicije tiola te bi se pripravci koji sadrže elagitanine općenito trebali izbjegavati.^{225, 226} Zaštitno djelovanje standardnog postupka sumporenja vina potvrđeno je u seriji B koja je sumporena manjom dozom kalijeva metabisulfita, a masena koncentracija oba sortna tiola bila je niža nego u kontroli sumporenoj dvostruko većom dozom (serija A). S praktičnog stajališta učinak sumporenja nije jako izražen te se radi očuvanja sortnog tiola 3-SH vina mogu sumporiti i manjom dozom pripravka kalijeva metabisulfita.



Slika 4.40. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SH određene primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS u eksperimentalnim vinima tretiranim različitim antioksidacijskim preparatima (Tablica 3.1)

Sortni tiol 3-SHA najbolje je očuvan (**Slika 4.41**) u vinu tretiranom preparatom kalijeva metabisulfita i enološkog tanina (serija F), dok je slabija zaštita postignuta primjenom kombinacije kalijeva metabisulfita i askorbinske kiseline (serija C). Ostali tretmani (serije D i E) imali su neznatan učinak na očuvanje sortnog tiola 3-SHA, uz bolji rezultat ostvaren tretmanom smjesom kalijeva metabisulfita, askorbinske kiseline i enološkog tanina (serija E). Primjena elagitanina i u slučaju ovog tiola imala je nepovoljan učinak na njegovo očuvanje (serija D). Ipak, razlike izmjerenih masenih koncentracija sortnog tiola 3-SHA u vinima D i E mogu se protumačiti i nepreciznošću metode zbog većih relativnih standardnih devijacija, te nije moguće donijeti jednoznačan zaključak usporedbom zaštitnog djelovanja aditiva u ove dvije serije. Za sortni tiol 3-SHA je kao i za sortni tiol 3-SH uočeno sniženje masene koncentracije u vinu tretiranom dvostruko manjom dozom kalijeva metabisulfita (serija B) u odnosu na kontrolu (serija A) što potvrđuje zaštitni učinak sumporenja vina.



Slika 4.41. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SHA određene primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS u eksperimentalnim vinima tretiranim različitim antioksidacijskim preparatima (Tablica 3.1)

4.4.6. Sadržaj sortnih tiola u uzorcima komercijalnih vina

Masene koncentracije sortnih tiola u austrijskim komercijalnim vinima određene su primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS. Za detekciju tiola spektrometrom masa korištena je metoda MRM1 razvijena i primijenjena za analizu sortnih tiola u eksperimentalnim vinima. Analizirane su tri serije komercijalnih austrijskih vina sorte Sauvignon bijeli. Odziv spektrometra masa bio je linearan za oba sortna tiola u istraženom koncentracijskom području. Koeficijenti korelacije r odziva detektora (normalizirane površine kromatografskih signala) i masene koncentracije tiola u uzorcima bili su u rasponu od 0,9927 do 0,9960 za tiol 3-SH i od 0,9827 do 0,9993 za tiol 3-SHA (**Slika 4.42**). Masene koncentracije sortnih tiola u komercijalnim vinima prikazane su u **Tablicama 4.9.** i **4.10.**

Tablica 4.9. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SH u uzorcima komercijalnih vina određene primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS (kolona Rxi-5MS) nakon derivatizacije etil-propiolatom

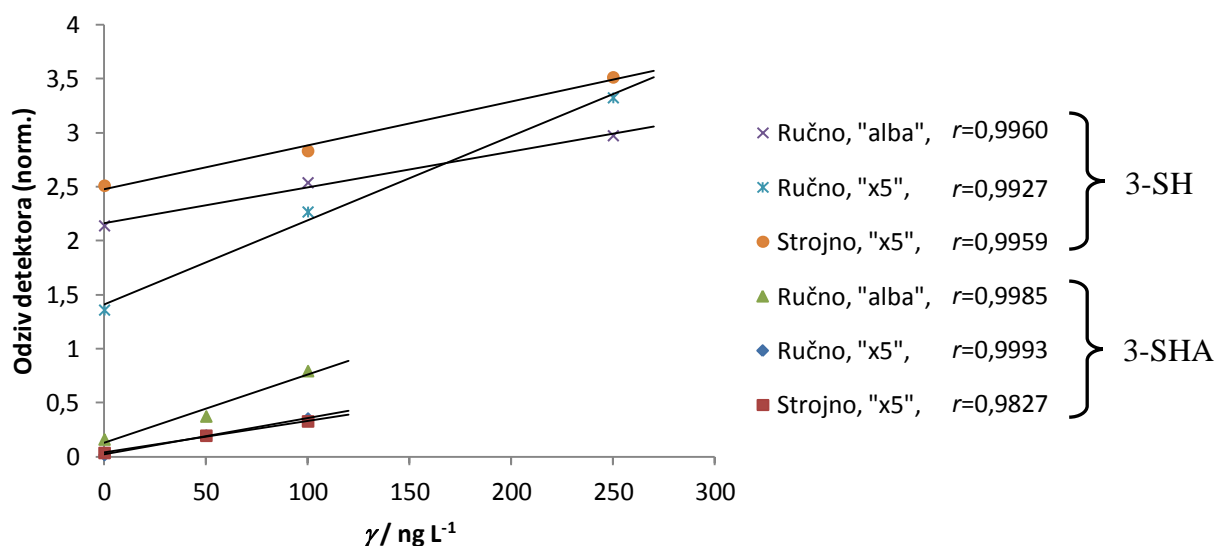
Uzorak vina	$\gamma^a / \text{ng L}^{-1}$	RSD / %
Silberberg strojno branje, kvasac „x5“	655	7
Silberberg ručno branje, kvasac „x5“	180	6
Silberberg ručno branje, kvasac „alba“	383	13

^a srednja vrijednost triju određivanja

Tablica 4.10. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SHA u uzorcima komercijalnih vina određene primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS (kolona Rxi-5MS) nakon derivatizacije etil-propiolatom

Uzorak vina	$\gamma^a / \text{ng L}^{-1}$	RSD / %
Silberberg strojno branje, kvasac „x5“	13	4
Silberberg ručno branje, kvasac „x5“	6	3
Silberberg ručno branje, kvasac „alba“	19	23

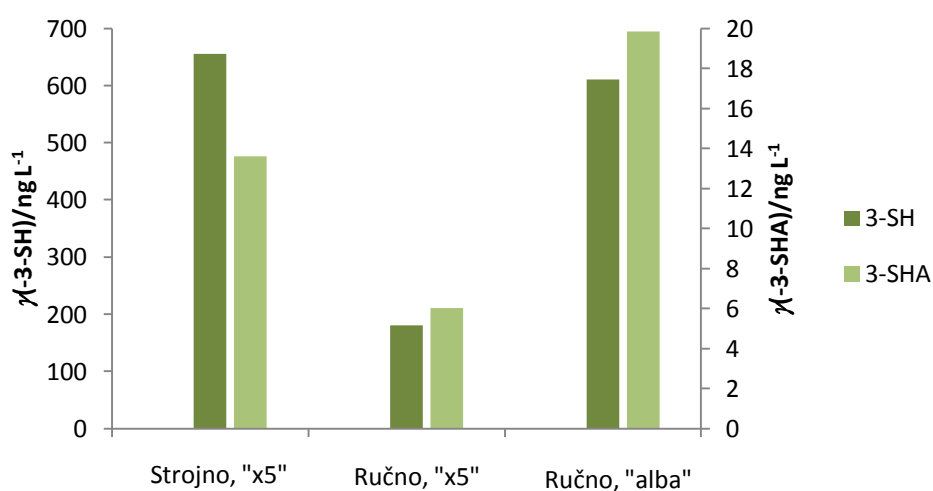
^a srednja vrijednost triju određivanja



Slika 4.42. Baždarni pravci za određivanje 3-SH i 3-SHA u komercijalnim sortnim vinima primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS nakon derivatizacije tiola etil-propiolatom. Masene koncentracije unutarnjih standarda: $\gamma([\text{}^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([\text{}^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$

Komercijalna vina razlikovala su se prema načinu na koji je provedena berba grožđa i soju kvasca korištenog za vinifikaciju, dok zaštitni tretmani i dodavanje aditiva nisu provedeni. Usporedbom rezultata prikazanih u **Tablicama 4.9** i **4.10** vidljivo je da je masena koncentracija sortnog tiola 3-SH u vinu proizvedenom od strojno ubranog grožđa bila oko četiri puta viša od koncentracija u vinu proizvedenom od ručno ubranog grožđa. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SHA bile su približno dvostruko više u vinu proizvedenom od strojno ubranog grožđa nego u vinu proizvedenom od ručno ubranog grožđa. Ovi su rezultati u skladu s ranije istraženim učinkom načina berbe na sadržaj sortnih tiola u vinu.^{197, 198}

Usporedbom rezultata analize sortnih tiola u dvije serije vina proizvedenih od ručno ubranog grožđa (**Slika 4.43**), vidljivo je da izbor kvasca može značajno poboljšati^{209,210} nastanak sortnih tiola u vinu od ručno ubranog grožđa. Moguće je proizvesti vina sa sličnim ili većim sadržajem sortnih tiola u odnosu na vina proizvedena uz strojnu berbu i uz primjenu sojeva kvasca sa slabije izraženom aktivnošću β -liaze.



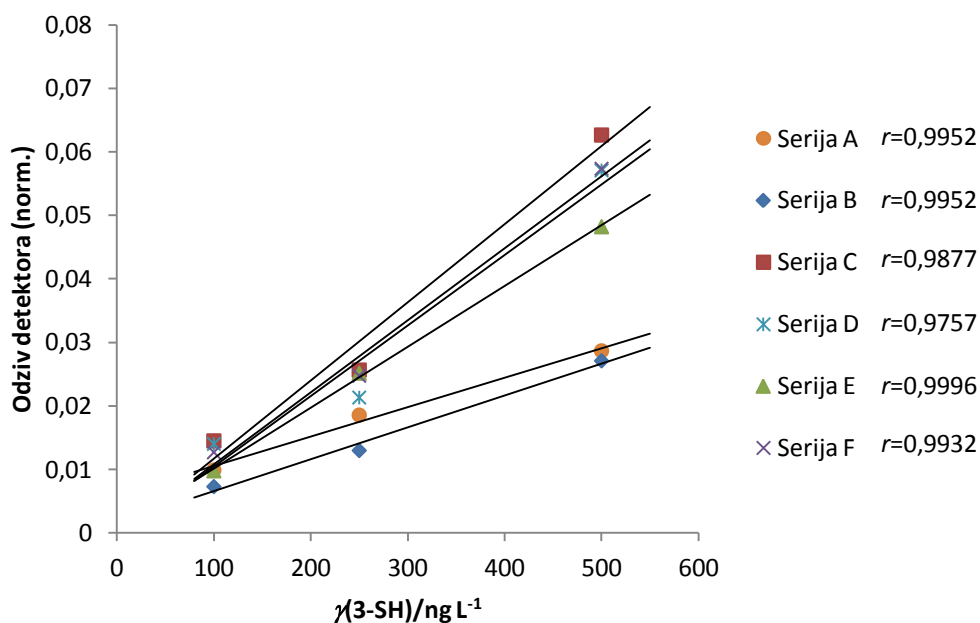
Slika 4.43. Masene koncentracije sortnih tiola u komercijalnim austrijskim vinima „Silberberg“ sorte Sauvignon bijeli određene primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS nakon derivatizacije tiola etil-propiolatom.

4.5. Kvantifikacija sortnih tiola u vinu primjenom HS-SPME i GC-SCD-analize

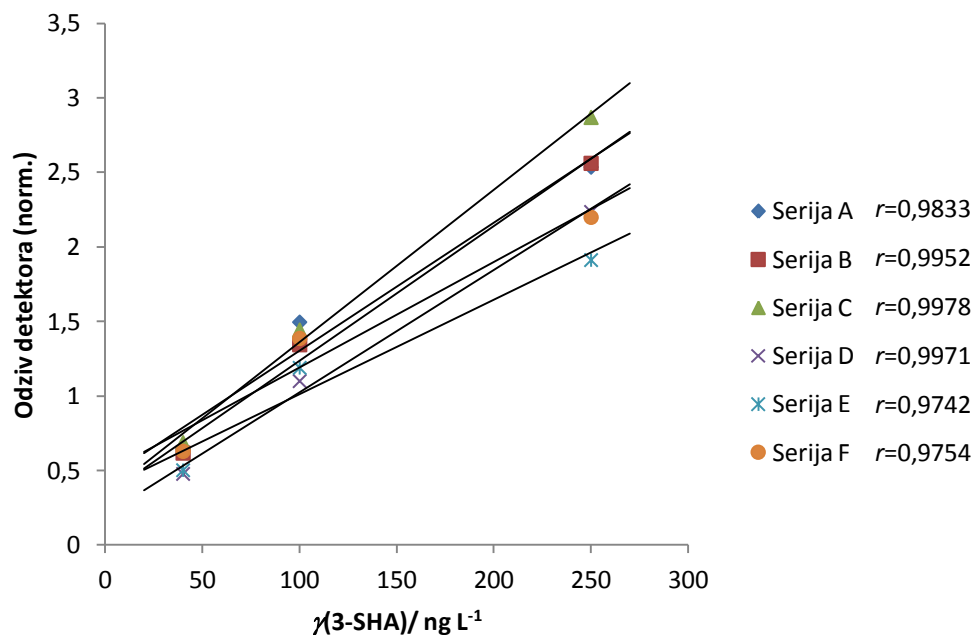
4.5.1. Linearnost odziva detektora kemiluminescencije sumpora i granice detekcije i određivanja sortnih tiola u vinu

Analiza sortnih tiola u eksperimentalnim vinima provedena je na koloni Rtx-5MS na kojoj su oba analizirana tiola bila dobro odvojena. Linearnost odziva detektora kemiluminescencije sumpora istražena je analizom niza standardnih otopina sortnih tiola pripremljenih u metanolu, masenih koncentracija analita u rasponu očekivanom u vinima. Odziv detektora kemiluminescencije sumpora bio je linearan za oba sortna tiola u istraženom koncentracijskom području (**Slika 4.44**). Koeficijenti korelacije r odziva detektora (normalizirane površine kromatografskih signala) i masene koncentracije tiola u uzorku bili su u rasponu od 0,9757 do 0,9996 za tiol 3-SH i od 0,9742 do 0,9978 za tiol 3-SHA.

a)



b)



Slika 4.44. Baždarni pravci za plinskrokromatografsko određivanje a) 3-SH i b) 3-SHA u eksperimentalnim vinima tehnikom GC-SCD na koloni Rtx-5MS. Masene koncentracije unutarnjih standarda: γ ($^{2}\text{H}_{10}$]-3-SH)=200 ng L $^{-1}$, γ ($^{2}\text{H}_{5}$]-3-SHA)=100 ng L $^{-1}$

Granica detekcije i određivanja pojedinih sortnih tiola u eksperimentalnim vinima A-F (**Tablica 4.11**) određena je na temelju kromatograma ekstrakta iz uzoraka vina u koje su u poznatim masenim koncentracijama dodani sortni tioli, uz metodologiju izračuna opisanu u poglavlju 4.4.3. U usporedbi s osjetljivošću detekcije spojeva MS/MS-om, osjetljivost detekcije SCD-om bila je niža. Detekcija SCD-om također ne ispunjava analitički zahtjev snižavanja granice detekcije sortnog tiola 3-SHA ispod njegovog mirisnog praga detekcije.

Tablica 4.11. Linearnost odziva SCD-a i granice detekcije i određivanja sortnih tiola 3-SH i 3-SHA u eksperimentalnim vinima

	Serijski Analit	A	B	C	D	E	F
Raspon masenih koncentracija u radnim standardima/ ng L⁻¹	3-SH	0-500					
	3-SHA	0-250					
Koeficijent korelacije <i>r</i>	3-SH	0,9952	0,9952	0,9877	0,9757	0,9996	0,9932
	3-SHA	0,9833	0,9952	0,9978	0,9971	0,9742	0,9754
Jednadžba regresijskog pravca	3-SH	$y = 0,000046x + 0,005895$	$y = 0,000050x + 0,001523$	$y = 0,000123x - 0,000691$	$y = 0,000111x - 0,000765$	$y = 0,000096x + 0,000567$	$y = 0,000114x - 0,000625$
	3-SHA	$y = 0,00859x + 0,44444$	$y = 0,00904x + 0,33208$	$y = 0,01022x + 0,33705$	$y = 0,00822x + 0,20211$	$y = 0,00635x + 0,37500$	$y = 0,00708x + 0,48365$
GD/ ng L⁻¹	3-SH	6,06					
	3-SHA	5,16					
GO/ ng L⁻¹	3-SH	19,01					
	3-SHA	16,08					

4.5.2. Djelotvornost mikroekstrakcije sortnih tiola iz eksperimentalnih vina na čvrstoj fazi

Djelotvornost i ponovljivost postupka analize sortnih tiola u vinu određena je analizom eksperimentalnih vina u koja su dodani standardi sortnih tiola poznatih masenih koncentracija na tri razine: $\gamma(3\text{-SH})=500 \text{ ng L}^{-1}$, 250 ng L^{-1} i 50 ng L^{-1} , odnosno $\gamma(3\text{-SHA})=250 \text{ ng L}^{-1}$, 100 ng L^{-1} i 10 ng L^{-1} , neposredno prije mikroekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine te uz kvantifikaciju SCD-om. Masene koncentracije pojedinih spojeva određene u ekstraktima korigirane su za koncentraciju istih spojeva izvorno prisutnih u uzorcima.

U **Tablici 4.12** prikazane su srednje vrijednosti i relativne standardne devijacije analitičkih povrata sortnih tiola iz eksperimentalnih vina A-F pri različitim masenim koncentracijama pojedinog spoja u vinu. Analitički povrati spojeva za analit 3-SH bili su u rasponu od 47 % do 97 % uz relativnu standardnu devijaciju od 4 % do 25 %, te za analit 3-SHA u rasponu od 25 % do 97 % uz relativnu standardnu devijaciju od 7 % do 22 %.

Pri najvišim masenim koncentracijama sortnog tiola 3-SH analitički povrati bili su od 91 % do 97 %, pri srednjim od 58 % do 90 % te pri najnižim od 47 % do 87 %. Analitički povrati tiola 3-SHA su pri najvišim masenim koncentracijama bili od 78 % do 95 %, pri srednjim od 80 % do 97 % te pri najnižim od 25 % do 67 %.

