

# Kontrola kvalitete kupinovitih vina primjenom HSS-GC-FID tehnike

---

**Mornar, Ana; Amidžić Klarić, Daniela; Nigović, Biljana**

*Source / Izvornik:* **Farmaceutski glasnik, 2011, 67, 741 - 746**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:813056>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Kontrola kvalitete kupinovitih vina primjenom HSS-GC-FID tehnike

ANA MORNAR<sup>1</sup>, DANIELA AMIDŽIĆ KLARIĆ<sup>2</sup>, BILJANA NIGOVIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>2</sup>Klinička bolnica Dubrava

## Quality assessment of blackberry wines by HSS-GC-FID

*Abstract* – Blackberries are grown in continental Croatia on small farms using traditional techniques of cultivation and harvesting by hand in summers. The most common blackberry cultivars in Croatia are Thornless Logan, Thornfree, Black Satin and Tayberry. A significant proportion of fresh fruits is directly processed into blackberry products - jam, juice or wine. Blackberry wine is a product of yeast fermentation of natural sugars present in blackberry juice. In addition to being a rich source of vitamins and dietary fibre, blackberry wine is rich in phenolic compounds such as anthocyanins, flavonols, flavanols, proanthocyanidins, and phenolic acids. During fermentation of blackberries, yeast interact with sugars in the juice to create ethanol, while abundance of other alcohols should be significantly lower. Methanol is a highly toxic alcohol whose ingestion or inhalation can cause damage of central nervous system, blindness and even death. In the view of this, it is extremely important to regularly control methanol content in the blackberry wines. Therefore, the aim of our work was to develop a new headspace gas chromatographic method with flame ionization detection (HSS-GC-FID) for the determination of methanol as the main volatile impurity present in blackberry wines.

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia,

<sup>2</sup>Clinical Hospital Dubrava, Zagreb, Croatia)

## UVOD

Ljekovita svojstva ploda kupine poznata su od davnina, a brojne znanstvene studije potvrdile su povoljan utjecaj ploda kupine na ljudsko zdravlje. Zbog toga je to koštuničavo voće i danas u središtu brojnih znanstvenih istraživanja. *Thornless Logan*, *Thornfree*, *Black Satin* i *Tayberry* najčešće su uzgajane sorte kupine u Hrvatskoj čije se značajne količine svježeg ploda direktno prerađuju u voćne proizvode – džem, sok ili vino.

Kupinovo vino je prehrambeni proizvod, dobiven alkoholnom fermentacijom soka ili masulja svježe kupine, koji se upotrebljava u promociji zdravlja i prevenciji bolesti. Uz makronutritivne sastojke poput ugljikohidrata, u tom voćnom vinu nalaze se i vitamini,

minerali, elementi u tragovima te različiti polifenoli, za koje u literaturi postoje podaci o njihovom pozitivnom učinku na ljudsko zdravlje (1, 2). Posljednjih desetljeća sve se više istražuju bioaktivne tvari s antioksidativnim učinkom. Takvi se učinci polifenola zasnivaju na vezanju slobodnih radikala koji sudjeluju u patogenezi niza bolesti, primjerice bolesti srca i krvožilnog sustava te kancerogenih oboljenja. Nadalje, polifenoli sudjeluju i u kreiranju boje, okusa i mirisa, odnosno arome vina (3, 4).

Nutritivne i biološki aktivne sastavnice kao i nepoželjne, toksične tvari u vino dospijevaju izravno iz ploda ili nastaju tijekom procesa proizvodnje. Glavni produkt alkoholne fermentacije je etanol te se po završetku fermentacije udio etanola u vinu obično kreće između 7 i 24% (5). Vina, kod kojih je udio etanola manji od 10%, podložnija su kvarenju, odnosno djelovanju kvasaca i drugih mikroorganizama.