Tablica 4.12. Analitički povrati sortnih tiola iz eksperimentalnih vina A-F određeni primjenom HS-SPME i GC-SCD-analizom. Prikazane su srednje vrijednosti i relativne standardne devijacije triju određivanja. Masene koncentracije dodanog standarda 3-SH i 3-SHA: najviša ($\gamma=500 \text{ ng L}^{-1}$ i 250 ng L^{-1}), srednja ($\gamma=250 \text{ ng L}^{-1}$ i 100 ng L^{-1}), najniža ($\gamma=50 \text{ ng L}^{-1}$ i 10 ng L^{-1})

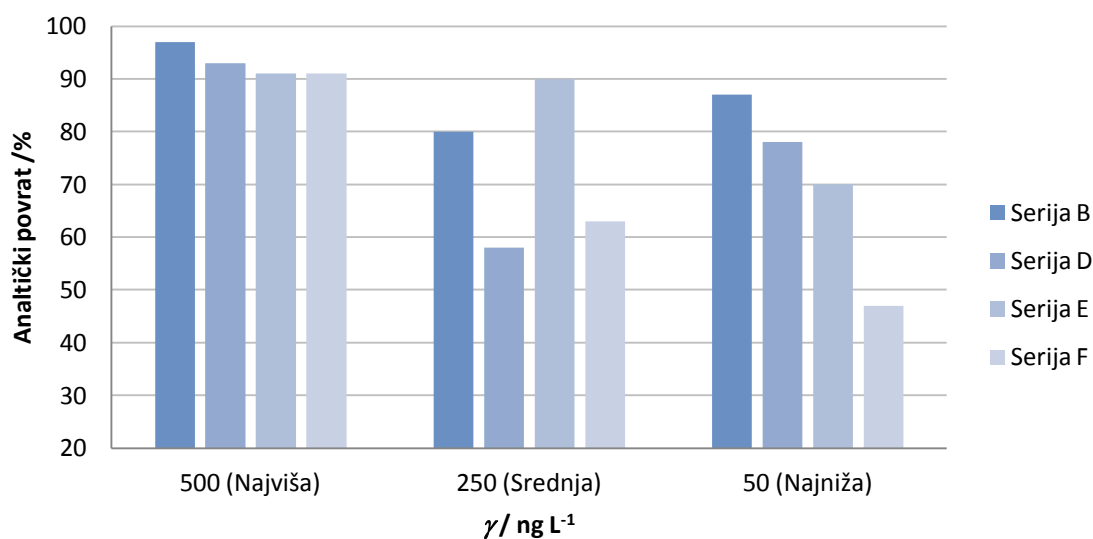
Uzorak vina	Koncentracija tiola u vinu	Povrat / %	RSD / %	Povrat / %	RSD / %
		3-SH		3-SHA	
A	Najviša	ND	-	82	9
	Srednja	ND	-	83	16
	Najniža	ND	-	39	7

Tablica 4.12. (Nastavak)

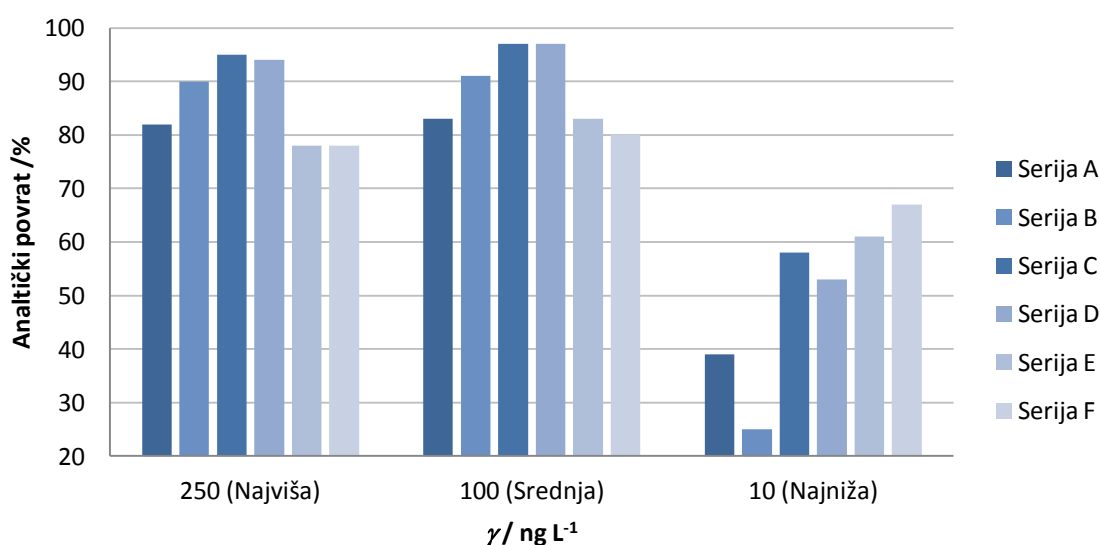
Uzorak vina	Koncentracija tiola u vinu	Povrat / %	RSD / %	Povrat / %	RSD / %
		3-SH		3-SHA	
B	Najviša	97	4	90	7
	Srednja	80	8	91	13
	Najniža	87	11	25	18
C	Najviša	ND	-	95	12
	Srednja	ND	-	97	18
	Najniža	ND	-	58	22
D	Najviša	93	18	94	8
	Srednja	58	25	97	18
	Najniža	78	11	53	15
E	Najviša	91	12	78	14
	Srednja	90	13	83	13
	Najniža	70	14	61	14
F	Najviša	91	11	78	11
	Srednja	63	20	80	10
	Najniža	47	22	67	13

ND: analit nije detektiran u uzorku

Relativne standardne devijacije analitičkih povrata uglavnom su bile veće pri analizi tiola 3-SH, osim u slučaju uzoraka vina serije B. Za oba sortna tiola najveće su razlike analitičkih povrata zabilježene pri najnižoj razini obogaćenja uzorka dodatkom standarda tiola (**Slike 4.45 i 4.46**). Djelotvornost ove metode za oba je analita niža od djelotvornosti postignute ekstrakcijom tiola na čvrstoj fazi i detekcijom tandemnim spektrometrom masa.



Slika 4.45. Usporedba analitičkih povrata tiola 3-SH određenih primjenom HS-SPME i GC-SCD-analize nakon dodatka standarda u eksperimentalna vina B, D, E i F u tri različite masene koncentracije

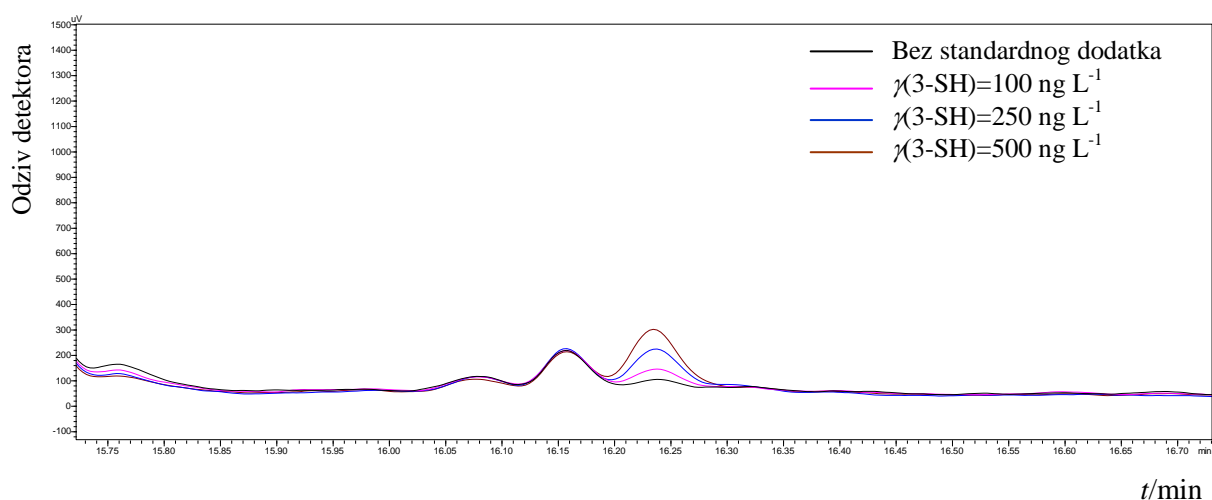


Slika 4.46. Usporedba analitičkih povrata tiola 3-SHA određenih primjenom HS-SPME i GC-SCD-analize nakon dodatka standarda u eksperimentalna vina A-F u tri različite masene koncentracije

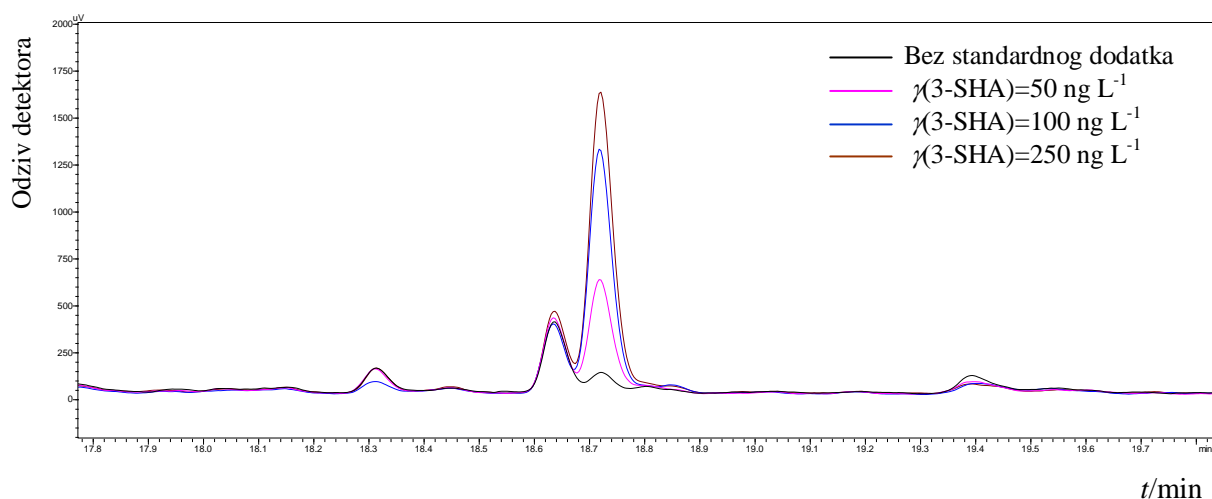
4.5.3. Sadržaj sortnih tiola u uzorcima eksperimentalnih vina

Sortni tioli određeni su primjenom HS-SPME i GC-SCD-analize u eksperimentalnim vinima (Slika 4.47), na kojima je proveden isti zaštitni tretman antioksidansima, dvije i pol godine nakon provedbe vinifikacije (Tablice 4.13 i 4.14). Kod ove su metode relativne standardne devijacije masenih koncentracija tiola bile značajno veće u usporedbi s metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi uz detekciju tehnikom GC-MS/MS (Tablice 4.7 i 4.8). Sortni tiol 3-SH nije pronađen u serijama vina A i C (Slika 4.48).

a)



b)



Slika 4.47. Kromatogrami sortnih tiola a) 3-SH i b) 3-SHA ekstrahiranih iz eksperimentalnog vina serije F metodom HS-SPME uz analizu sustavom GC-SCD. Masene koncentracije unutarnjeg standarda: $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH}) = 200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA}) = 100 \text{ ng L}^{-1}$

Tablica 4.13. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SH u uzorcima eksperimentalnih vina određene primjenom metode HS-SPME uz analizu sustavom GC-SCD bez primjene derivatizacije

Seriya vina	γ^a / ng L ⁻¹	RSD / %
A	-	-
B	48,2	8,2
C	-	-
D	26,2	18,7
E	19,2	12,2
F	39,1	20,9

^a srednja vrijednost triju određivanja

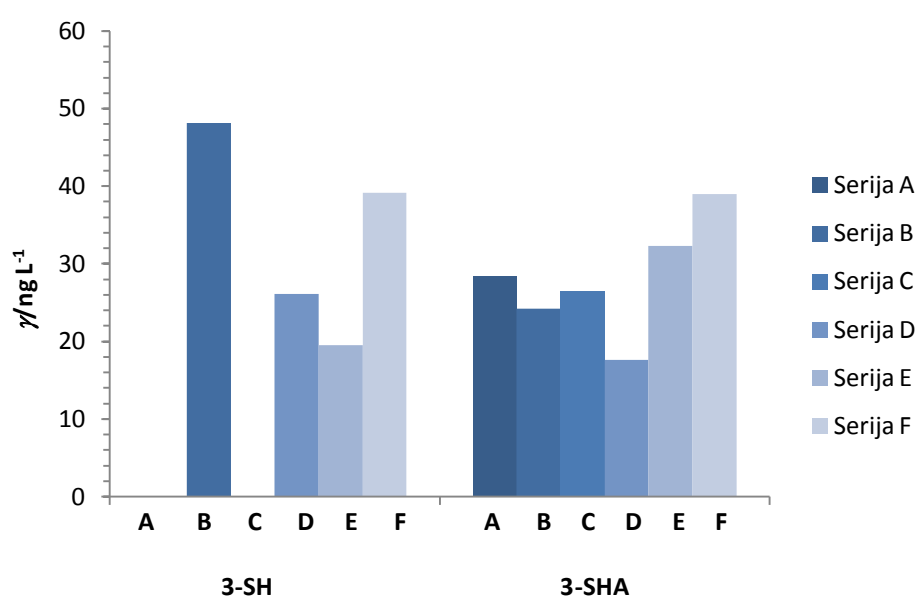
Tablica 4.14. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SHA u uzorcima eksperimentalnih vina određene primjenom metode HS-SPME uz analizu sustavom GC-SCD bez primjene derivatizacije

Seriya vina	γ^a / ng L ⁻¹	RSD / %
A	28,4	7,7
B	24,2	18,0
C	26,4	22,4
D	17,6	15,9
E	32,3	14,5
F	38,9	13,9

^a srednja vrijednost triju određivanja

Potrebno je pritom naglasiti kako serije vina C-F sadrže više masene koncentracije šećera u odnosu na serije A i B (Dodatak, **Tablica 8.3**), a prema ranijim je istraživanjima¹⁷⁶ uočeno da, uz etanol, šećeri u vinskoj matrici imaju najveći utjecaj na učinkovitost HS-SPME ekstrakcije sortnih tiola iz vina. Udio etanola među serijama vina A-F nije se značajnije razlikovao, dok je udio reducirajućih šećera serije vina C-F značajno viši u odnosu na vina tretirana klasičnim sumporenjem.

Analizom metodom HS-SPME uz detekciju sustavom GC-SCD masene koncentracije sortnog tiola 3-SH bile su najviše u seriji B koja je tretirana manjom dozom kalijeva metabisulfita, što je u suprotnosti s opažanjima dobivenima primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS. Primjena zaštitnih tretmana nije pozitivno utjecala na stabilnost ovog sortnog tiola, jer su u usporedbi sa serijom B u svim ostalim serijama izmjerene niže masene koncentracije. Sadržaj sortnog tiola 3-SH donekle je očuvan u vinima serije F tretiranim kalijevim metabisulfitom i enološkim taninima.



Slika 4.48. Masene koncentracije sortnih tiola određene primjenom metode HS-SPME uz analizu sustavom GC-SCD bez primjene derivatizacije uz vlakno sa sorbensom DVB/CAR/PDMS, u eksperimentalnim vinima tretiranim različitim antioksidacijskim preparatima (Tablica 3.1)

Za razliku od sortnog tiola 3-SH, sortni tiol 3-SHA kvantificiran je metodom HS-SPME uz analizu sustavom GC-SCD u svim serijama vina te je uočen sličan zaštitni utjecaj aditiva kao kod analize metodom SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS. Masene koncentracije sortnog tiola 3-SHA bile su najviše u uzorcima vina tretiranog kalijevim metabisulfitom i enološkim

taninima (serija F), dok je slabiji zaštitni učinak postignut primjenom kalijeva metabisulfita, askorbinske kiseline i galotanina (serija E). Tretman kombinacijom kalijeva metabisulfita i askorbinske kiseline (serija C) i kalijeva metabisulfita, askorbinske kiseline, proantocijanidina i elagitanina (serija D) rezultirao je vinima s nižom masenom koncentracijom tiola 3-SHA u odnosu na kontrolu. Kao što je utvrđeno primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS, tretman manjom dozom kalijeva metabisulfita (serija B) rezultirao je vinima niže masene koncentracije sortnog tiola 3-SHA.

Masene koncentracije sortnog tiola 3-SH u uzorcima eksperimentalnih vina općenito su niže u usporedbi s rezultatima određenim dvije godine ranije primjenom metode SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS. Koncentracije su snižene od 37 % do 85 %. Ova se pojava može pripisati degradaciji sortnog tiola 3-SH tijekom starenja vina, u skladu s opažanjima opisanim u ranijoj literaturi, prema kojima koncentracija sortnog tiola 3-SH doseže maksimum šest mjeseci nakon vinifikacije, a zatim počinje opadati.¹¹⁹ Nasuprot tome, masena koncentracija sortnog tiola 3-SHA porasla je s vremenom u svim serijama eksperimentalnih vina. Kako sortni tiol 3-SHA ne nastaje hidrolizom iz prekursora tijekom vinifikacije, već esterifikacijom hidroksilne skupine nastalog tiola 3-SH, može se pretpostaviti da se ravnoteža reakcije esterifikacije pomiče u desno, u smjeru nastanka tiola 3-SHA. Sniženje masene koncentracije sortnog tiola 3-SH objašnjava se i na ovaj način, ali je u ranijim radovima kao dominantan mehanizam istaknuta reakcija s *o*-kinonima, pa esterifikacijom nije moguće u potpunosti objasniti sniženje koncentracije tiola 3-SH uz istovremeni porast koncentracije tiola 3-SHA. Dodatkom aditiva djelomice se može objasniti porast koncentracije tiola 3-SHA. Aditivi ne utječu na ravnotežu esterifikacije, već isključivo na stabilnost sortnih tiola, pa je moguće da zbog njihovog djelovanja veća količina tiola 3-SH ostaje očuvana i sudjeluje u esterifikaciji. Odnos masenih koncentracija sortnog tiola 3-SH u vinu analiziranom godinu dana nakon vinifikacije i sortnog tiola 3-SHA u vinu analiziranom dvije i pol godine nakon vinifikacije je stalan, osim u vinima serije F (**Slike 4.40 i 4.48**). U slučaju tiola 3-SHA rezultati su u suprotnosti s ranijim istraživanjima, prema kojim se koncentracija tiola počinje snižavati neposredno nakon završetka vinifikacije.^{81,119} Međutim, potrebno je napomenuti da se ovdje uspoređuju rezultati postignuti dvjema različitim metodama, a ranija su istraživanja provedena na vinima u koja nisu dodana zaštitna sredstva korištena u ovom radu.

4.6. Identifikacija sortnih tiola u vinu metodom GCxGC-MS

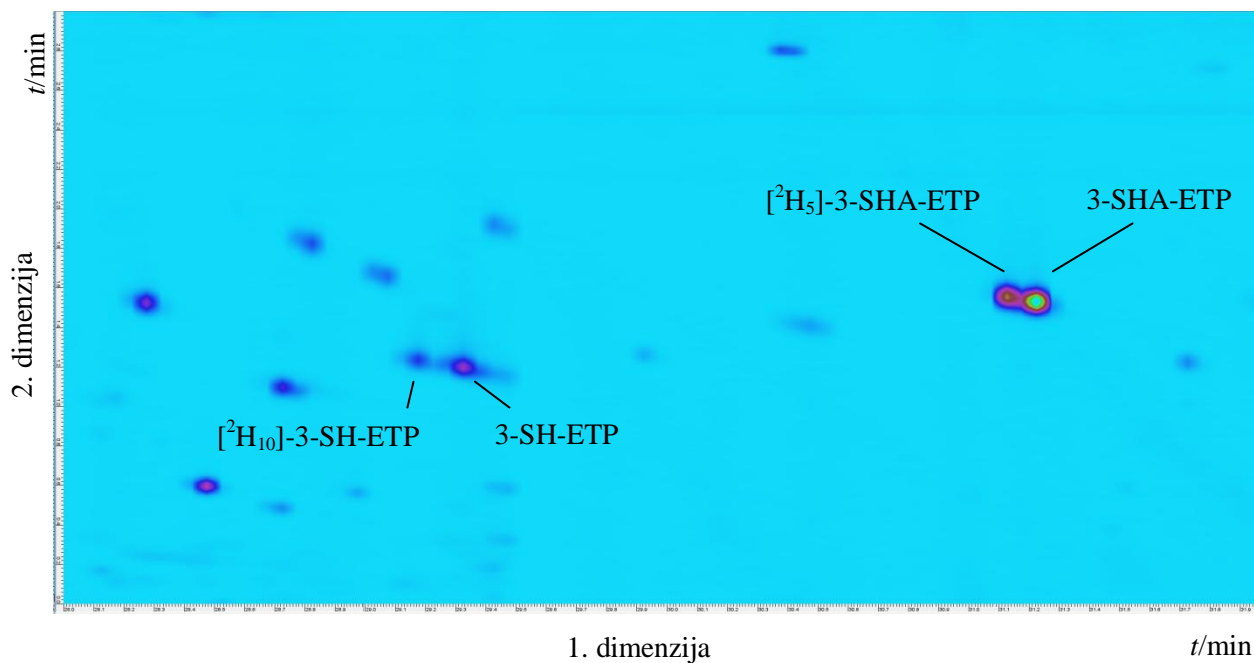
Identifikacija sortnih tiola ekstrahiranih iz vina na čvrstoj fazi provedena je vezanim sustavom sveobuhvatne plinske kromatografije i spektrometrije masa na kolonama Rxi-1HT (prva dimenzija) te Rtx-200 (druga dimenzija) uz radne uvjete opisane u poglavlju 3.5.9. Sortni tioli derivatizirani su u neutralnom vinu (postupak opisan u poglavlju 3.5.4). Ukoncentrirani eluati su nakon derivatizacije i ekstrakcije na čvrstoj fazi injektirani u plinski kromatograf i detektirani spektrometrom masa tehnikom SIM. Identifikacija signala analita u jedno- i dvodimenzijskom kromatogramu provedena je praćenjem iona vrijednosti m/z navedenih u **Tablici 4.3**. Vremena zadržavanja analita na primijenjenim kromatografskim kolonama navedena su u **Tablici 4.15**.

Tablica 4.15. Vremena zadržavanja ETP-derivata sortnih tiola i ETP-derivata deuteriranih izotopomera određena sveobuhvatnom plinskom kromatografijom na kolonama Rxi-1HT (prva dimenzija) te Rtx-200 (druga dimenzija).