Gotovo sva kupinova vina uz etanol sadrže i metanol, a njegova količina u vinu jedna je od kritičnih točaka koju je nužno kontrolirati tijekom alkoholne fermentacije u proizvodnji vina, da bi ta namirnica bila zdravstveno ispravna za prehranu. Metanol u vinu nastaje kao produkt enzimske razgradnje prirodno prisutne pektinske tvari u kljuku svježeg ploda uz prisutnost pektinesteraze. Udio metanola u pojedinom kupinovom vinu ovisi o nizu faktora: sorti grožđa, zdravstvenoj ispravnosti ploda, maceraciji, temperaturi fermentacije i proteolitičkim enzimima. Metanol je odavno poznat kao štetna i otrovna tvar za zdravlje, čija ingestija ili udisanje može izazvati sljepilo ili smrt (6, 7). Nakon konzumiranja, metanol se oksidira u mravlju kiselinu, pri čemu su i jedna i druga tvar toksične za središnji živčani sustav. Također, formaldehid, metabolit metanola, uništava optičke živce te može uzrokovati sljepoću (8). Newsholme i Leech (9) u svom su istraživanju došli do zaključka da oksidirani metanol utječe na razvoj mliječne acidoze, metaboličke bolesti uzrokovane povećanjem razine mliječne kiseline u krvi. Svi ti simptomi dovode do slabosti, povraćanja te na kraju kome i smrti (6, 10). Za kupinova vina, do sada, nije definirana najviša dozvoljena koncentracija metanola, no prema smjernicama OIV-a (11), najviša dozvoljena koncentracija metanola za bijela vina iznosi 250 mg/L, a za crna vina 400 mg/L.

Budući da se proizvodnja kupinovog vina kod nas povećava već duži niz godina, a brojni proizvodi prisutni na tržištu u nisu dobiveni standardiziranim procesom proizvodnje, cilj je ovoga rada predložiti novu metodu za određivanje udjela metanola u komercijalno dostupnim kupinovim vinima, primjenom plinske kromatografije i plameno-ionizacijskog detektora (engl. *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*, GC-FID). S obzirom na složenost sastava uzorka kupinovog vina za uzorkovanje je poželjno iskoristiti sve prednosti tehnike uzorkovanja para iznad otopine (engl. *Headspace Sampler*, HSS) (12, 13). *Headspace* označava prostor u kojem se analit nalazi u plinovitoj fazi iznad tekućeg ili krutog uzorka u bočici za uzorkovanje. Dakle, HSS tehnika se rabi za ekstrakciju hlapljivih i poluhlapljivih organskih supstancija iz čvrstih ili tekućih uzoraka (14). Uzorak se stavlja u prikladnu bočicu za uzorkovanje te zagrijava pri čemu lakohlapljivi analiti prelaze u plinovito stanje, dok se ne postigne stanje ravnoteže. Afinitet analita za prelazak iz tekuće ili krute faze u plinovitu opisuje se koeficijentom razdjeljenja ( $K$ ):

$$K = \frac{c_s}{c_g} \quad (1)$$

gdje je  $c_s$  koncentracija analita u uzorku, a  $c_g$  koncentracija analita u plinovitoj fazi. Potom se zadani volumen ekstrahiranog, plinovitog analita iz *headspace* prostora prenosi u plinski kromatograf. Da bi se postigla što bolja osjetljivost i selektivnost metode potrebno je optimirati uvijete ekstrakcije analita iz pojedinog uzorka.

Uz brojne navedene prednosti HSS tehnike potrebno je istaknuti i njezine nedostatke. Ta tehnika uzorkovanja neprimjenjiva je za termolabilne analite kao i za uzorke koji se pjenе. Nadalje, visoka cijena uređaja te potrošnog materijala čini glavnu zapreku širokoj primjeni tehnike.

## Metode

### *Priprema standardnih otopina i uzoraka*

Uzorak kupinovog vina ispituje se bez prethodne obrade.

Standardna je otopina metanola (0,1%) pripremljena razrjeđivanjem metanola čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Dramstadt, Njemačka) s vodom pročišćenom Milipore sustavom (Milipore, Bedford, MA, SAD).