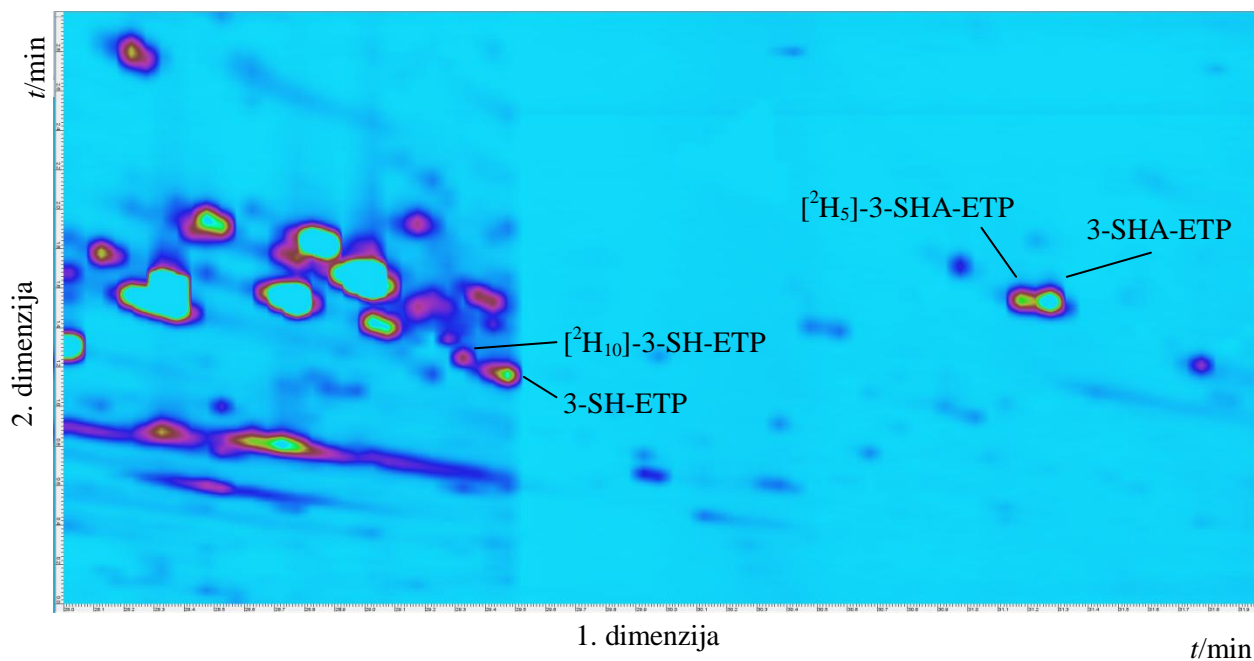
Spoj	t_R (1D) / min	t_R (2D) / min
3-SH-ETP	29,32	1,16
[² H ₁₀]-3-SH-ETP	29,27	1,23
3-SHA-ETP	31,22	1,52
[² H ₅]-3-SHA-ETP	31,12	1,58

Nakon derivatizacije sortnih tiola u neutralnom vinu, isti je postupak proveden s eksperimentalnim vinom serije A, uz iste uvjete GCxGC-MS analize (Dodatak, **Slika 8.15** i **8.16**).

Primjenom sveobuhvatne plinske kromatografije s nepolarnom nepokretnom fazom u prvoj i srednje polarnom nepokretnom fazom u drugoj dimenziji postignuto je dobro razdvajanje derivata svih analita. Kromatogram eluata pripremljenog ekstrakcijom iz eksperimentalnog vina sadržavao je značajno veći broj signala od kromatograma ekstrakta neutralnog vina (**Slike 4.49** i **4.50**).



Slika 4.49. Dvodimenzijanski GCxGC-MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola ekstrahiranih iz neutralnog vina. Frekvencija modulacije: 3 s^{-1}



Slika 4.50. Dvodimenzijanski GCxGC-MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola ekstrahiranih iz uzorka eksperimentalnog vina serije A. Frekvencija modulacije: 3 s^{-1}

U dvodimenzijском kromatogramu ekstrakta neutralnog vina (**Slika 4.49**) nisu opažene interferencije, odnosno spojevi koji bi mogli koeluirati s analitima ili unutaršnjim standardima prilikom analize GC-MS/MS-om. Međutim, u kromatogramu ekstrakta eksperimentalnog vina serije A (**Slika 4.50**) pojavljuje se signal koji u slučaju nezadovoljavajućeg razdvajanja može utjecati na kvantifikaciju sortnog tiola 3-SH ako se plinskrokromatografska analiza provodi jednodimenzijским tehnikama.

4.7. Aromatski profil uzoraka eksperimentalnih vina

Uz kvantifikaciju sortnih tiola provedena je analiza aromatskog profila eksperimentalnih vina metodom HS-SPME uz analizu sustavom GC-MS uz snimanje spektara masa tehnikom *full scan* (postupak opisan u poglavlju **3.5.10**). Skupina analita obuhvaćala je 12 viših alkohola, 34 estera masnih kiselina (C₂-C₁₀), 3 estera dikarboksilnih kiselina, 5 slobodnih masnih kiselina, 2 terpenoida, 4 aldehida i 2 heterociklička spoja. Identifikacija analita provedena je pomoću unaprijed zadane baze podataka poznatih vremena zadržavanja analita i vrijednosti *m/z* fragmentnih iona. Svi rezultati uneseni su u program Unscrambler i statistički obrađeni analizom glavnih komponenti kako bi se istražilo moguće grupiranje uzoraka eksperimentalnih vina prema sadržaju pojedinačnih aromatičnih spojeva. Na **Slici 4.51** prikazan je PCA-dijagram za uzorke eksperimentalnih vina A-F.



Slika 4.51. Distribucija eksperimentalnih vina u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema zastupljenosti sastavnica arome određenih metodom HS-SPME uz analizu sustavom GC-MS

Distribucija uzoraka u koordinatnom sustavu upućuje na klasteriranje serija eksperimentalnih vina C i D, koje pokazuju najveću međusobnu sličnost i pozicionirane su uglavnom u trećem kvadrantu. Uočava se sličnost aromatskog profila vina serija E i F, koja su pozicionirana između prvog i drugog kvadranta. Vina serija A i B, tretirana samo preparatom kalijeva metabisulfita, pozicionirana su u četvrtom kvadrantu, ali ne klasteriraju, što ukazuje na značajnu ovisnost aromatskog profila vina o primijenjenoj dozi kalijeva metabisulfita.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Sintetizirani su deuterirani izotopomeri sortnih tiola uz skromno ukupno iskorištenje. Deuterijevi atomi uvedeni su u ciljne produkte bilo kao deuterirani početni supstrati ili reakcijama redukcije s litijevim aluminijskim deuteridom ili acetiliranja deuteriranim acetil-kloridom.
- Istraženi su postupci derivatizacije sortnih tiola PFBBr-om i ETP-om. Metoda derivatizacije PFBBr-om uspješno je provedena samo u modelnom vinu te nije dalje testirana. Razvijena je i optimirana metoda derivatizacije ETP-om iz modelnog vina, neutralnog vina te eksperimentalnih i komercijalnih sortnih vina. Optimiranje metode uključivalo je primjenu različitih baza prilikom reakcije derivatizacije, primjenu aditiva i postupaka za sprječavanje degradacije analita te istraživanje trajanja reakcije derivatizacije. Optimirana metoda uključivala je dodatak natrijeva hidroksida i trajala je 10 minuta, dok primjena aditiva nije bila potrebna.
- Razvijena je i optimirana metoda ekstrakcije ETP-derivata sortnih tiola na čvrstoj fazi. Optimiranje metode uključivalo je primjenu različitih otapala za eluiranje derivata sa SPE-sorbensa te različite volumene otapala. Za razliku od ranije objavljenih postupaka, metoda SPE provedena je uz primjenu etil-acetata umjesto diklormetana za eluiranje derivata sa SPE-sorbensa.
- Istražen je postupak mikroekstrakcije sortnih tiola iz vina na čvrstoj fazi primjenom dvaju različitih sorbensa. Pri nižim masenim koncentracijama sortnih tiola bolji su rezultati postignuti primjenom sorbensa DVB/CAR/PDMS. Nederivatizirani sortni tiol 3-SH bilo je moguće ekstrahirati iz vina samo ovim postupkom, uz detekciju SCD-om.
- Istražen je postupak mikroekstrakcije ETP-derivata sortnih tiola na čvrstoj fazi iz eluata pripremljenog ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE i HS-SPME), odnosno iz ekstrakta pripremljenog nakon derivatizacije i ekstrakcije tekuće-tekuće (LLE i HS-SPME). Posljednji postupak uključivao je optimiranje otapala za LLE-ekstrakciju i temperature pri kojoj je provedeno izlaganje SPME-vlakna parama iznad otopine uzorka. Niti jednim od postupaka nije bilo moguće ekstrahirati derivat 3-SH-ETP, dok

su najbolji rezultati za derivat 3-SHA-ETP postignuti uz primjenu etil-acetata. Učinkovitost ekstrakcije bila je slična pri obje primijenjene temperature.

- Razvijena je metoda analize ETP-derivata sortnih tiola GC-MS/MS-om uz primjenu tehnike MRM nakon ekstrakcije tehnikom SPE. Postignuta je bolja osjetljivost i niži pragovi detekcije analita u usporedbi s većinom ranije objavljenih metoda plinskrokromatografske analize sortnih tiola. Postignuta granica određivanja sortnog tiola 3-SH bila je $16,65 \text{ ng L}^{-1}$, a sortnog tiola 3-SHA $6,02 \text{ ng L}^{-1}$. Postignuta granica određivanja niža je od mirisnog praga detekcije tiola 3-SH, ali nije zadovoljavajuća za određivanje tiola 3-SHA u vinu. U eksperimentalnim vinima je primjenom SPE i GC-MS/MS-analize utvrđena prisutnost sortnih tiola u masenim koncentracijama od $76,9 \text{ ng L}^{-1}$ do $135,0 \text{ ng L}^{-1}$ za tiol 3-SH i od $6,1 \text{ ng L}^{-1}$ do $13,8 \text{ ng L}^{-1}$ za tiol 3-SHA. Po prvi puta izmjereni su sortni tioli u hrvatskim vinima sorte Sauvignon bijeli.
- Razvijena je metoda analize sortnih tiola GC-SCD-om nakon ekstrakcije tehnikom HS-SPME. Postignuta granica određivanja sortnog tiola 3-SH bila je $19,01 \text{ ng L}^{-1}$, a sortnog tiola 3-SHA $16,08 \text{ ng L}^{-1}$. Postignuta granica određivanja tiola 3-SHA nije zadovoljavajuća jer je približno četiri puta viša od mirisnog praga detekcije ovog spoja u vinu. Osjetljivost ove metode bila je niža u usporedbi s metodom SPE uz analizu sustavom GC-MS/MS. U eksperimentalnim je vinima primjenom HS-SPME i GC-SCD-analize utvrđena prisutnost sortnih tiola u masenim koncentracijama od $19,2 \text{ ng L}^{-1}$ do $48,2 \text{ ng L}^{-1}$ za tiol 3-SH i od $17,6 \text{ ng L}^{-1}$ do $38,9 \text{ ng L}^{-1}$ za tiol 3-SHA. Vina su ovom metodom analizirana dvije godine nakon analize primjenom SPE-a i GC-MS/MS-a te je zapažena degradacija sortnog tiola 3-SH, ali i porast koncentracije sortnog tiola 3-SHA. Posljednje opažanje djelomice je u suprotnosti s ranijim istraživanjima. Preciznost i djelotvornost određivanja sortnih tiola primjenom HS-SPME i GC-SCD-analize bila je lošija od vrijednosti postignutih analizom derivata sortnih tiola primjenom SPE-a i analize sustavom GC-MS/MS.
- Analizom sortnih tiola sveobuhvatnom plinskom kromatografijom identificirani su ETP-derivati obaju analita u eksperimentalnim vinima.

- Istražen je utjecaj dodatka antioksidansa tijekom vinifikacije na masenu koncentraciju i očuvanje sortnih tiola u eksperimentalnim vinima sorte Sauvignon bijeli. Masene koncentracije sortnih tiola bile su najviše nakon tretmana vina preparatom kalijeva metabisulfita, askorbinske kiseline i galotanina, čime je potvrđen sinergistički utjecaj kalijeva metabisulfita i askorbinske kiseline na stabilnost sortnih tiola radi sprječavanja reakcije tiola s *o*-kinonima, kao i zaštitno djelovanje tanina na aromatične spojeve u vinu. Masene koncentracije sortnih tiola bile su najniže u vinima tretiranim kalijevim metabisulfitom u dozi dvostruko nižoj od kontrole, čime je potvrđen zaštitni učinak sumporenja vina na sortne tirole.
- Budući postupci analize sortnih tiola u vinima trebaju se temeljiti na razvoju izotopomera tiola obilježenih atomima ^2H ili ^{13}C na dijelovima molekule udaljenijim od sulfhidrilne skupine radi smanjenja utjecaja sekundarnog izotopnog učinka na ponovljivost i učinkovitost derivatizacije. Buduće metode trebaju primjenjivati i suvremene tehnike ionizacije i detekcije analita spektrometrijom masa kao orbitalnu stupicu, direktnu analizu u stvarnom vremenu ili primjenu analizatora masa Q-TOF visokog razlučivanja.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ADH – alkoholna dehidrogenaza	DMSO – dimetilsulfoksid
AED – atomski emisijski detektor	DPIS – dvostruko pretraživanje iona prekursora
AENM – akridon-10-etil- <i>N</i> -maleimid	DTDP – 4,4'-ditiodipiridin
AKR – aldo-ketoreduktaza	DVB – divinilbenzen
APCI – kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku	EA – etil-acetat
APS – 5'-adenilil-sulfat	ECD – detektor zahvata elektrona
ATP – adenzin-5'-trifosfat	EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina
BHA – butilirani hidroksianisol	EI – ionizacija elektronima
BQB – <i>ω</i> -bromacetonilkinolinijev bromid	ESI – ionizacija elektroraspršenjem
CAR – Carboxen (karboksen)	ETP – etil-propiolat
CI – kemijska ionizacija	FPD – plamenofotometrijski detektor
CW - Carbowax	GC-AED – plinska kromatografija s atomskim emisijskim detektorom
Cys – cistein	GC-ECD – plinska kromatografija s detektorom zahvata elektrona
D – dimenzija	GC-FID – plinska kromatografija s plamenoionizacijskim detektorom
DBU – 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en	GC-FPD – plinska kromatografija s plamenofotometrijskim detektorom
DCM – diklormetan	GCxGC – sveobuhvatna plinska kromatografija
DI-SPME – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine izravnim uranjanjem sorbensa u uzorak	GC-GC-MS/MS – plinska kromatografija odstranjivanjem najzastupljenijeg sastojka (<i>heartcutting</i>) uz detekciju tandemnom spektrometrijom masa
DLLME – mikroekstrakcija raspršenjem tekuće faze	GCxGC-TOFMS – sveobuhvatna plinska kromatografija sa spektrometrijom masa s analizatorom vremena leta

GC-MS – plinska kromatografija sa spektrometrijom masa	LLE – ekstrakcija tekuće-tekuće
GC-MS/MS (QqQ) – plinska kromatografija s tandemnom spektrometrijom masa s trostrukim kvadrupolom	Met – metionin
GC-O – plinska kromatografija s olfaktometrijom	2-MFT – 2-metil-3-furantiol
GC-PFPD – plinska kromatografija s pulsnim plamenofotometrijskim detektorom	MMSE – ekstrakcija na monolitnom sorbensu
GC-SCD – plinska kromatografija s detektorom kemiluminescencije sumpora	MRM – praćenje višestrukih reakcija
GC-TOFMS – plinska kromatografija sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena leta	4-MSP – 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on
GD – granica detekcije	4-MSPOH – 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ol
Glu – glutaminska kiselina	MS (Q) – spektrometar masa s kvadrupolom
Gly – glicin	MS (QqQ) – spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom
GO – granica određivanja (kvantifikacije)	NCI – negativna kemijska ionizacija
Gsh – glutation	NMR – spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije
HPLC-MS/MS – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s tandemnom spektrometrijom masa	OAV – aktivnost mirisa
HS – statička analiza para iznad otopine	PA – poliakrilat
HS-SPDE – dinamička ekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine	PAPS – 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat
HS-SPME – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine	PC – glavna komponenta
ITMS – spektrometar masa s kvadrupolnom stupicom za ione	PCA – analiza glavnih komponenti

PDMS – polidimetilsiloksan

PFBBBr – 2,3,4,5,6-pentafluorbenzil-bromid

PFPD – pulsni plameonofotometrijski
detektor

Phe – fenilalanin

p-HMB – *para*-hidroksiživin benzoat

PIPD – 1-(4-(1*H*-fenantro-9,10-imidazol-2-
il)fenil)-1*H*-pirol-5-dion

PIS - pretraživanje iona produkata

PT – dinamička analiza para iznad otopine

PTFE – politetrafluoroetilen

QSAR – kvantitativni odnos strukture i
aktivnosti

Q-TOF – analizator vremena leta s
kvadrupolom

QqQ – trostruki kvadrupol

RSD – relativna standardna devijacija

SBSE – sorpcijska ekstrakcija miješalom

SCD – detektor kemiluminescencije
sumpora

3-SH – 3-sulfanilheksan-1-ol

6-SH – 6-sulfanilheksan-1-ol

3-SHA – 3-sulfanilheksil-acetat

SIDA – tehnika izotopnog razrjeđenja

SIM – praćenje odabranog iona

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi

SPME – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

UV – ultraljubičasto zračenje

c – množinska koncentracija
CE – energija fragmentacije
d – dublet
dd – dublet dubleta
dt – dublet tripleta
E – redukcijski potencijal
g – ekvivalent gravitacijske sile
I – intenzitet signala u spektru masa
J – konstanta sprege
m – masa
m – multiplet
n – množina
pH – negativni logaritam množinske koncentracije vodikovih iona
pK_a – konstanta disocijacije kiseline
q – kvartet
r – koeficijent korelacije
RI – Kovatsev indeks zadržavanja
s – singlet
S/N – omjer signala i šuma osnovne kromatografske linije
t – triplet
T – temperatura
t_R – vrijeme zadržavanja
V – volumen
w – maseni udio
γ – masena koncentracija
δ – kemijski pomak
η – iskorištenje
λ_{max} – valna duljina maksimuma apsorpcije
φ – volumni udio
ψ – volumni omjer

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. H.F. Linskens i J.F. Jackson, u H.F. Linskens i J.F. Jackson (ur.), *Wine Analysis, Modern Methods* Springer Verlag, Berlin, 1988, str. 1–8.
2. R.E. Kunkee i H.E. Eschnauer, u C. Ley (ur.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley VCH, Weinheim, 2016, vol. x, str. 1–9.
3. M. Cerreti, M. Esti, I. Benucci, K. Liburdi, C. de Simone i P. Ferranti, *Aus. J. Grape Wine Res.* **21** (2015) 411–416.
4. A. Roland, R. Schneider, A. Razungles i F. Cavelier, *Chemical reviews* **111** (2011) 7355–7376.
5. W. Wardencki, *J. Chromatogr. A* **793** (1998) 1–19.
6. W. Wardencki, u J. Reedijk (ur.), *Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering*, Elsevier, Amsterdam, 2014, vol. x, str. 1–23.
7. Zakon o vinu, *Narodne novine* **32** (2019) https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_03_32_641.html (preuzeto 5. ožujka 2020. god.)
8. Pravilnik o vinu, *Narodne novine* **96** (1996) https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1996_11_96_1912.html (preuzeto 5. ožujka 2020. god.)
9. A. Rapp, u H.F. Linskens i J.F. Jackson (ur.), *Wine Analysis, Modern Methods of Plant Analysis*, Springer Verlag, Berlin, 1988, str. 29–66.
10. R.B. Boulton, V.S. Singleton, L.F. Bisson i R.E. Kunkee, *Principles and Practices of Winemaking*, Chapman & Hall, New York, 1996.
11. P.X. Etievant, u H. Maarse (ur.), *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, Marcel Dekker, New York, 1991, str. 483–546.
12. I.L. Francis i J.L. Newton, *Aus. J. Grape Wine Res.* **11** (2005) 114–126.
13. H. Eschnauer, *Naturwissenschaften* **73** (1986) 281–290.
14. R.S. Jackson, *Wine Science*, Academic Press, New York, 2014, str. 347–426.
15. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, Y. Glories, A. Maujean i D. Dubourdieu, *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons, Chichester, 2006, str. 219.
16. E. Block i H. Zhuang, u C.A. Bayse i J.L. Brumaghim (ur.), *Biochalcogen Chemistry: The Biological Chemistry of Sulfur, Selenium, and Tellurium*, American Chemical Society, Washington, DC, 2013, str. 1–14.
17. J.X. Li, P. Schieberle i M. Steinhaus, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 11253–11262.

18. M. Chastrette, u C. Rouby, B. Schaal, D. Dubois, R. Gervais i A. Holley, *Olfaction, Taste, and Cognition*, Cambridge University Press, Cambridge, 2009, str. 100–116.
19. K. Kaeppler i F. Mueller, *Chemical Senses* **38** (2013) 189–209.
20. E. Polak, *J. Agric. Food Chem.* **36** (1988) 355–359.
21. J. Polster i P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* **65** (2017) 4329–4340.
22. S. Sekharan, M.Z. Ertem, R. Zhang, J.N. Wei, Y. Pan, H. Zhuang, H. Matsunami, E. Block i V.S. Batista, *Biophysical Journal* **107** (2014) 5–8.
23. P. Darriet, V. Lavigne-Cruege i T. Tominaga, *J. Int. Sci. Vigne Vin* **33** (1999) 137–144.
24. G. Morrot, F. Brochet i D. Dubourdieu, *Brain Lang.* **79** (2001) 309–320.
25. A. Tromelin, G. Sanz, L. Briand, J.C. Pernollet i E. Guichard, u W.L.P. Bredie i M.A. Petersen (ur.), *Flavour Science: Recent Advances and Trends* Vol 9, Elsevier, 2006, str. 13–16.
26. M. Meilgaard, G.V. Civille i B.T. Carr, *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press, Boca Raton, 1991,
27. M. Rothe i B. Thomas, *Z. Lebensm. - Untersuch. Forsch.* **119** (1963) 302–310.
28. M.L. Shankaranarayana, B. Raghavan, K.O. Abraham, C.P. Natarajan i H.H. Brodnitz, *CRC Critical Reviews in Food Technology* **4** (1974) 395–435.
29. O. Demirkol, C. Adams i N. Ercal, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 8151–8154.
30. R.J. McGorin, u M.C. Qian, X. Fan i K. Mahattanatawee (ur.), *Volatile Sulfur Compounds in Food*, American Chemical Society, Washington DC, 2011, str. 3–31.
31. C. Starkenmann, M. Troccaz i K. Howell, *Flavour Fragr. J.* **23** (2008) 369–381.
32. A.L. Waterhouse, G.L. Sacks i D.W. Jeffery, *Understanding wine chemistry*, Wiley, Chichester, 2016, str. 112–122.
33. G.Y. Kreitman, J.C. Danilewicz, D.W. Jeffery i R.J. Elias, *J. Agric. Food Chem.* **65** (2017) 2564–2571.
34. G.Y. Kreitman, J.C. Danilewicz, D.W. Jeffery i R.J. Elias, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 4105–4113.
35. C. Coetzee i W.J. Du Toit, *Food Research International* **45** (2012) 287–298.
36. A.C. Clark, E.N. Wilkes i G.R. Scollary, *Aus. J. Grape Wine Res.* **21** (2015) 339–350.
37. L. Ma, C. Bueschl, R. Schuhmacher i A.L. Waterhouse, *Anal. Chim. Acta* **1054** (2019) 74–83.

38. V. Ferreira, E. Franco-Luesma, E. Vela, R. López i P. Hernández-Orte, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 2237–2246.
39. M. Nikolantonaki, M. Jourdes, K. Shinoda, P.L. Teissedre, S. Quideau i P. Darriet, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 2647–2656.
40. G.Y. Kreitman, A. Cantu, A.L. Waterhouse i R.J. Elias, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 9480–9487.
41. G.Y. Kreitman, V.F. Laurie i R.J. Elias, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 685–692.
42. L. Dias Araujo, S. Vannevel, A. Buica, S. Callerot, B. Fedrizzi, P.A. Kilmartin i W. du Toit, *J. Food Research International* **98** (2017) 79–86.
43. L. Pripis-Nicolau, G. de Revel, A. Bertrand i A. Lonvaud-Funel, *Journal of applied microbiology* **96** (2004) 1176–1184.
44. L. Pripis-Nicolau, G. de Revel, A. Bertrand i A. Maujean, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 3761–3766.
45. T.E. Siebert, M.R. Solomon, A.P. Pollnitz i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 9454–9462.
46. D. Rauhut, u H. König, G. Unden i J. Fröhlich (ur.), *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine* Springer Verlag, Berlin i Heidelberg, 2009, str. 181–207.
47. M. Ugliano i L. Moio, *Anal. Chim. Acta* **621** (2008) 79–85.
48. M.Z. Bekker, G.Y. Kreitman, D.W. Jeffery i J.C. Danilewicz, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 13483–13491.
49. M.E. Smith, M.Z. Bekker, P.A. Smith i E.N. Wilkes, *Aus. J. Grape Wine Res.* **21** (2015) 705–712.
50. V. Ferreira, M. Bueno, E. Franco-Luesma, L. Culleré i P. Fernández-Zurbano, *J. Agric. Food Chem.* **62** (2014) 10015–10027.
51. L. Maslov Bandić, *Gospodarski list* (2016) 200–201.
52. V. Lavigne i D. Dubourdieu, *J. Int. Sci. Vigne Vin* **30** (1996) 201–206.
53. C. Vermeulen, L. Gijs i S. Collin, *Food Reviews International* **21** (2005) 69–137.
54. M.A. Segurel, A.J. Razungles, C. Riou, M.G.L. Trigueiro i R.L. Baumes, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 2637–2645.
55. O.P.H. Augustyn, A. Rapp i C.J. Van Wyk, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **3** (1982) 53–60.
56. M.G. Kolor, *J. Agric. Food Chem.* **31** (1983) 1127–1129.
57. M. Nikolantonaki i P. Darriet, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 10191–10199.

58. C. Chenot, L. Briffoz, A. Lomartire i S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* **68** (2020) 10310–10317.
59. T. Tominaga, A. Furrer, R. Henry i D. Dubourdieu, *Flavour Fragr. J.* **13** (1998) 159–162.
60. D. Dubourdieu i T. Tominaga, u M.V. Moreno-Arribas i M.C. Polo (ur.), *Wine chemistry and biochemistry* Springer, New York, 2009, str. 275–293.
61. K.H. Engel i R. Tressl, *J. Agric. Food Chem.* **39** (1991) 2249–2252.
62. K.H. Engel, u R. Teranishi, E. Wick i I.L. Hornstein (ur.), *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, str. 265–273
63. S. Escher, Y. Niclass, M. van de Waal i C. Starkenmann, *Chemistry & Biodiversity* **3** (2006) 943–957.
64. F. Jabalpurwala, O. Gurbuz i R. Rouseff, *Food Chem.* **120** (2010) 296–303.
65. J. Zhu, L. Wang, Z. Xiao i Y. Niu, *Food Chem.* **245** (2018) 775–785.
66. D.L. Capone, M.A. Sefton i D.W. Jeffery, u M.C. Qian i T.H. Shellhammer (ur.), *Flavor chemistry of wine and other alcoholic beverages*, American Chemical Society, Washington DC, 2012, str. 15–35.
67. A. Peña-Gallego, P. Hernández-Orte, J. Cacho i V. Ferreira, *Food Chem.* **131** (2012) 1–13.
68. T. Tominaga, Y. Niclass, E. Frerot i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 7251–7255.
69. C.M. Lund, L. Nicolau, R.C. Gardner i P.A. Kilmartin, *Aus. J. Grape Wine Res.* **15** (2009) 18–26.
70. F. Benkwitz, T. Tominaga, P.A. Kilmartin, C. Lund, M. Wohler i L. Nicolau, *Am. J. Enol. Vitic.* **63** (2012) 62–72.
71. E.S. King, P. Osidacz, C. Curtin i S.E.P. Bastian, *Aus. J. Grape Wine Res.* **17** (2011) 169–180.
72. D.L. Capone, M.A. Sefton, Y. Hayasaka i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 1390–1395.
73. V.F. Laurie, M.C. Zúñiga, V. Carrasco-Sánchez, L. Santos, A. Cañete, C. Olea-Azar, M. Ugliano i E. Agosin, *Food Chem.* **131** (2012) 1510–1516.
74. M. Nikolantonaki, I. Chichuc, P.L. Teissedre i P. Darriet, *Anal. Chim. Acta* **660** (2010) 102–109.

75. M. Nikolantonaki, P. Magiatis i A.L. Waterhouse, *Food Chem.* **163** (2014) 61–67.
76. C.M. Oliveira, A.S. Barros, A.C.S. Ferreira i A.M.S. Silva, *Food Chem.* **211** (2016) 1–7.
77. E.C. Kritzinger, F.F. Bauer i W.J. Du Toit, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2012) 269–277.
78. E. Sarrazin, S. Shinkaruk, M. Pons, C. Thibon, B. Bennetau i P. Darriet, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 10606–10613.
79. T. Hofmann, P. Schieberle i W. Grosch, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 251–255.
80. L. Chen, D.L. Capone i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 10808–10815.
81. O. Makhotkina i P.A. Kilmartin, *Food Chem.* **135** (2012) 486–493.
82. M.J. Hawkesford i L.J. De Kok, *Plant Cell And Environment* **29** (2006) 382–395.
83. L.M. Edmond, E.A. Magee i J.H. Cummings, *LC•GC Europe* (2003) 1–6.
84. B.W. Zoecklein, K.C. Fugelsang, B.H. Gump i F.S. Nury, *Production Wine Analysis*, Springer US, New York, 1990, str. 207–218.
85. P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche, i A. Lonvaud, *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications*, John Wiley & Sons, Chichester, Vol. 1., 2000, str. 193–216.
86. P. Romano i G. Suzzi, u G.H. Fleet (ur.), *Wine Microbiology and Biotechnology* Harwood Academic Publishers, Chur, 1993, str. 373–393.
87. M. Schütz i E. Kunkee, *Am. J. Enol. Vitic.* **28** (1977) 137–144.
88. H. Hilz i M. Kittler, *Biochim. et Biophys. Acta* **30** (1958) 650–651.
89. M. Pivato, M. Fabrega-Prats i A. Masi, *Archives of biochemistry and biophysics* **560** (2014) 83–99.
90. Y. Surdin-Kerjan, u J.C. Davidian, D. Grill, L.J. De Kok, I. Stulen, M.J. Hawkesford, E. Schnug i H. Rennenberg (ur.), *Sulfur Transport and Assimilation in Plants. Regulation, Interaction and Signaling*, Backhuys Publishers, Leiden, 2003, str. 13–18.
91. H. Hesse, O. Kreft, S. Maimann, M. Zeh i R. Hoefgen, *J. of Exp. Botany*, **55** (2004) 1799–1808.
92. D. Thomas i Y. Surdin-Kerjan, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61** (1997) 503–532.
93. V. Jiranek, P. Langridge i P.A. Henschke, *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, **61** (1995) 461–467.
94. P.A. Henschke i V. Jiranek, u G.H. Fleet (ur.), *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Chur, 1993, str. 77–164.

95. A. Spiropoulos, J. Tanaka, I. Flerianos i L.F. Bisson, *Am. J. Enol. Vitic.* **51** (2000) 233–248.
96. L. Maslov Bandić, M. Viskić, A.M. Jagatić Korenika i A. Jeromel, u J. Perez (ur.), *A closer look at grapes, wines and winemaking*, Nova Science Pub., 2018, str. 43-74.
97. M.G. Lambrechts i I.S. Pretorius, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21** (2000) 97–129.
98. P.J.A. Vos i R.S. Gray, *Am. J. Enol. Vitic.* **30** (1979) 187–197.
99. P. Rigou, A. Triay i A. Razungles, *Food Chem.* **142** (2014) 242–248.
100. K. Zott, C. Thibon, M. Bely, A. Lonvaud-Funel, D. Dubourdieu i I. Masneuf-Pomarede, *Int. J. Food Microbiol.* **151** (2011) 210–215.
101. N. Anfang, M. Brajkovich i M.R. Goddard, *Aust. J. Grape Wine Res.* **15** (2009) 1–8.
102. J.H. Swiegers, R.L. Kievit, T. Siebert, K.A. Lattey, B.R. Bramley, I.L. Francis, E.S. King i I.S. Pretorius, *Food Microbiol* **26** (2009) 204–211.
103. N. Moreira, F. Mendes, T. Hogg i I. Vasconcelos, *Int. J. Food Microbiol.* **103** (2005) 285–294.
104. J.H. Swiegers i I.S. Pretorius, *Adv. Appl. Microbiol.* **57** (2005) 131–175.
105. N. Moreira, F. Mendes, O. Pereira, P. Guedes de Pinho, T. Hogg i I. Vasconcelos, *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 157–167.
106. A. Maujean, *J. Int. Sci. Vigne Vin* **35** (2001) 171–194.
107. Y. Alegre, L. Culleré, V. Ferreira i P. Hernández-Orte, *Food Res. Int.* **100** (2017) 740–747.
108. J.H. Swiegers, M. Ugliano, T. van der Westhuizen i P. Bowyer, *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* (2008) 66–69.
109. C. Peyrot des Gachons, C. Van Leeuwen, T. Tominaga, J.P. Soyer, J.P. Gaudillère i D. Dubourdieu, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 73–85.
110. M. Subileau, R. Schneider, J.M. Salmon i E. Degryse, *FEMS Yeast Res.* **8** (2008) 771–780.
111. F. Lacroux, O. Tregoat, C. Van Leeuwen, A. Pons, T. Tominaga, V. Lavigne-Cruege i D. Dubourdieu, *J. Int. Sci. Vigne Vin* **42** (2008) 125–132.
112. X. Chone, C. Van Leeuwen, P. Chery i P. Ribereau-Gayon, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **22** (2001) 8–15.
113. C. Thibon, D. Dubourdieu, P. Darriet i T. Tominaga, *Food Chem.* **114** (2009) 1359–1364.

114. S.T. Lund i J. Bohlmann, *Science* **311** (2006) 804–805.
115. C. Peyrot des Gachons, T. Tominaga i D. Dubourdieu, *Am. J. Enol. Vitic.* **53** (2002) 144–146.
116. M. L. Murat, T. Tominaga i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 5412–5417.
117. P. Darriet i A. Pons, u A. Buettner (ur.), *Springer Handbook of Odor*, Springer International Publishing, 2017, str. 143–162.
118. T. Tominaga, C. Peyrot des Gachons i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 5215–5219.
119. T. Tominaga, I. Masneuf i D. Dubourdieu, u F. Shahidi i D.K. Weerasinghe (ur.), *Nutraceutical Beverages*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, 2004, str. 314–337.
120. H. Wakabayashi, M. Wakabayashi, W. Eisenreich i K.H. Engel, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 110–116.
121. R. Emter i A. Natsch, *The Journal of Biological Chemistry* **283** (2008) 20645–20652.
122. G. Griffiths, M. Leverentz, H. Silkowski, N. Gill i J.J. Sanchez-Serrano, *J. Exp. Bot.* **349** (2000) 1363–1370.
123. E.J. Stone, R.M. Hall i S.J. Kazeniak, *J. Food Sci.* **40** (1975) 1138–1141.
124. A. Cayrel, J. Crouzet, H.W.S. Chan i K.R. Price, *Am. J. Enol. Vitic.* **34** (1983) 77–82.
125. M. Subileau, R. Schneider, J.M. Salmon i E. Degryse, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 9230–9235.
126. A. Roland, J. Vialaret, M. Moniatte, P. Rigou, A. Razungles i R. Schneider, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 1626–1635.
127. M. Du Toit i I.S. Pretorius, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21** (2000) 74–96.
128. A.J.L. Cooper i M.H. Hanigan, u C.A. McQueen (ur.), *Comprehensive Toxicology*, Vol. 4, Elsevier, Oxford, 2010, str. 323–366.
129. D.A. Dickinson i H.J. Forman, *Biochem. Pharm.* **64** (2002) 1019–1026.
130. A. Aranda i M. del Olmo, *Appl. and Env. Microbiol.* **70** (2004) 1913–1922.
131. C. Thibon, S. Cluzet, J.M. Mérillon, P. Darriet i D. J. Dubourdieu, *Agric. Food. Chem.* **59** (2011) 1344–1351.
132. H. Kobayashi, H. Takase, K. Kaneko, F. Tanzawa, R. Takata, S. Suzuki i K. Konno, *Am. J. Enol. Vitic.* **61** (2010) 176–85.

133. P.A. Grant-Preece, K.H. Pardon, D.L. Capone, A.G. Cordente, M.A. Sefton, D.W. Jeffery i G.M. Elsey, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 1383–1389.
134. C. Peyrot des Gachons, T. Tominaga i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 4076–4079.
135. C. Peyrot des Gachons, T. Tominaga i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 3387–3391.
136. D.L. Capone, K.H. Pardon, A.G. Cordente i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 11204–11210.
137. H. Bonnaffoux, A. Roland, E. Rémond, S. Delpéch, R. Schneider i F. Cavelier, *Food Chem.* **237** (2017) 877–886.
138. P. Marullo i D. Dubourdieu, u A.G. Reynolds (ur.), *Managing wine quality: Oenology and wine quality* Vol 2., Woodhead Publishing, 2010, str. 293–345.
139. J.H. Swiegers, R.L. Willmott, A. Hill-Ling, D.L. Capone, K.H. Pardon, G.M. Elsey, K.S. Howell, M.A. de Barros Lopes, M.A. Sefton, M. Lilly i I.S. Pretorius u W. Bredie i M. Petersen (ur.), *Developments in food science vol 43: flavour science recent advances and trends*. Elsevier, Amsterdam, 2006, str. 113–116.
140. J.H. Swiegers, D.L. Capone, K.H. Pardon, G.M. Elsey, M.A. Sefton, I.L. Francis i I.S. Pretorius, *Yeast (Chichester)* **24** (2007) 561–574.
141. A. Roland, F. Cavelier i R. Schneider, *Flavour Fragr. J.* **27** (2012) 266–272.
142. A. Roland, R. Schneider, C. Le Guernevé, A. Razungles i F. Cavelier, *Food Chem.* **121** (2010) 847–855.
143. R. Schneider, F. Charrier, A. Razungles i R. Baumes, *Anal. Chim. Acta* **563** (2006) 58–64.
144. H. Bonnaffoux, S. Delpéch, E. Rémond, R. Schneider, A. Roland i F. Cavelier, *Food Chem.* **268** (2018) 126–133.
145. B. Fedrizzi, K.H. Pardon, M.A. Sefton, G.M. Elsey i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 991–995.
146. A. Roland, R. Schneider, A. Razungles, C. Le Guernevé i F. Cavelier, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 10684–10689.
147. K.H. Pardon, S.D. Graney, D.L. Capone, J.H. Swiegers, M.A. Sefton i G.M. Elsey, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 3758–3763.

148. G. Winter, T. van der Westhuizen, V.J. Higgins, C. Curtin i M. Ugliano, *Aust. J. Grape Wine Res.* **17** (2011) 285–290.
149. A.G. Cordente, D.L. Capone i C.D. Curtin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015) 1–14.
150. C. Thibon, C. Böcker, S. Shinkaruk, V. Moine, P. Darriet i D. Dubourdieu, *Food Chem.* **199** (2016) 711–719.
151. M.J. Harsch, F. Benkwitz, A. Frost, B. Colonna-Ceccaldi, R.C. Gardner i J.M. Salmon, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 3703–3713.
152. M. Santiago i R.C. Gardner, *FEMS Yeast Res.* **15** (2015) 1–10.
153. F. Pinu, S. Jouanneau, L. Nicolau, R.C. Gardner i S.G. Villas-Boas, *Am. J. Enol. Vitic.* **63** (2012) 407–412.
154. B. Concejero, P. Hernandez-Orte, J. Astrain, B. Lacau, C. Baron i V. Ferreira, *LWT - Food Science and Technology* **65** (2016) 770–776.
155. D.W. Jeffery, *Australian Journal of Chemistry* **69** (2016) 1323–1330.
156. T. Tokuyama, H. Kuraishi, K. Aida i T. Uemura *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19** (1973) 439–466.
157. C.G. Edwards i J.C. Bohlscheid, *Enzyme and Microbial Technology* **41** (2007) 1–4.
158. N. Duhamel, F. Piano, S.J. Davidson, R. Larcher, B. Fedrizzi i D. Barker, *Tetrahedron Letters* **56** (2015) 1728–1731.
159. N. Le Menn, S. Marchand, G. de Revel, D. Demarville, D. Laborde i R. Marchal, *J. Agric. Food Chem.* **65** (2017) 2345–2356.
160. J. Gros, V. Lavigne, F. Thibaud, M. Gammacurta, V. Moine, D. Dubourdieu, P. Darriet i A. Marchal, *J. Agric. Food Chem.* **65** (2017) 1058–1069.
161. A. Pons, M. Floch, S. Shinkaruk i P. Darriet, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 1318–1325.
162. L. Blanchard, T. Tominaga i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 4833–4835.
163. D.S. Mottram, u R.G. Berger (ur.), *Flavours and fragrances* Springer, Berlin, 2007, str. 269–283.
164. C. Cerny i R. Guntz-Dubini, *Food Chem.* **141** (2013) 1078–1086.
165. T. Huynh-Ba, W. Matthey-Doret, L.B. Fay i R. Bel Rhlid, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 3629–3635.
166. C.S. Du Plessis i O.P.H. Augustyn, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2** (1981) 101–103.