Kao interni standard upotrijebljen je 4-metil-2-pentanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).

Radne otopine za izradu kalibracijskog pravca pripremljene su razrjeđivanjem metanola i 4-metil-2-pentanola s ispitivanim uzorkom kupinovog vina.

### *Uzorkovanje*

2,00 mL uzorka vina prenese se u bočicu za uzorkovanje *Headspace Sampler* tehnikom neposredno prije analize te zatvori aluminijskim čepom. Potom se uzorak zagrijava u *Headspace Sampler-u* (Agilent G1888, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) 30 minuta pri 80 °C. Nakon zagrijavanja uzorak se unosi u kromatograf tijekom 1 minute pri temperaturi od 100 °C.

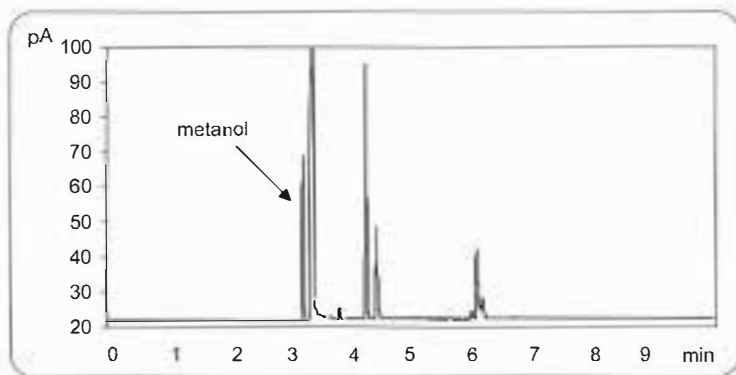
### *Kromatografska analiza*

Plinska kromatografija provedena je na instrumentu Agilent 6850 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) primjenom kolone za plinsku kromatografiju HP-1, dimenzija 30 m x 0,32 mm, debljine filma 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Temperatura injektora iznosila je 230 °C dok je kao plin nositelj upotrijebljen dušik za kromatografiju brzine protoka 19 cm/s. Za razdvajanje analita primijenjen je temperaturni program. Temperatura kolone održavala se na 40 °C tijekom dvije minute te se povećavala brzinom 5 °C/min do 10-te minute. Detekcija analita provedena je plameno-ionizacijskim detektorom čija je temperatura iznosila 250 °C, dok su kromatogrami obrađeni računalnim programom ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Svi uzorci pripremljeni su i analizirani u triplikatu.

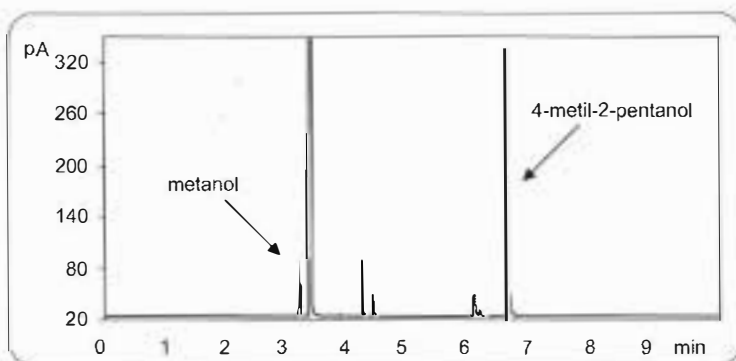
### *Rezultati i rasprava*

Analiza udjela metanola u kupinovom vinu provedena je primjenom plinske kromatografije. Budući da je ispitani uzorak vina, u pogledu sastava iznimno složen uzorak, za

unošenje uzorka na kolonu primijenjena je *Headspace* tehnika. Iz tog razloga za analizu odabranog uzorka vina plinskom kromatografijom, prvo su optimirani uvjeti uzorkovanja te potom uvjeti provođenja kromatografske analize. Preliminarna su istraživanja pokazala kako se pri odabranim uvjetima uzorkovanja postiže maksimalna ekstrakcija i metanola i internog standarda 4-metil-2-pentanola te prihvatljivo vrijeme analize. Nadalje, cilj je istraživanja bio razviti plinsko kromatografsku metodu kojom bi se odredio udio ekstrahiranog metanola. Na slici 1. prikazan je kromatogram ispitivanog uzorka kupinovitog vina dok je na slici 2. prikazan kromatogram uzorka kupinovitog vina u kojeg su dodane standardne otopine metanola i 4-metil-2-pentanola. Iz kromatograma je vidljivo kako su primjenom HSS tehnologije ekstrahirane samo hlapljive sastavnice kupinovitog vina. Metanol prisutan u ispitivanom uzorku identificiran je usporedbom njegova vremena zadržavanja ( $t_R = 3,208 \pm 0,006$  min) u uzorku i u standardnoj otopini metanola (0,1 %) u ultračistoj vodi. Predloženom metodom postiglo se razdvajanje metanola i 4-metil-2-pentanola od ostalih lakohlapljivih sastavnica kupinovitog vina. Razlučivanje metanola od ostalih susjednih pikova bilo je veće od 6,54 dok je razlučivanje 4-metil-2-pentanola od

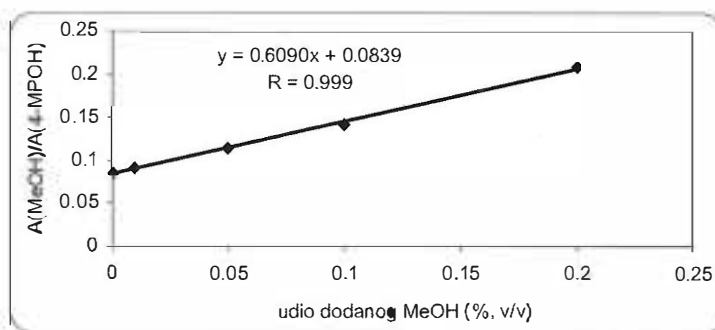


Slika 1. Kromatogram ispitivanog uzorka kupinovitog vina



Slika 2. Kromatogram uzorka kupinovitog vina u koji su dodane standardne otopine metanola (0,1%, v/v) i 4 metil-2-pentanola (0,1%, v/v)

ostalnih sastavnica kupinovitog vina bilo veće od 11,19 što upućuje na prikladnost predložene HSS-GC-FID metode za određivanje udjela metanola u uzorku kupinovitog vina. Da bi se mogao odrediti udio metanola u ispitivanom uzorku, provedena je kalibracija metode. Linearnost metode ispitana je metodom standardnog dodatka da bi se umanjio utjecaj ostalih sastavnica vina na ekstrakciju metanola i 4-metil-2-pentanola. Udjeli metanola u otopinama za izradu baždarnog pravca iznosili su: 0,001% (v/v), 0,01% (v/v), 0,05% (v/v), 0,1% (%) i 0,2% (%), dok je udio internog standarda iznosio 0,1% (v/v). Na slici 3. prikazana je ovisnost omjera površina kromatografskih pikova metanola i 4-metil-2-pentanola o koncentraciji dodanog metanola. S obzirom da je koeficijent korelacije veći od 0,999 moguće je zaključiti da je metoda linearna za ispitano područje. Nadalje su određene granice dokazivanja (engl. *Limit Of Detection*, LOD) i određivanja (engl. *Limit Of Quantification*, LOQ). LOD i LOQ predstavljaju omjer signala i šuma 3:1 odnosno 10:1. S obzirom na niske vrijednosti limita dokazivanja (0,0002%) i određivanja (0,0005%) moguće je zaključiti da je predložena HSS-GC-FID metoda osjetljiva za određivanje udjela metanola u kupinovitom vinu.