167. P. Darriet, T. Tominaga, V. Lavigne, J.N. Boidron i D. Dubourdieu, *Flavour Fragr. J.* **10** (1995) 385–392.
168. H. Guth, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 3027–3032.
169. R. Schneider, Y. Kotseridis, J.L. Ray, C. Augier i R. Baumes, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 3243–3248.
170. T. Tominaga, M.L. Murat i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 1044–1048.
171. T. Tominaga, R. Baltenweck-Guyot, C.P. Des Gachons i D. Dubourdieu, *Am. J. Enol. Vitic.* **51** (2000) 178–181.
172. E. Sarrazin, S. Shinkaruk, T. Tominaga, B. Bennetau, E. Frérot i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 1437–1444.
173. V. Lavigne, R. Henry i D. Dubourdieu, *Sciences des aliments* **18** (1998) 175–191.
174. C.B. Fretz, J.L. Luisier, T. Tominaga i R. Amadò, *Am. J. Enol. Vitic.* **56** (2005) 407–410.
175. B. Fedrizzi, G. Versini, I. Lavagnini, D. Badocco, G. Nicolini i F. Magno, *Anal. Chim. Acta* **621** (2008) 38–43.
176. B. Fedrizzi, G. Versini, I. Lavagnini, G. Nicolini i F. Magno, *Anal. Chim. Acta* **596** (2007) 291–297.
177. E. Campo, B.V. Do, V. Ferreira i D. Valentin, *Aus. J. Grape Wine Res.* **14** (2008) 104–115.
178. J. Petka, V. Ferreira, M.A. González-Viñas i J. Cacho, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 909–915.
179. D.L. Capone, R. Ristic, K.H. Pardon i D.W. Jeffery, *Anal. Chem.* **87** (2015) 1226–1231.
180. L.E. Musumeci, I. Ryona, B.S. Pan, N. Loscos, H. Feng, M.T. Cleary i G.L. Sacks, *Molecules* **20** (2015) 12280–12299.
181. P. Bouchilloux, P. Darriet, R. Henry, V. Lavigne-Cruège i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3095–3099.
182. C. Pavez, E. Agosin i M. Steinhaus, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 3417–3421.
183. M.L. Murat, T. Tominaga i D. Dubourdieu, *OENO One* **35** (2001) 99–105.
184. V. Ferreira, N. Ortín, A. Escudero, R. López i J. Cacho, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 4048–4054.

185. P. Renault, J. Coulon, V. Moine, C. Thibon i M. Bely, *Front. Microbiol.* **7** (2016) 293–302.
186. I. Masneuf-Pomarède, C. Mansour, M.L. Murat, T. Tominaga i D. Dubourdieu, *Int. J. Food Microbiol.* **108** (2006) 385–390.
187. L. Mateo-Vivaracho, J. Zapata, J. Cacho i V. Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 10184–10194.
188. E.S. King, J.H. Swiegers, B. Travis, I.L. Francis, S.E. Bastian i I.S. Pretorius, *J. of Agric. Food Chem.* **56** (2008) 10829–10837.
189. D.L. Capone, A. Baker, P. Osidacz Williamson i I.L. Francis, *Aus. J. Grape Wine Res.* **24** (2017) 38–50.
190. M. Herbst-Johnstone, L. Nicolau i P.A. Kilmartin, *Am. J. Enol. Vitic.* **62** (2011) 495–502.
191. Y. Kotseridis, J.L. Ray, C. Augier i R. Baumes, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 5819–5823.
192. H. Kobayashi, H. Takase, Y. Suzuki, F. Tanzawa, R. Takata, K. Fujita, M. Kohno, M. Mochizuki, S. Suzuki i T. Konno, *J. Exp. Bot.* **62** (2011) 1325–1336.
193. A. Roland, R. Schneider, F. Charrier, F. Cavelier, M. Rossignol i A. Razungles, *Food Chem.* **125** (2011) 139–144.
194. C.G. Ferretti, *Ecological Indicators* **108** (2020) 105737–105754.
195. K. Šuklje, G. Antalick, A. Buica, J. Langlois, Z.A. Coetzee, J. Gouot, L.M. Schmidtke i A. Deloire, *J. Sci. Food Agric.* **96** (2016) 915–926.
196. A.C. Clark i R.C. Deed, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 1214–1221.
197. D.L. Capone i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 4659–4667.
198. T. Allen, M. Herbst-Johnstone, M. Girault, P. Butler, G. Logan, S. Jouanneau, L. Nicolau i P.A. Kilmartin, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 10641–10650.
199. K.J. Olejar, B. Fedrizzi i P.A. Kilmartin, *Food Chem.* **183** (2015) 181–189.
200. M. Maggu, R. Winz, P.A. Kilmartin, M.C.T. Trought i L. Nicolau, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 10281–10288.
201. M.P. Day, S.A. Schmidt, W. Pearson, R. Kolouchova i P.A. Smith, *Aus. J. Grape Wine Res.* **25** (2019) 185–200.
202. R. Larcher, G. Nicolini, L. Tonidandel, T.R. Villegas, M. Malacarne i B. Fedrizzi, *Aust. J. Grape Wine Res.* **19** (2013) 342–348.

203. A. Escudero, E. Asensio, J. Cacho i V. Ferreira, *Food Chem.* **77** (2002) 325–331.
204. E. Vela, P. Hernández-Orte, E. Castro, V. Ferreira i R. Lopez, *Am. J. Enol. Vitic.* **68** (2017) 30–38.
205. K.J. Parish, M. Herbst-Johnstone, F. Bouda, S. Klaere i B. Fedrizzi, *LWT* **80** (2017) 423–429.
206. R. Eschenbruch i P. Bonish, *Arch. Microbiol.* **107** (1976) 299–302.
207. A. Antonelli, L. Castellari, C. Zambonelli i A. Carnacini, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 1139–1144.
208. A. Jeromel, A.M.J. Korenika i I. Tomaz, u A.M. Holban (ur.), *Fermented Beverages*, Elsevier, 2019, str. 171–285.
209. M. Roncoroni, M. Santiago, D.O. Hooks, S. Moroney, M.J. Harsch, S.A. Lee, K.D. Richards, L. Nicolau i R.C. Gardner, *Food Microbiol.* **28** (2011) 926–935.
210. I. Belda, J. Ruiz, E. Navascués, D. Marquina i A. Santos, *Int. J. Food Microbiol.* **225** (2016) 1–8.
211. E.S. King, R.L. Kievit, C. Curtin, J.H. Swiegers, I.S. Pretorius, S.E.P. Bastian i I.L. Francis, *Food Chem.* **122** (2010) 618–626.
212. K. Zott, C. Thibon, M. Bely, A. Lonvaud-Funel, D. Dubourdiou i I. Masneuf-Pomarede, *Int. J. Food Microbiol.* **151** (2011) 210–215.
213. L. Culleré, R. López i V. Ferreira, u A. Morata (ur.), *Red Wine Technology*, Academic Press, 2019, str. 283–307.
214. M. Ciani, L. Canonico, L. Oro i F. Comitini, u A.M. Holban (ur.), *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, Elsevier, 2020, str. 435–465.
215. M.J. Harsch i R.C. Gardner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (2012) 223–235.
216. J. Ruiz, F. Kiene, I. Belda, D. Fracassetti, D. Marquina, E. Navascués, F. Calderón, A. Benito, D. Rauhut, A. Santos i S. Benito, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103** (2019) 7425–7450.
217. S.J. Bell i P.A. Henschke, *Aus. J. Grape Wine Res.* **11** (2005) 242–295.
218. M. Dufour, A. Zimmer, C. Thibon i P. Marullo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (2013) 5893–5905.
219. B. Magasanik i C.A. Kaiser, *Gene* **290** (2002) 1–18.
220. K.S. Howell, J.H. Swiegers, G.M. Elsey, T.E. Siebert, E.J. Bartowsky, G.H. Fleet, I.S. Pretorius, S. Pretorius i M.A.D. Lopes, *FEMS Microbiol. Lett.* **240** (2004) 125–129.

221. W.J. Du Toit, J. Marais, I.S. Pretorius i M. du Toit, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **27** (2006) 76–94.
222. P. Lopes, M.A. Silva, A. Pons, T. Tominaga, V. Lavigne, C. Saucier, P. Darriet, P.L. Teissedre i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 10261–10270.
223. M. Ugliano, M. Kwiatkowski, S. Vidal, D. Capone, T. Siebert, J. Dieval, O. Aagaard i E. Waters, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 2564–2572.
224. M. Brajkovich, N. Tibbits, G. Peron, C.M. Lund, S.I. Dykes, P.A. Kilmartin i L. Nicolau, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 10006–10011.
225. E. Petit, R. Jacquet, L. Pouységu, D. Deffieux i S. Quideau, *Tetrahedron* **71** (2015) 2991–2998.
226. E. Petit, R. Jacquet, L. Pouységu, D. Deffieux i S. Quideau, *Tetrahedron* **75** (2019) 551–560.
227. J. C. Danilewicz, *Am. J. Enol. Vitic.* **58** (2007) 53–60.
228. M. Nikolantonaki i A.L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 8484–8491.
229. M.P. Bradshaw, C. Barril, A.C. Clark, P.D. Prenzler i G.R. Scollary, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51** (2011) 479–498.
230. C. Barril, A.C. Clark, P.D. Prenzler, P. Karuso i G.R. Scollary, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 9539–9546.
231. O. Makhotkina, M. Herbst-Johnstone, G. Logan, W. du Toit i P.A. Kilmartin, *Am. J. Enol. Vitic.* **64** (2013) 203–213.
232. O. Makhotkina i P.A. Kilmartin, *J. Electroanal. Chem.* **633** (2009) 165–174.
233. A. Roland, J. Vialaret, A. Razungles, P. Rigou i R. Schneider, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 4406–4413.
234. V. Lavigne i D. Dubourdieu, *VigneVini.* **31** (2004) 58–66.
235. A.L. Waterhouse i M. Nikolantonaki, u S.B. Ebeler, G. Sacks, S. Vidal i P. Winterhalter (ur.), *Advances in Wine Research*, American Chemical Society, Washington DC, 2015, str. 291–301.
236. N.H. Snow i G.C. Slack, u R.L. Grob i E.F. Barry (ur.), *Modern Practice of Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2004, str. 547–604.
237. E. Noroozian, F.A. Maris, M.W.F. Nielen, R.W. Frei, G. De Jong i U.A.Th. Brinkman, *J. High Resol. Chromatogr.* **10** (1987) 17–24.

238. V. Ferreira, L. Ortega, A. Escudero i J.F. Cacho, *J. Chromatogr. Sci.* **38** (2000) 469–476.
239. L. Ortega, R. Lopez, J. Cacho i V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* **931** (2001) 31–39.
240. L. Cullere, A. Escudero, J. Cacho i V. Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 1653–1660.
241. A. Escudero, E. Campo, L. Farina, J. Cacho, i V. Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 4501–4510.
242. F. San Juan, J. Cacho, V. Ferreira i A. Escudero, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 5045–5056.
243. P. Herrero, P. Saenz-Navajas, L. Cullere, V. Ferreira, A. Chatin, V. Chaperon, F. Litoux-Desrues i A. Escudero, *Food Chem.* **207** (2016) 239–250.
244. O. Geffroy, R. Lopez, E. Serrano, T. Dufourcq, E. Gracia-Moreno, J. Cacho i V. Ferreira, *Food Chem.* **187** (2015) 243–253.
245. A. Escudero, P. Hernández-Orte, J. Cacho, V. i Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 4268–4272.
246. V. Lavigne, A. Pons, P. Darriet i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 2688–2693.
247. R. Lopez, A.C. Lapena, J. Cacho i V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* **1143** (2007) 8–15.
248. I.N. Papadoyannis i V.F. Samanidou u J. Cazes (ur.), *Encyclopedia of Chromatography*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2010, str. 2090–2105.
249. N.H. Snow i G.C. Slack, u H.M. McNair i J.M. Miller (ur.), *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, 2009, str. 183–197.
250. S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2003.
251. M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto i J. Guasch, *J. Chromatogr. A.* **849** (1999) 293–297.
252. M.A. Segurel, A.J. Razungles, C. Riou, M.G.L. Trigueiro i RL. Baumes, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 2637–2645.
253. F. Lestremau, F.A.T. Andersson, V. Desauziers i J.L. Fanlo, *Anal. Chem.* **75** (2003) 2626–2632.
254. B. Fedrizzi, F. Magno, D. Badocco, G. Nicolini i G. Versini, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 10880–10887.

255. B. Fedrizzi, F. Magno, F. Finato i G. Versini, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 9716–9722.
256. E. Block, u M.C. Qian, X. Fan i K. Mahattanatawee (ur.), *Volatile Sulfur Compounds in Food*, American Chemical Society, Washington DC, 2011, str. 35–63.
257. Q. Wang, J.M. Chong i J. Pawliszyn, *Flavour Fragr. J.* **21** (2006) 385–394.
258. J. Herszage i S.E. Ebeler, *Am. J. Enol. Vitic.* **62** (2011) 1–8.
259. P. Martos, A. Saraullo i J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **69** (1997) 402–408.
260. S. Merkle, K. Kleeberg i J. Fritsche, *Chromatography* **2** (2015) 293–381.
261. R.A. Murray, *Analytical chemistry* **73** (2001) 1646–1649.
262. V. Ferreira, P. Herrero, J. Zapata, i A. Escudero, *J. Chromatogr. A* **1407** (2015) 30–41.
263. T. Gorecki i J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **68** (1996) 3008–3014.
264. P.M. Davis i M.C. Qian. *Molecules* **24** (2019) 3320–3334.
265. A.J. Matich, D.D. Rowan, i N.H. Banks, *Anal. Chem.* **68** (1996) 4114–4118.
266. F. Lestremau, F.A.T. Andersson i V. Desauziers, *Chromatographia* **59** (2004) 607–613.
267. S.K. Pandey i K.H. Kim, *Environ. Sci. Technol.* **43** (2009) 3020–3029.
268. C. Haberhauer-Troyer, E. Rosenberg i M. Grasserbauer, *J. Chromatogr., A* **848** (1999) 305–315.
269. Y. Fang i M.C. Qian, *J. Chromatogr. A* **1080** (2005) 177–185.
270. D.R. Parkinson, u *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2014, str. 1–38.
271. N. Ochiai, K. Sasamoto, F. David i P. Sandra, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 7249–7255.
272. N. Ochiai, K. Sasamoto i T. Kishimoto, *J. Agric. Food Chem.* **63** (2015) 6698–6706.
273. C. Pizarro, N. Perez-del-Notario i J.M. Gonzalez-Saiz, *J. Chromatogr. A* **1166** (2007) 1–8.
274. R. Godelman, S. Limmert i T. Kuballa, *Eur. Food Res. Technol.* **227** (2008) 449–461.
275. E. Kühnel, D.D.P. Laffan, G.C. Lloyd-Jones, T. Martínez del Campo, I.R. Shepperson i J.L. Slaughter, *Angewandte Chemie International Edition.* **46** (2007) 7075–7078.
276. D.R. Knapp, *Handbook of analytical derivatization reactions*. Wiley, Chichester, 1979.

277. C. Thibon, S. Shinkaruk, T. Tominaga, B.E. Bennetau i D. Dubourdieu, *J. Chromatogr. A* **1183** (2008) 150–157.
278. C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* **1296** (2013) 2–14.
279. D. Valdez, *Journal of Chromatographic Science*, **23** (1985) 128–131.
280. K. Shimada i K. Mitamura, *J. Chromatogr. B* **659** (1994) 227–241.
281. E.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, i J. Pawliszyn, *TrAC Trends Anal. Chem.* **71** (2015) 236–248.
282. V. Liem-Nguyen, S. Bouchet i E. Björn, *Anal. Chem.* **87** (2015) 1089–1096.
283. E. Block i E.M. Calvey u M.E. Keelan i C.J. Mussinan (ur.), *Sulfur Compounds in Foods*, Vol. 564, American Chemical Society, Washington DC, 1994, str. 63–79.
284. L. Mateo-Vivaracho, V. Ferreira i J.J. Cacho, *J. Chromatogr. A* **1121** (2006) 1–9.
285. M. Herbst-Johnstone, F. Piano, N. Duhamel, D. Barker i B. Fedrizzi, *J. Chromatogr. A* **1312** (2013) 104–110.
286. J. Wang, J.M. Gambetta i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 3838–3848.
287. T. Tominaga, I. Masneuf i D. Dubourdieu, *J. Int. Sci. Vigne Vin* **29** (1995) 227–232.
288. C. Leck i L. E. Bagander, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1680–1683.
289. E. Campo, V. Ferreira, A. Escudero i J. Cacho, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 5682–5690.
290. G. Versini, E. Dellacassa, S. Carlin, B. Fedrizzi i F. Magno, u R. Flamini (ur.), *Hyphenated Techniques in Grape & Wine Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, 2008, str. 173–217.
291. V.P. Jofré, M.V. Assof, M.L. Fanzone, H.C. Goicoechea, L.D. Martínez i M.F. Silva, *Anal. Chim. Acta* **683** (2010) 126–135.
292. F. Chinnici, N. Natali i C. Riponi, *J. Agric. Food Chem.* **62** (2014) 9868–9875.
293. A. Gamero, W. Wesselink i C. de Jong, *J. Chromatogr. A* **1272** (2013) 1–7.
294. M. Mestres, O. Busto i J. Guasch, *J. Chromatogr. A* **808** (1998) 211–218.
295. K.S. Howell, M. Klein, J.H. Swiegers, Y. Hayasaka, G.M. Elsey, G.H. Fleet, P.B. Høj, I.S. Pretorius i M.A. de Barros Lopes, *Applied and environmental microbiology* **71** (2005) 5420–5426.
296. F. Mattivi, B. Fedrizzi, A. Zenato, P. Tiefenthaler, S. Tempesta, D. Perenzoni, P. Cantarella, F. Simeoni i U. Vrhovšek, *Anal. Chim. Acta* **732** (2012) 194–202.
297. X.J. Wang, Y.S. Tao, Y. Wu, R.Y. An i Z.Y. Yue, *Food Chem.* **226** (2017) 41–50.

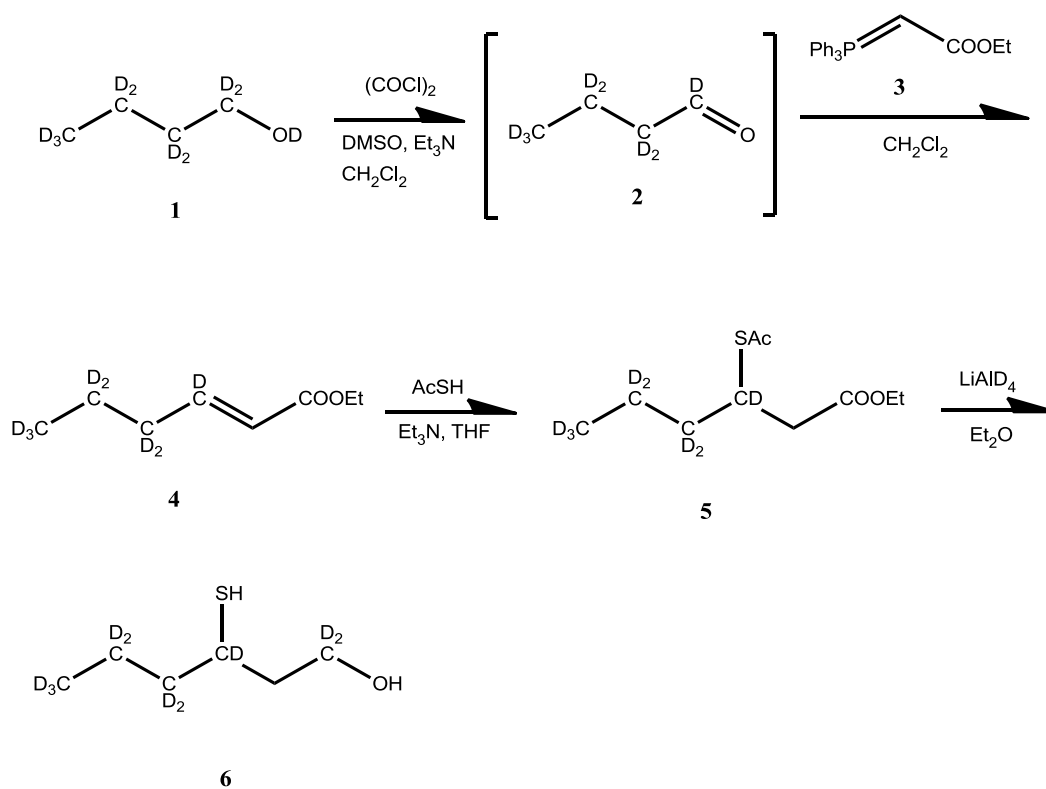
298. S. Schoenauer i P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* **67** (2019) 4553–4559.
299. T. Tominaga, L. Blanchard, P. Darriet i D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 1799–1802.
300. V. Lavigne, J.N. Boidron i D. Dubourdieu, *J. Int. Sci. Vigne Vin* **27** (1993) 1–12.
301. C. Vermeulen, I. Lejeune, T.T.H. Tran i S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 5061–5068.
302. A.M. Sourabié, H.E. Spinnler, P. Bonnarme, A. Saint-Eve i S. Landaud, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 4674–4680.
303. K. Takazumi, K. Takoi, K. Koie i Y. Tuchiya, *Analytical chemistry* **89** (2017) 11598–11604.
304. L. Mateo-Vivaracho, J. Cacho i V. Ferreira, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 3845–3853.
305. C. Thibon, A. Pons, N. Mouakka, P. Redon, R. Méreau i P. Darriet, *J. Chromatogr. A* **1415** (2015) 123–133.
306. K. Reglitz i M. Steinhaus, *J. Agric. Food Chem.* **65** (2017) 2364–2372.
307. L. Mateo-Vivaracho, J. Cacho i V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* **1146** (2007) 242–250.
308. F. Piano, D. Fracassetti, A. Buica, M. Stander, W.J. du Toit, D. Borsa i A. Tirelli, *Aust. J. Grape Wine Res.* **21** (2015) 40–48.
309. L. Mateo-Vivaracho, J. Cacho i V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* **1185** (2008) 9–18.
310. Z. Lv, J. You, S. Lu, W. Sun, Z. Ji, Z. Sun, C. Song, G. Chen, G. Li, N. Hu, W. Zhou i Y. Suo, *J. Chromatogr. A* **1491** (2017) 98–107.
311. J.J. Rodríguez-Bencomo, R. Schneider, J.P. Lepoutre i P. Rigou, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 5640–5646.
312. D.L. Capone, M.A. Sefton i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 4649–4658.
313. L. Dagan, F. Reillon, A. Roland i R. Schneider, *Anal. Chim. Acta* **821** (2014) 48–53.
314. T. Huang, M.R. Armbruster, J.B. Coulton i J.L. Edwards, *Anal. Chem.* **91** (2019) 109–125.
315. C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* **1296** (2013) 15–24.
316. R. Larcher, L. Tonidandel, T. Román Villegas, T. Nardin, B. Fedrizzi i G. Nicolini, *Food Chem.* **166** (2015) 56–61.
317. C. Coetzee, A. Schulze, L. Mokwena, W.J. Du Toit i A. Buica, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **39** (2018) 180–184.