Slika 3. Ovisnost omjera površina kromatografskih pikova metanola i 4-metil-2-pentanola o udjelu dodanog metanola

Nakon što su ispitani odabrani validacijski parametri metode, određen je udio metanola u ispitivanom komercijalno dostupnom uzorku kupinovitog vina. Udio metanola prisutnog u uzorku određen je iz kalibracijskog pravca te je iznosio  $0,127 \pm 0,002\%$ . S obzirom na relativno visok udio metanola, izmjeren u odabranom uzorku kupinovitog vina, potrebno je naglasiti važnost redovite kontrole kupinovitog vina s obzirom na sastav organskih otapala, posebice iznimno toksičnog metanola.

## ZAKLJUČAK

Posljednjih se godina proizvodnja kupinovitog vina na području Hrvatske sve više povećava. Budući da brojni proizvodi prisutni na tržištu nisu dobiveni standardiziranim procesom proizvodnje, nameće se važnost redovite kontrole kupinovitih vina s obzirom na sastav i koncentraciju kako nutritivnih i biološki aktivnih sastavnica tako i nepoželjnih, toksičnih tvari. Stoga je cilj ovoga rada bio predložiti novu HSS-GC-FID metodu za

određivanje udjela metanola u komercijalno dostupnim kupinovim vinima. Nakon provedenog laboratorijskog ispitivanja može se zaključiti da je u odabranom, komercijalno dostupnom vinu pronađen relativno veliki udio metanola. Štoviše, rezultati istraživanja upućuju na prisutnost ne samo metanola već i drugih lakohlapljivih otapala te će daljnja istraživanja biti usmjerena na identifikaciju i kvantifikaciju i ostalih prisutnih organskih otapala. Također će se pokušati primijeniti predložena metoda i na druga voćna vina, kao i na bijelo te crno vino.

*Zahvala* – Autorice se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske na financijskoj potpori u okviru projekta Istraživanje novih metoda u analitici ljekovitih i bioaktivnih tvari (no. 006-0061117-1240).

### Literatura – References

1. Amidžić Klarić D. Utjecaj ekološkog uzgoja kupine na udio nutritivnih i biološki aktivnih sastavnica kupinovog vina, doktorski rad, 2011.
2. Amidžić Klarić D, Klarić I, Velić D, Vedrina Dragojević I. Evaluation of mineral and heavy metal contents in Croatian blackberry wines. *Czech J. Food Sci.* 2011; 29:260–267.
3. Meret M, Brat P, Mertz C, Lebrun M, Günata Z. Contribution to aroma potential of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.). *Food Res. Int.* 2011; 44: 54–60.
4. Du X, Finn CE, Qian MC. Volatile composition and odouractivity value of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. *Food Chem.* 2010; 119: 1127–1134.
5. Jacobson JL. Introduction to wine laboratory practices and procedures. 1. ed. Berlin: Springer, 2006.
6. Gnekow B, Ough CS. Methanol in wines and musts: source and amounts. *Am. J. Enol. Viticul.* 1976; 27:1–6.
7. Cabaroglu T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. *Food Control.* 2005; 16:177–181.
8. Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdiou D. Handbook of Enology: the Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.
9. Newsholme EA, Leech AR. *Bioquímica Medica*. Madrid: Interamericana and McGraw Hill, 1986.
10. Duraković Z. *Klinička toksikologija*. Zagreb: Grafos, 2000.
11. The International Organisation of Vine and Wine. *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. ed. 2007. Paris: The International Organisation of Vine and Wine, 2008.
12. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Quality assessment of liquid pharmaceutical preparations by HSS-GC-FID. *J. Anal. Chem.* 2011; in press.
13. Apers S, Van Meenen E, Pieters L, Vlietinck A. Quality control of liquid herbal drug preparations: ethanol content and test on methanol and 2-propanol. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2003; 33:529–537.
14. Kolb B. Headspace sampling with capillary columns. *J. Chromatogr. A.* 1999; 842:163–205.

Primljeno 26. rujna 2011.