318. C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras i D.G. Themelis, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **50** (2009) 384–391.
319. C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras i A. Zotou, *Anal. Chim. Acta* **690** (2011) 122–128.
320. P.D. Halphen i T.C. Owen, *J. Org. Chem.* **38** (1973) 3507–3510.
321. S. Lafontaine, S. Varnum, A. Roland, S. Delpech, L. Dagan, D. Vollmer, T. Kishimoto i T. Shellhammer, *Food Chem.* **278** (2019) 228–239.
322. T. Roman, L. Tonidandel, G. Nicolini, E. Bellantuono, L. Barp, R. Larcher i E. Celotti, *Foods (Basel)* **104** (2020) 1–13.
323. A. Roland, S. Delpech, L. Dagan, M.A. Ducasse, F. Cavelier i R. Schneider, *J. Chromatogr. A* **1468** (2016) 154–163.
324. A. Deroite, J.L. Legras, P. Rigou, A. Ortiz-Julien i S. Dequin, *AMB Express* **130** (2018) 1–14.
325. P. Seguinot, A. Ortiz-Julien i C. Camarasa, *Frontiers in microbiology* **11** (2020) 1–19.
326. S. Vichi, N. Cortés-Francisco i J. Caixach, *J. Chromatogr. A* **1318** (2013) 180–188.
327. S. Vichi, N. Cortés-Francisco i J. Caixach, *Food Chem.* **175** (2015) 401–408.
328. B. Quintanilla-Casas, N. Dulsat-Serra, N. Cortés-Francisco, J. Caixach i S. Vichi, *LWT Food Sci. Technol.* **64** (2015) 1085–1090.
329. S. Vichi, Y. Jerí, N. Cortés-Francisco, O. Palacios i J. Caixach, *Food Res. Int.* **64** (2014) 610–617.
330. M. Mafata, M. Stander, B. Thomachot i A. Buica, *Foods* **138** (2018) 1–10.
331. L. Chen, D.L. Capone i D.W. Jeffery, *Anal. Chim. Acta* **998** (2018) 83–92.
332. J. Zhuang, J. You, S. Zhang, Z. Sun, Z. Ji, J. Liu, i Y. Yu, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **41** (2018) 794–803.
333. K. Šuklje, G. Antalick, A. Buica, Z.A. Coetzee, J. Brand, L.M. Schmidtke i M.A. Vivier, *Food Chem.* **197** (2016) 1073–1084.
334. V. Englezos, K. Rantsiou, F. Cravero, F. Torchio, M. Pollon, D. Fracassetti, A. Ortiz-Julien, V. Gerbi, L. Rolle i L. Cocolin, *Food Chem.* **257** (2018) 350–360.
335. P. Zuman, *Chem. Rev.* **104** (2004) 3217–3238.
336. K. Xu, Y. Zhang, B. Tang, J. Laskin, P.J. Roach i H. Chen, *Anal. Chem.* **82** (2010) 6926–6932.
337. R.E. Hansen, D. Roth i J.R. Winther, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (2009) 422–427.

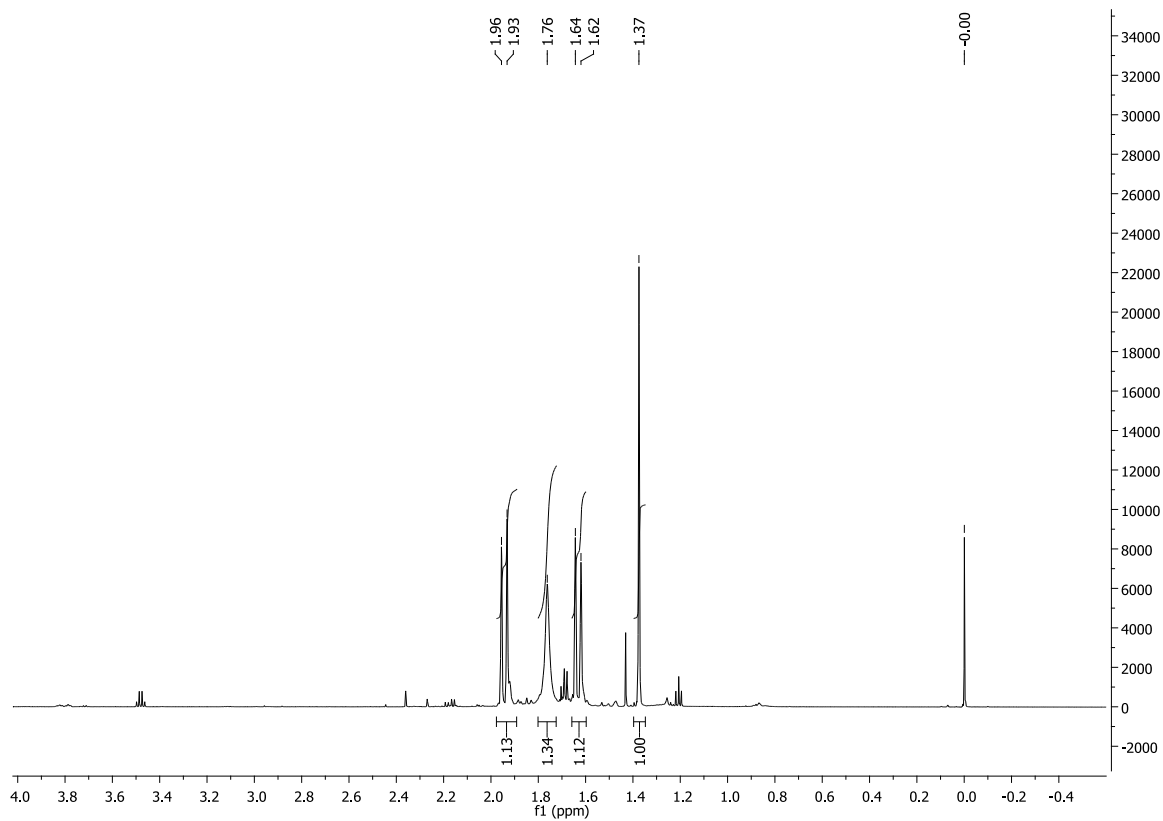
338. L. Chen, D.L. Capone, F.A. Tondini i D.W. Jeffery, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 4674–4682.
339. T.E. Siebert, A. Barker, W. Pearson, S.R. Barter, M.A. de Barros Lopes, P. Darriet, M.J. Herderich i I.L. Francis, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 2838–2850.
340. P. Liu, Y.Q. Huang, W.J. Cai, B.F. Yuan i Y.Q. Feng, *Anal. Chem.* **86** (2014) 9765–9773.
341. S.J. Zheng, Y.L. Wang, P. Liu, Z. Zhang, L. Yu, B.F. Yuan i Y.Q. Feng, *Food Chem.* **237** (2017) 399–407.
342. P. Bruheim, H.F.N. Kvitvang i S.G. Villas-Boas, *J. Chromatogr. A* **1296** (2013) 196–203.
343. V. Liem-Nguyen, K. Huynh, C. Gallampois i E. Björn, *Anal. Chim. Acta* **1067** (2019) 71–78.
344. C. Wilson, J. Brand, W. du Toit i A. Buica, *Food Res. Int.* **121** (2019) 633–640.
345. R. Frost, I. Quiñones, M. Veldhuizen, J.I. Alava, D. Small i M. Carreiras, *PLoS One* **10** (2015) 119–120.
346. M. Nedjma, *Am. J. Enol. Vitic.* **48** (1997) 333–338.
347. M. Nedjma i A. Maujean, *J. Chromatogr. A* **704** (1995) 495–502.
348. S. Kromidas i H.J. Kuss, *Quantification in LC and GC: A Practical Guide to Good Chromatographic Data*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009, str. 237–238.
349. A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio i I. Leito, *Anal. Chim. Acta* **870** (2015) 29–44.
350. S. Wang, M. Cyronak i E. Yang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2007) 701–707.
351. G. Cooper i A. Negrusz, *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, Pharmaceutical Press, London, 2013, str. 483–489.
352. N. Moreira, P. Guedes de Pinho, C. Santos i I. Vasconcelos, *Food Chem.* **123** (2010) 1198–1203.
353. Q. Meng, T. Kakuta i E. Sugawara, *Food Sci. Technol. Res.* **18** (2012) 429–436.
354. W. Chen, Y. Zhao, T. Seefeldt i X. Guan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48** (2008) 1375–1380.
355. N. Ercal, P. Yang i N. Aykin, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **753** (2001) 287–292.
356. S. Schoenauer i P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 3849–3861.

357. S.T. Chin i P.J. Marriott, *Chem. Commun.* **50** (2014) 8819–8833.
358. R. Emter i A. Natsch, *The Journal of biological chemistry* **283** (2008) 20645–20652.
359. V. Ferreira, R. López i J.F. Cacho *J. Sci. Food Agric.* **80** (2000) 1659–1667.
360. A. Spietelun, A. Kloskowski, W. Chrzanowski i J. Namieśnik, *Chemical reviews* **113** (2013) 1667–1685.
361. E.L. Alvino, E.C. Lochmaier, S.T. Iacono i A.R. Jennings, *Journal of Fluorine Chemistry* **232** (2020) 109454.
362. P. Costantini, A.S. Belzacq, H.L.A. Vieira, N. Larochette, M.A. de Pablo, N. Zamzami, S.A. Susin, C. Brenner i G. Kroemer, *Oncogene* **19** (2000) 307–314.
363. A.G. Howard i D.W. Russell, *Anal. Chem.* **69** (1997) 2882–2887.
364. K. Inoue, M. Nishimura, H. Tsutsui, J.Z. Min, K. Todoroki, J.M. Kauffmann i T. Toyooka, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 1228–1234.
365. K. Jarowicki i P. Kocieński, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (1999) 1589–1615.
366. A. Khedr i H. El-Sherief, *Biomedical Chromatography* **12** (1998) 57–60.
367. J. W. Newman i B. D. Hammock, *J. Chromatogr. A* **925** (2001) 223–240.
368. M.S.T. Russo, A. Napylov, A. Paquet i D. Vučković, *Anal. bioanal. chem.* **412** (2020) 1639–1652.
369. A.P. Topolyan, M.A. Belyaeva, M.S. Slyundina, V.V. Ilyushenkova, A.A. Formanovsky, V.A. Korshun i R.S. Borisov, *Anal. Methods* **9** (2017) 6335–6340.
370. S. Yang, S. Huang, D. Liu i F. Liao, *Synthetic Metals* **162** (2012) 2228–2235.
371. K.R. Hebditch, L. Nicolau i M.A. Brimble, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **50** (2007) 237–243.
372. O.D. Sparkman, Z.E. Penton i F.G. Kitson, *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*, Academic Press, Oxford, 2011, str. 411–414.
373. C. Hennig, R.B. Oswald i S. Schmatz, *The Journal of Physical Chemistry A* **110** (2006) 3071–3079.
374. K.C. Westaway, *Advances in Physical Organic Chemistry* **41** (2006) 217–273.
375. K.J. Laidler, *Chemical Kinetics*, Harper & Row., 1987, str. 427–447.
376. M. Metafa i A. Economou, *J. Chromatogr. A* **1305** (2013) 244–258.
377. M.L. Murat, T. Tominaga, C. Saucier, Y. Glories i D. Dubourdieu, *Am. J. Enol. Vitic.* **54** (2003) 135–138.
378. A.M. Jagatić Korenika, J. Biloš, B. Kozina, I. Tomaz, D. Preiner i A. Jeromel, *Foods* **9** (2020) 1–18.

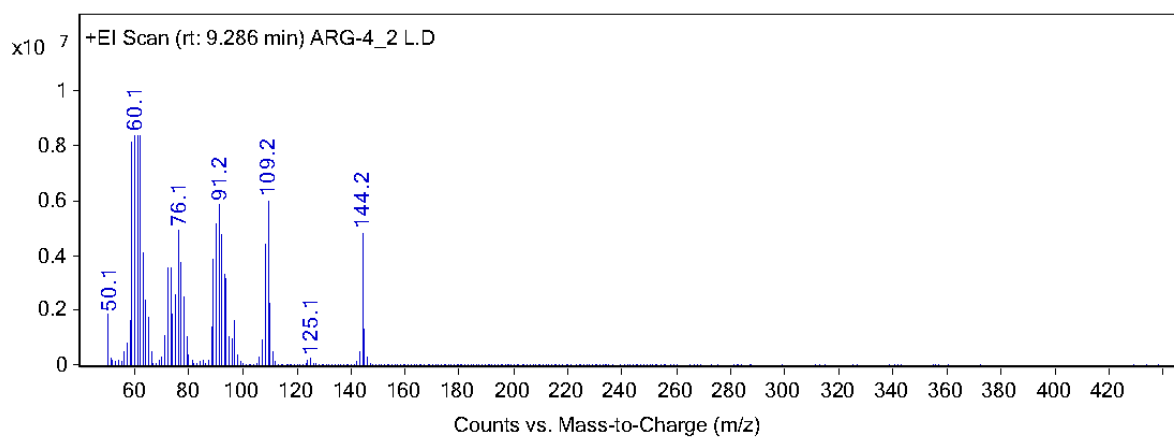
§ 8. DODATAK



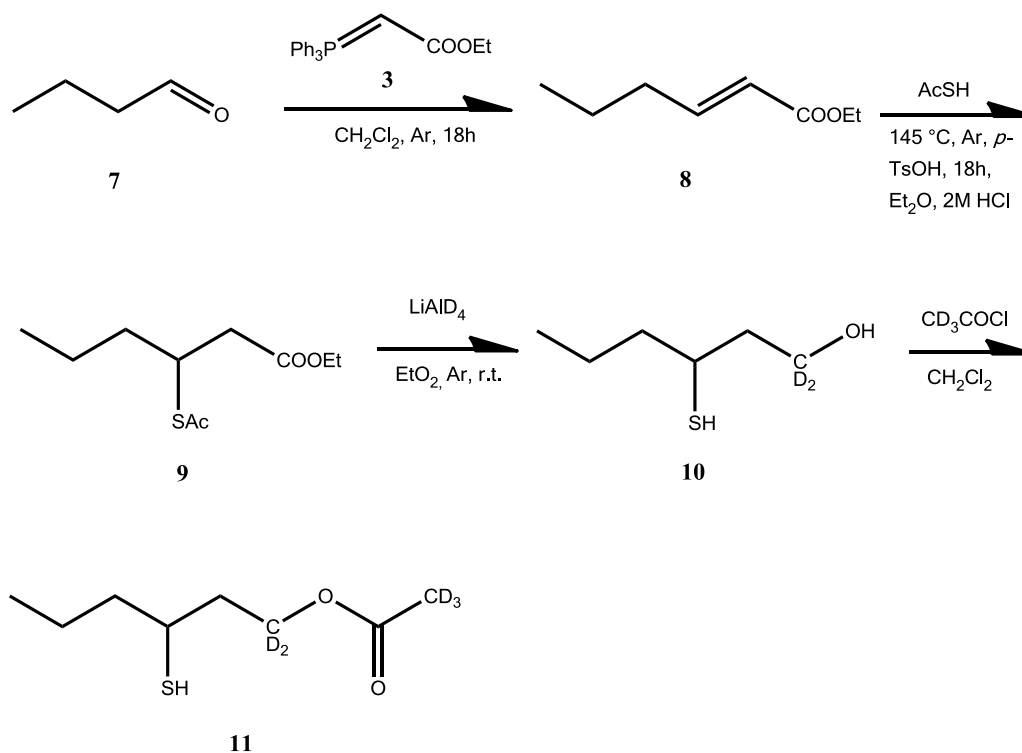
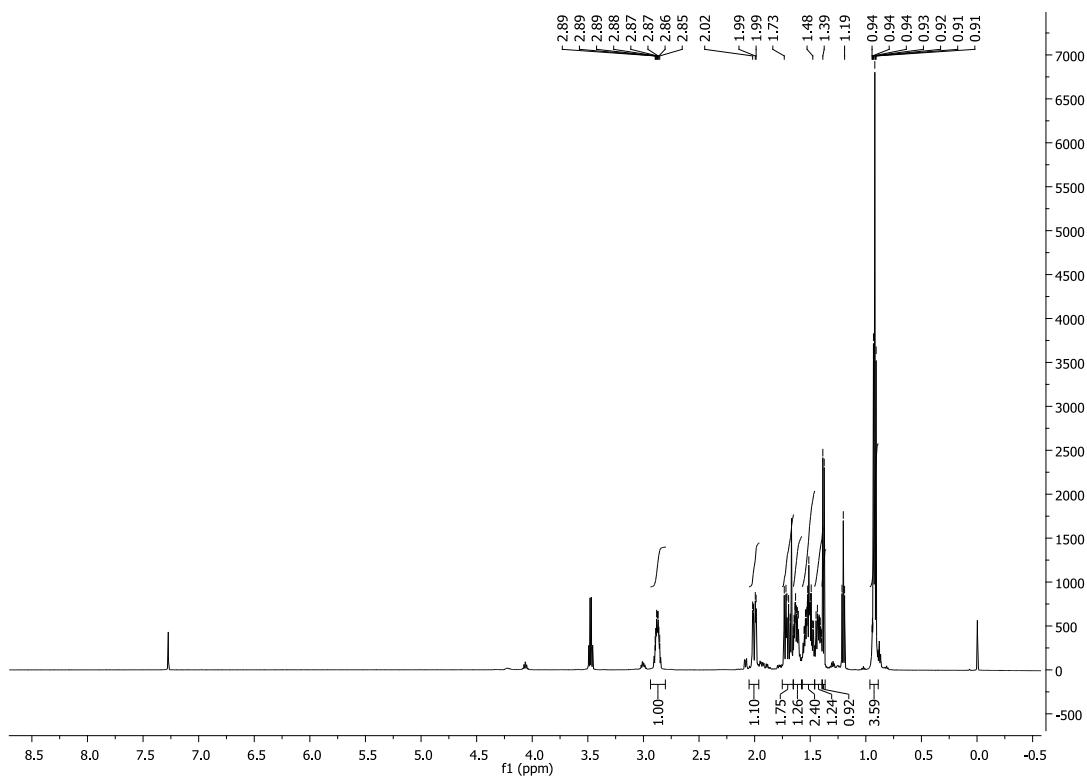
Slika 8.1. Sinteza parcijalno deuteriranog izotopomera [$^2\text{H}_{10}$]-3-SH

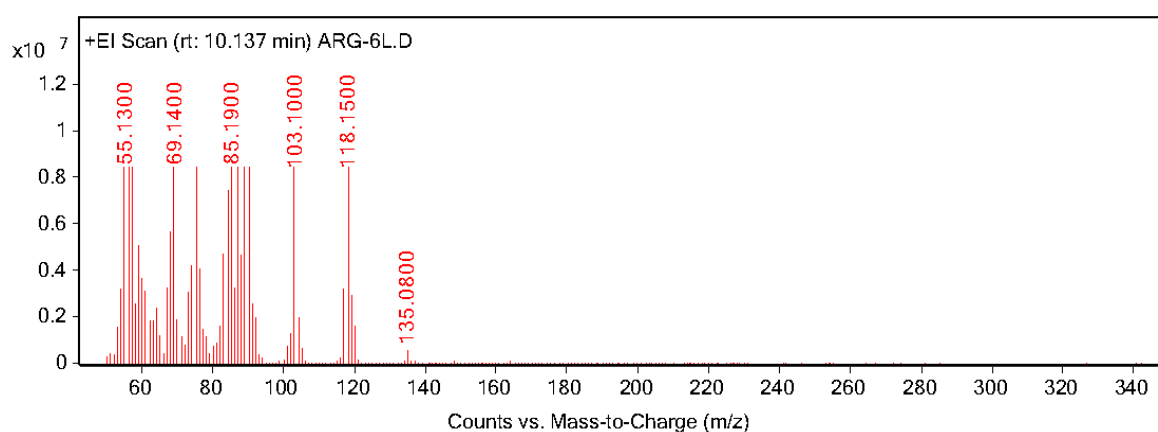


Slika 8.2. Spektar ^1H NMR sintetiziranog unutarnjeg standarda $[\text{}^2\text{H}_{10}]$ -3-SH

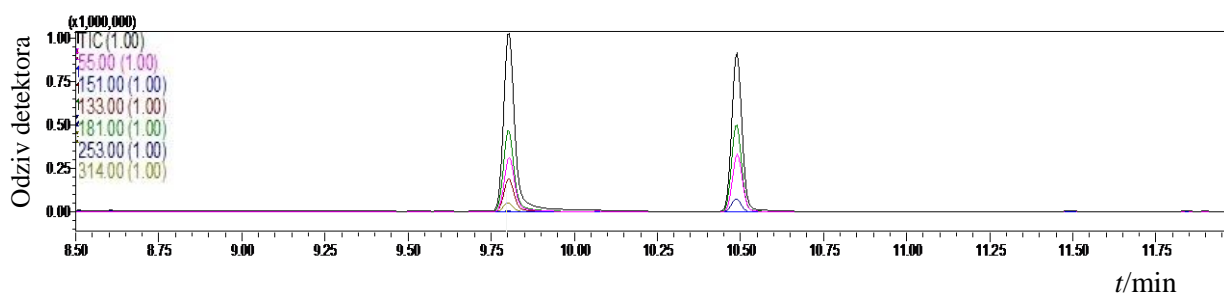


Slika 8.3. Spektar masa sintetiziranog unutarnjeg standarda $[\text{}^2\text{H}_{10}]$ -3-SH

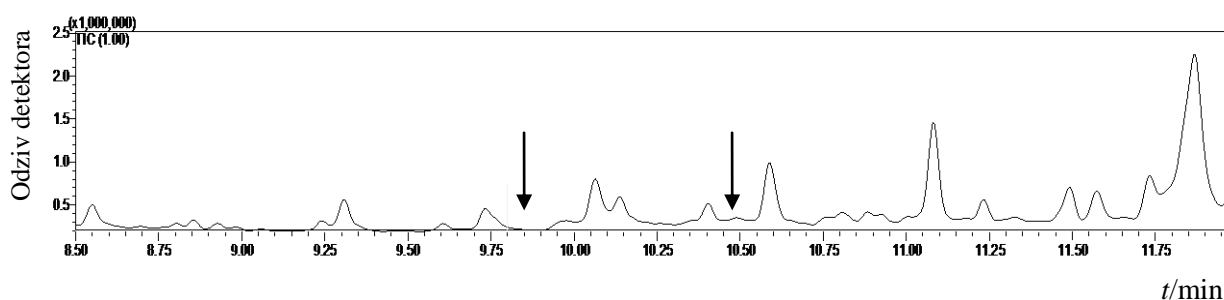
Slika 8.4. Sinteza parcijalno deuteriranog izotopomera [$^2\text{H}_5$]-3-SHASlika 8.5. Spektar ^1H NMR sintetiziranog unutarnjeg standarda [$^2\text{H}_5$]-3-SHA



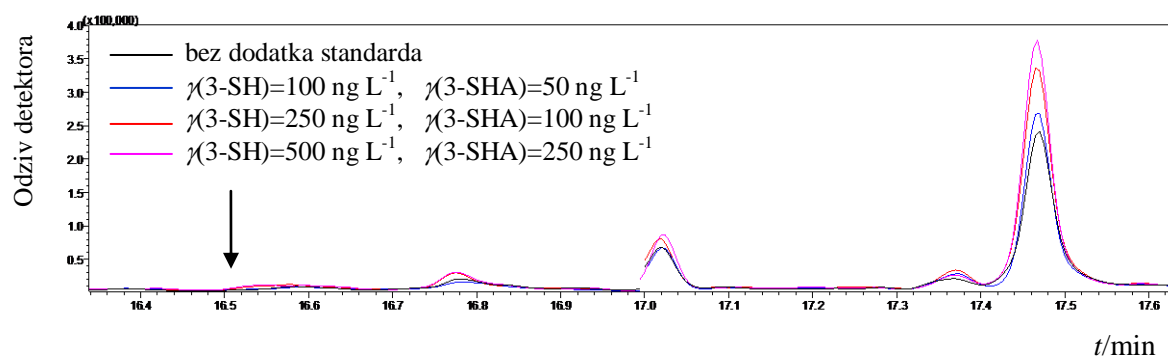
Slika 8.6. Spektar masa sintetiziranog unutarnjeg standarda [$^2\text{H}_5$]-3-SHA



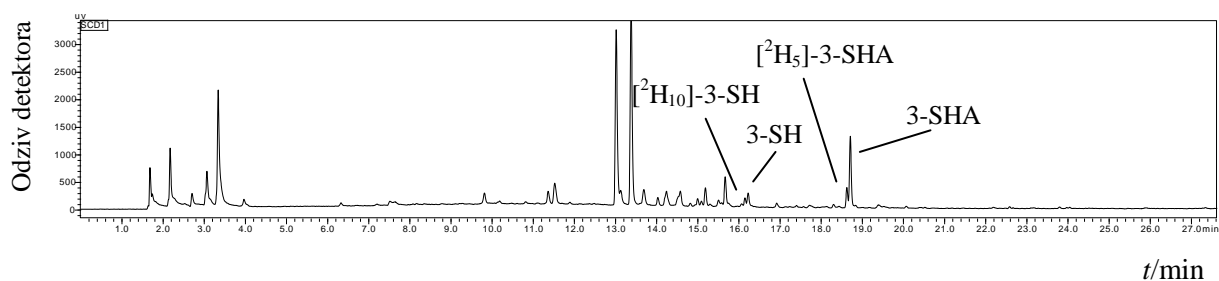
Slika 8.7. SIM-kromatogram derivata sortnih tiola s PFBBr-om ekstrahiranih iz modelnog vina. Naznačene vrijednosti m/z praćenih fragmentnih iona. Masene koncentracije derivata $\gamma=1 \text{ mg L}^{-1}$



Slika 8.8. GC-MS/MS-kromatogram ekstrakta neutralnog vina nakon dodatka i derivatizacije PFBBr-om standarda sortnih tiola. Signali derivata tiola nisu detektirani. Strelicom je označeno vrijeme zadržavanja PFBBr-derivata sortnih tiola



Slika 8.11. GC-MS/MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola snimljen tehnikom MRM nakon ekstrakcije iz eksperimentalnog vina serije F etil-acetatom i zatim iz ekstrakta tehnikom HS-SPME. Masena koncentracija unutarnjih standarda: $\gamma([^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH})=200 \text{ ng L}^{-1}$, $\gamma([^2\text{H}_5]\text{-3-SHA})=100 \text{ ng L}^{-1}$. Strelicom je označeno vrijeme zadržavanja 3-SH-ETP



Slika 8.12. GC-SCD-kromatogram sortnih tiola ekstrahiranih iz uzorka eksperimentalnog vina serije B primjenom tehnike HS-SPME

Tablica 8.1. Optimirane energije fragmentacije uz vrijednost m/z fragmentnih iona u prijelazu i relativni intenzitet prijelaza izračunat programom SmartMRM. I – najveća vrijednost odziva za promatrani prijelaz. a) 3-SH-ETP; b) 3-SHA-ETP; c) [$^2\text{H}_{10}$]-3-SH-ETP i d) [$^2\text{H}_5$]-3-SHA-ETP

a)

Prijelaz m/z	187,10→87,10	187,10→83,10	232,10→214,10	187,10→55,10	214,10→127,10	232,10→141,00
I	1236	1210	1150	1133	1024	697
CE / eV	12	6	3	18	6	9

b)

Prijelaz m/z	229,10→83,10	229,10→143,10	229,10→187,10	229,10→55,20	241,15→107,10	274,10→55,10
I	1888	1405	1332	1255	566	556
CE / eV	12	6	6	24	15	33

c)

Prijelaz m/z	197,15→92,20	197,15→87,10	197,15→60,20	242,15→222,20	223,15→150,20	197,15→103,00
I	695	683	535	441	410	400
CE / eV	6	9	21	3	6	6

d)

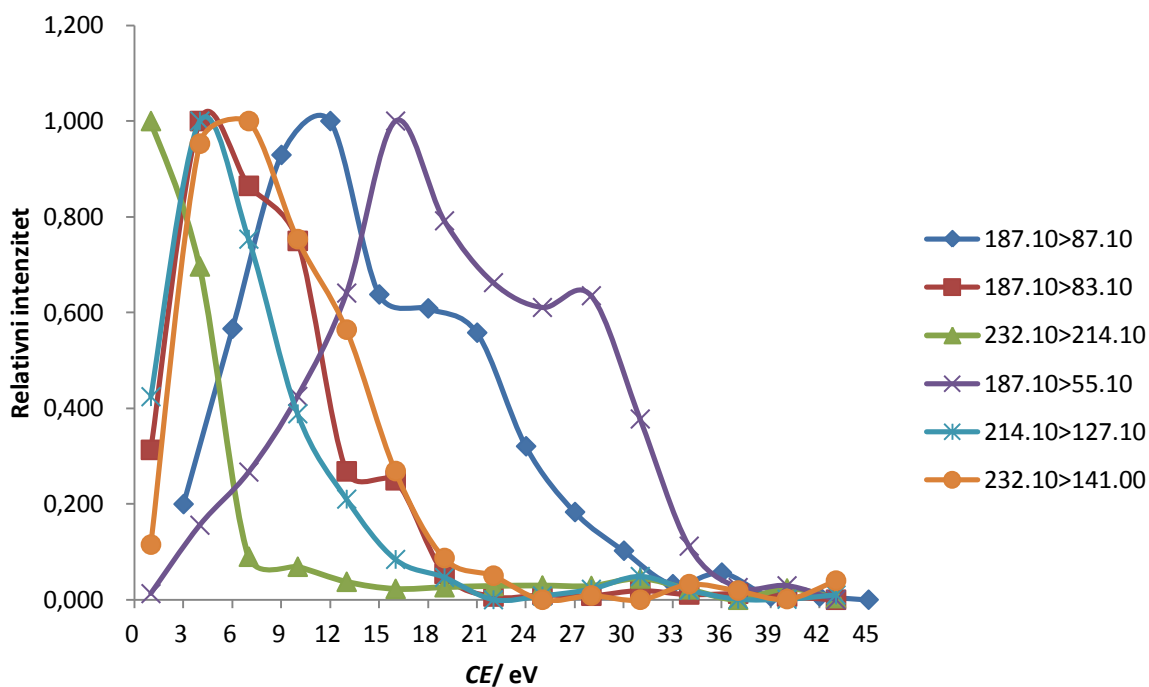
Prijelaz m/z	234,10→85,10	234,10→190,10	234,10→148,30	279,15→85,10	279,15→246,20	234,10→56,10
I	2603	1565	1322	1091	1045	1005
CE / eV	12	6	6	21	3	30

Tablica 8.2. Parametri prijelaza u tri različite isprobane metode praćenja višestrukih reakcija (MRM1-3) uz energije fragmentacije za ETP-derivate sortnih tiola i pripadnih unutarnjih standarda

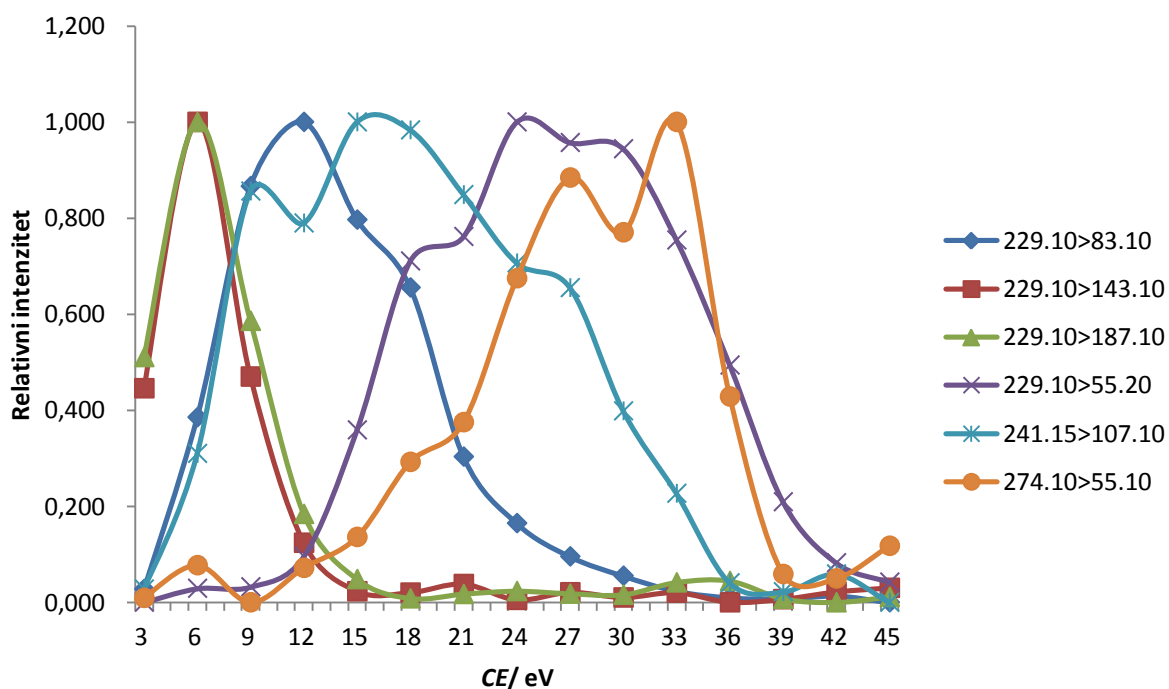
Spoj	$t_{poč}$ / min	t_{kon} / min	Prijelaz fragmentnog iona 1 m/z	Ch1 CE / eV	Prijelaz fragmentnog iona 2 m/z	Ch2 CE / eV	Prijelaz fragmentnog iona 3 m/z	Ch3 CE / eV	Prijelaz fragmentnog iona 4 m/z	Ch4 CE / eV	Prijelaz fragmentnog iona 5 m/z	Ch5 CE / eV		
MRM1														
[² H ₁₀]-3-SH-ETP	16,00	17,00	197,15→92,20	6	197,15→87,10	9	197,15→60,20	21	242,15→222,20	3	/			
3-SH-ETP			187,10→83,10	6	187,10→87,10	12	187,10→55,10	18	232,10→214,10	3				
[² H ₅]-3-SHA-ETP	17,00	17,75	234,10→85,10	12	234,10→190,10	6	234,10→148,30	6	279,15→85,10	21				
3-SHA-ETP			229,10→83,10	12	229,10→187,10	6	229,10→143,10	6	229,10→55,20	24				
MRM2														
[² H ₁₀]-3-SH-ETP	16,00	17,00	242,15→222,20	3	242,15→150,30	12	223,15→150,20	6	242,15→149,20	12			/	
3-SH-ETP			232,10→214,10	3	232,10→141,00	9	214,10→141,10	6	232,10→127,10	9				
[² H ₅]-3-SHA-ETP	17,00	17,75	234,10→85,10	12	234,10→190,10	6	234,10→148,30	6	279,15→85,10	21				
3-SHA-ETP			229,10→83,10	12	229,10→187,10	6	229,10→143,10	6	229,10→55,20	24				
MRM3														
[² H ₁₀]-3-SH-ETP	16,00	17,00	150,00→115,30	6	242,15→223,10	3	150,00→102,00	18	197,15→92,00	3	242,15→242,15	0		
3-SH-ETP			141,00→107,20	6	232,00→214,20	6	141,00→113,20	6	187,00→83,20	6	232,00→232,00	0		
[² H ₅]-3-SHA-ETP	17,00	17,75	234,10→85,10	12	234,10→190,10	6	234,10→148,30	6	279,15→85,10	21	279,15→279,15	0		
3-SHA-ETP			229,10→83,10	12	229,10→187,10	6	229,10→143,10	6	229,10→55,20	24	274,10→274,10	0		

t - raspon vremena zadržavanja na plinskokromatografskoj koloni

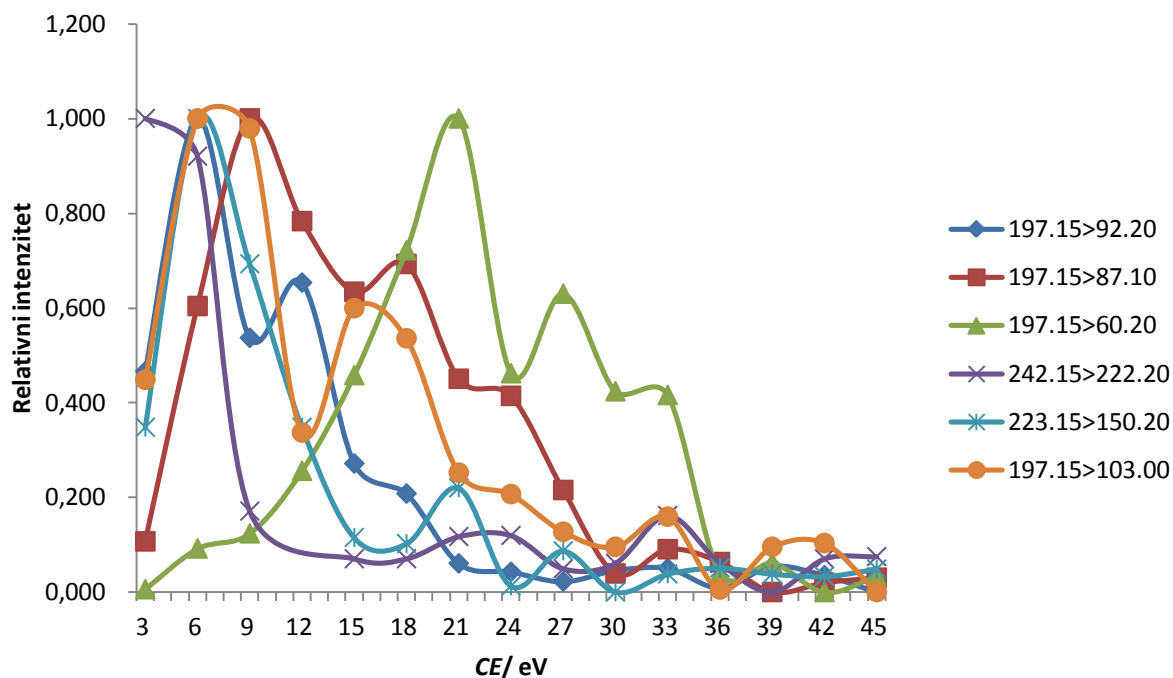
a)



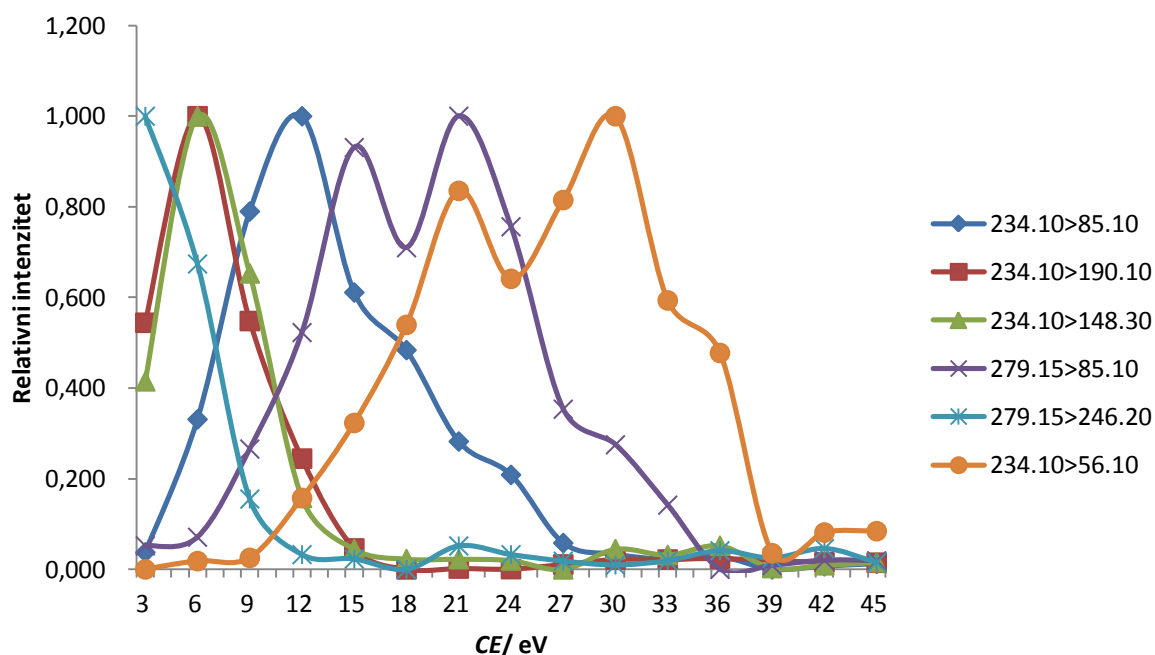
b)



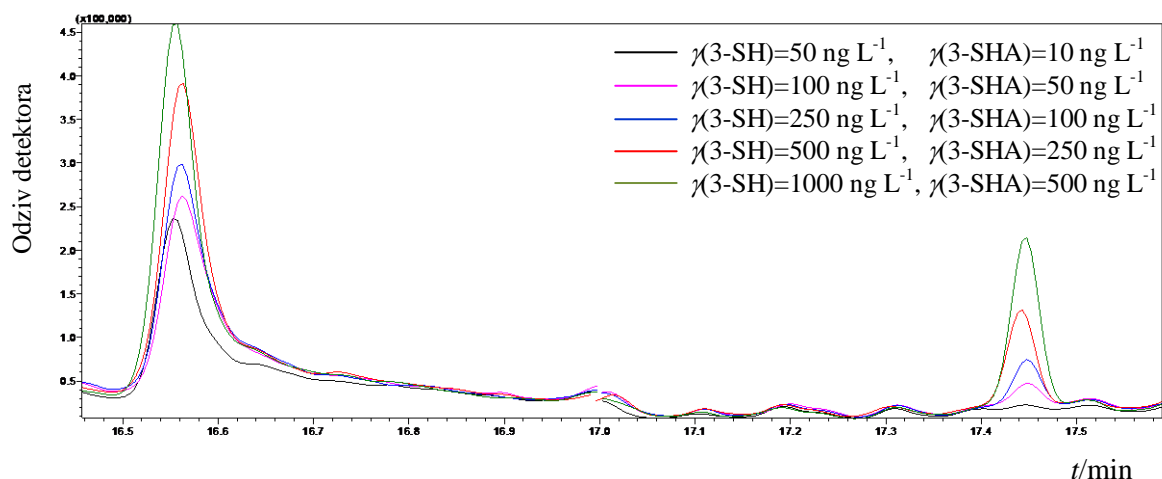
c)



d)



Slika 8.13. Rezultati optimiranja metode MRM primjenom programa SmartMRM. Odnos intenziteta fragmentacije navedenog prijelaza i energije fragmentacije u rasponu od 3 eV do 45 eV za derivat sortnog tiola (a) 3-SH-ETP, (b) 3-SHA-ETP te derivat unutarnjeg standarda (c) $[^2\text{H}_{10}]\text{-3-SH-ETP}$ i (d) $[^2\text{H}_5]\text{-3-SHA-ETP}$

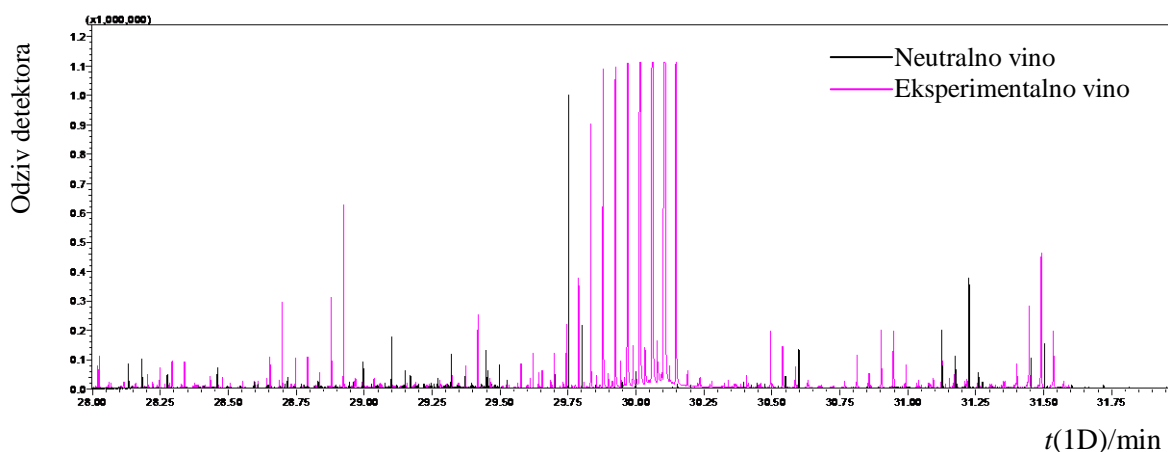


Slika 8.14. GC-MS/MS-kromatogram ETP-derivata sortnih tiola snimljen praćenjem odabranih višestrukih reakcija pri pet koncentracijskih razina standardnog dodatka

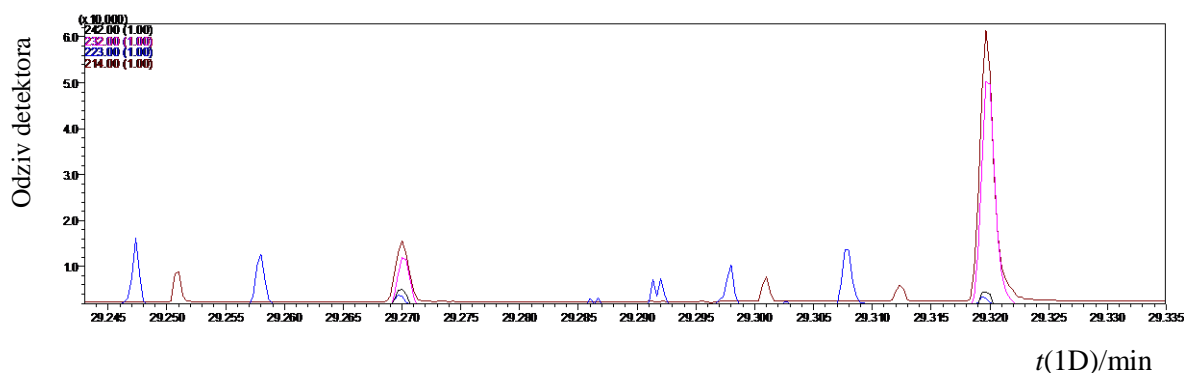
Tablica 8.3. Osnovni fizikalno-kemijski parametri uzoraka eksperimentalnih vina.³⁷⁸

Vrijednosti izražene u g L⁻¹ osim gdje je drugačije naznačeno

Seriya vina	A	B	C	D	E	F
Gustoća/ g cm ⁻³ (20 °C)	0,9899	0,9903	0,9914	0,9914	0,9908	0,9912
Etanol	108,5	107,8	107,1	106,4	108,5	107,8
φ (Etanol) / %	13,7	13,6	13,6	13,5	13,7	13,6
Ekstrakt, ukupni	19,8	20,6	23,2	22,9	22,2	22,9
Šećer, reducirajući	2,8	2,7	5,8	6,2	5,3	5,6
Ukupne kiseline (kao vinska)	5,8	6,6	6,0	5,9	6,2	6,4
Hlapljive kiseline (kao octena)	0,60	0,54	0,65	0,70	0,65	0,59
Nehlapljive kiseline	5,1	5,9	5,2	5,0	5,4	5,7
pH	3,33	3,28	3,30	3,30	3,28	3,31
SO ₂ , slobodni / mg L ⁻¹	-	-	-	-	-	-
SO ₂ , vezani / mg L ⁻¹	37,0	40,0	59,0	55,0	57,0	45,0
SO ₂ , ukupni / mg L ⁻¹	37,0	40,0	59,0	55,0	57,0	45,0
Pepeo	1,71	1,74	1,73	1,72	1,72	1,78



Slika 8.15. GCxGC-MS-kromatogram ekstrakta neutralnog i eksperimentalnog vina serije A u prvoj dimenziji. Ekstrakt vina pripravljen je primjenom metode SPE



Slika 8.16. GCxGC-MS-kromatogram derivata 3-SH-ETP i $[^2\text{H}_{10}]$ -3-SH-ETP ekstrahiranih iz neutralnog vina primjenom metode SPE. Kromatogram je prikaz kromatograma u prvoj dimenziji sa Slike 4.49. Naznačene su vrijednosti m/z praćenih iona

§ 9. ŽIVOTOPIS

Marko Viskić [REDACTED] je završio osnovnoškolsko i gimnazijsko obrazovanje. Na Državnom natjecanju i susretima iz kemije 2007. godine osvojio prvo mjesto. Studirao na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu (2007.-2012.) te diplomirao *Cum laude* s radom „Sinteza i QSAR modeliranje novih heteroaromatskih amida“. Stručni suradnik na Kemijskom institutu Sveučilišta u Oslu (2013.-2015.) u području fizikalne organske kemije nukleofilnih supstitucija alkildiazo spojeva. Od 2016. godine asistent na Zavodu za kemiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao Sveučilišni poslijediplomski (Doktorski) studij Kemija, smjer Analitička kemija. Znanstveni su mu interesi izolacija i određivanje struktura spojeva prirodnog porijekla, kromatografija sekundarnih biljnih metabolita, primjena nuklearne magnetne rezonancije u poljoprivredi te sensorika s naglaskom na primjenu vodljivih polimera. Prisustvovao na dvadesetak znanstvenih škola, skupova i seminara u Zemlji i inozemstvu te osvojio dvije nagrade. Na matičnoj instituciji izvodi nastavu iz kolegija „Kemija s osnovama biokemije“, „Agrikulturna kemija“, „Biljna biokemija“, „Kemija mošta i vina“ te „Instrumentalne metode kemijske analize“. Sudjelovao na nekoliko projekata popularizacije znanosti. Član Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (2018.-). Član Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa, Hrvatskog kemijskog društva i Mreže mladih znanstvenika. U slobodno vrijeme bavi se lovom i vrtlarstvom.

Znanstveni radovi u časopisima:

1. D. Leis, **M. Viskiće**, A. Jeromel, E. Leitner i L. Maslov Bandić, *Food Analytical Methods* **x** (2022) xxxx-xxxx. (prihvaćen za objavu)
2. **M. Viskiće**, N. Rakotomanomana, F. Chemat i A. Režek Jambrak, *Croatica Chemica Acta* **x** (2022) xxxx-xxxx. (prihvaćen za objavu)
3. J. Butorac, A. Budimir, M. Vinceković, M. Papac, K. Ljubičić, L. Jelak, M. Pospišil i **M. Viskiće**, *Journal of Central European Agriculture* **22** (2021) 816-829.
4. **M. Viskiće**, L. Maslov Bandić, A.M. Jagatić Korenika i A. Jeromel, *Foods* **10** (2021) 120-142.
5. M. Nutrizio, J. Gajdoš Kljusurić, Z. Marijanović, I. Dubrović, **M. Viskiće**, E. Mikolaj, F. Chemat i A. Režek Jambrak, *Molecules* **25** (2020) 3711.
6. M. Mihaljević Žulj, I. Počepan, **M. Viskiće** i L. Maslov Bandić, *Glasnik zaštite bilja* **43** (2020) 61-67.
7. M. Fathi, M. Vinceković, S. Jurić, **M. Viskiće**, A. Režek Jambrak i F. Donsi, *Food reviews international* **37** (2019) 1-45.
8. A. Lesac, U. Baumeister, I. Dokli, Z. Hameršak, T. Ivšić, D. Kontrec, **M. Viskiće**, A. Knežević i R.J. Mandle, *Liquid crystals* **7** (2018) 1101-1110.
9. M. Vinceković, S. Topolovec Pintarić, S. Jurić, **M. Viskiće**, N. Jalšenjak, M. Bujan, E. Đermić, I. Žutić i S. Fabek, *Agriculturae Conspectus Scientificus* **82** (2017) 395-401.
10. M. Vinceković, **M. Viskiće**, S. Jurić, J. Giacometti, D. Bursać Kovačević, P. Putnik, F. Donsi, F.J. Barba i A. Režek Jambrak, *Trends in food science & technology* **69** (2017) 1-12.
11. I. Sović, **M. Viskiće**, B. Bertoša, K. Ester, M. Kralj, M. Hranjec i G. Karminski-Zamola, *Monatshefte für Chemie* **146** (2015) 1503-1517.

Poglavlja u knjigama:

1. M. Vinceković, S. Jurić, M. Marijan, **M. Viskiće**, K. Vlahoviček Kahlina i L. Maslov Bandić, u C.M. Galanakis (ur.), *Aromatic Herbs in Foods*, Academic Press (Elsevier), 2021, str. 263-322.
2. L. Maslov Bandić, **M. Viskiće**, A.M. Jagatić Korenika i A. Jeromel, u J. Perez (ur.), *A closer look at grapes, wines and winemaking*, Nova Science pub., 2018, str. 43-74.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. **M. Viskiće**, D. Leis, E. Leitner, L. Maslov Bandić, Strategije analize sortnih tiola u vinu: derivatizacija i izotopno razrjeđenje, 5th PhD Student Symposium of the Faculty of Science, Zagreb, Hrvatska, 2021. (predavanje)
2. **M. Viskiće**, M. Vinceković, L. Maslov Bandić, Chemical characterization, extraction optimization and antioxidative potential assessment of prickly pear *Opuntia ficus-indica* from Croatia, 11th CASEE Conference, Prag, Češka, 2021. (predavanje)
3. **M. Viskiće**, M. Nutrizio, A. Kovač, M. Vinceković, A. Režek-Jambrak, Software assisted solvent screening and extraction of bioactive compounds from Mediterranean plants with “green“ solvents, 55th Croatian and 15th international Agriculture Symposium, Vodice, Hrvatska, 2020. (poster)
4. S. Jurić, B. Mutaliyeva, K. Vlahoviček-Kahlina, K. Sopko, **M. Viskiće**, N. Jalšenjak, A. Prosyanić, M. Vinceković, New microcapsule formulations with plant growth promoters - Encapsulation of Amines for Sustained Release, 33rd Conference of The European Colloid and Interface Society, Leuven, Belgija, 2019. (poster)
5. **M. Viskiće**, M. Vinceković, S. Jurić, K. Vlahoviček-Kahlina, L. Maslov Bandić, E. Đermić, I. Žutić, S. Fabek, S. Topolovec-Pintarić, Application of alginate microparticles simultaneously loaded with *Trichoderma viride* and calcium or copper cations on tomato cultivation, 10th CASEE Conference, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2019. (poster)
6. M. Vinceković, S. Jurić, **M. Viskiće**, E. Đermić, I. Žutić, S. Fabek Uher, K. Vlahoviček Kahlina, S. Topolovec-Pintarić, Alginate microparticles loaded with biofertilizers and macro- or micronutrients for agroecological production, 10th CASEE Conference 2019, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2019. (predavanje)

7. **M. Viski**ć, N. Rakotomanomana, F. Chemat, M. Vinceković, A. Režek-Jambrak, Estimation of solubility of bioactive compounds from Mediterranean plants in “green“ solvents and natural deep eutectic solvents by COSMO-RS software, 26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, Šibenik, Hrvatska, 2019. (poster)
8. M. Vinceković, S. Jurić, N. Jalšenjak, K. Vlahoviček Kahlina, L. Maslov Bandić, **M. Viski**ć, M. Mrkonjić Fuka, Encapsulation method as a promising tool for RNAi- based products in plant protection, 3rd iPlanta Conference and MC meeting, Lisabon, Portugal, 2019. (predavanje)
9. S. Jurić, **M. Viski**ć, L. Maslov Bandić, A. Režek Jambrak, N. Jalšenjak, S. Fabek Uher, I. Žutić, S. Topolovec- Pintarić, E. Đermić, M. Vinceković, Bioencapsulation as a Sustainable Targeted Agricultural Delivery of Bioactive Agents in the Hydroponic Cultivation of *Lactuca sativa*, 9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Hrvatska, 2018. (poster)
10. S. Jurić, M. Vinceković, **M. Viski**ć, F. Donsi, A. Režek Jambrak, Encapsulation of Mediterranean plants extracts obtained by means of non-conventional high voltage electrical discharges method, 32nd Conference of the European Colloid and Interface Society, Ljubljana, Slovenija 2018. (poster)
11. S. Jurić, **M. Viski**ć, L. Maslov Bandić, A. Režek Jambrak, N. Jalšenjak, S. Fabek Uher, I. Žutić, S. Topolovec- Pintarić, E. Đermić, M. Vinceković, Bioencapsulation as a sustainable targeted agricultural delivery of bioactive agents in the conventional cultivation of *Lactuca sativa*, 32nd Conference of the European Colloid and Interface Society, Ljubljana, Slovenija, 2018. (poster)
12. **M. Viski**ć, M. Vinceković, S. Jurić, L. Maslov Bandić, E. Đermić, I. Žutić, S. Fabek-Uher S. Topolovec-Pintarić, Application of *Trichoderma viride* loaded in calcium alginate microcapsules in hydroponic tomato cultivation, 9th CASEE Conference, Bukurešt, Rumunjska, 2018. (poster)
13. M. Vinceković, S. Jurić, **M. Viski**ć, E. Đermić, I. Žutić, S. Fabek Uher, S. Topolovec-Pintarić, New type of biofertilizers: microspheres/microcapsules loaded with chemical and biological agents, 9th CASEE conference, Bukurešt, Rumunjska, 2018. (predavanje)
14. A. Lesac, U. Baumeister, I. Dokli, Z. Hameršak, T. Ivšić, D. Kontrec, **M. Viski**ć, A. Knežević, Correlation between geometry and formation of spontaneously chiral twist-bend nematic phase, 25th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, Poreč, Istra, 2017. (poster)
15. M. Vinceković, N. Jalšenjak, S. Topolovec- Pintarić, E. Đermić, S. Jurić, **M. Viski**ć, I. Žutić, S. Fabek, Simultaneous encapsulation of bioactive components for nutrition and plant protection, 31st Conference of the European Colloid and Interface Society, Madrid, Španjolska, 2017. (pozvano predavanje)

16. M. Vinceković, S. Jurić, S. Topolovec- Pintarić, **M. Viskiće**, N. Jalšenjak, M. Bujan, E. Đermić, I. Žutić, S. Fabek, Release of *Trichoderma viride* spores from microcapsules simultaneously loaded with chemical and biological agents, 8th CASEE Conference, Varšava, Poljska, 2017. (predavanje)
17. L. Maslov Bandić, **M. Viskiće**, P. Štambuk, New extraction method for determination of primary aromas in grape, 19th Euroanalysis, Stockholm, Švedska, 2017. (poster)
18. M. Vinceković, S. Topolovec-Pintarić, N. Jalšenjak, I. Žutić, E. Đermić, S. Jurić, **M. Viskiće**, M. Bujan, K. Martinko, Simultaneous encapsulation of bioactive agents in protection and plant nutrition, 52nd Croatian and 12th International Symposium on Agriculture, Osijek, Hrvatska, 2017. (poster)
19. S. Jurić, M. Vinceković, S. Topolovec-Pintarić, N. Jalšenjak, E. Đermić, M. Bujan, **M. Viskiće**, K. Martinko, Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper and *Trichoderma Viride* for Plant Nutrition and Protection, 16th Ružička days, Vukovar, Hrvatska, 2016. (poster)
20. **M. Viskiće**, C. Schnaars, T. Bonge Hansen, Expanding the reactivity of α -onium diazoacetates: nucleophilic substitutions with sulfides and a novel route to hydrazonoalkylthioacetates, 19th Organic Chemistry Winter Meeting of the Norwegian Chemical Society, Skeikampen, Norveška, 2015. (poster)
21. **M. Viskiće**, I. Sović, B. Bertoša, K. Ester, M. Kralj, M. Hranjec, G. Karminski-Zamola, Synthesis and QSAR of novel heteroaromatic amides as potentially antitumor active compounds, 6th Summer School of Medicinal Chemistry, Regensburg, Njemačka, 2012. (poster)
22. M. Aleksić, I. Sović, **M. Viskiće**, B. Bertoša, K. Ester, M. Kralj, G. Karminski-Zamola, Synthesis, Antitumor Activity and QSAR Analysis of Heterocyclic Amides and Quinolones, 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, Berlin, Njemačka, 2012. (poster)