

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA PLEŠEC

**ANALIZA FRAKCIJ DESTILATA FERMENTIRANE
SADNE KAŠE KULTIVARJA HRUŠKE VILJAMOVKE
(*PYRUS COMMUNIS L.*)**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA PLEŠEC

**ANALIZA FRAKCIJ DESTILATA FERMENTIRANE
SADNE KAŠE KULTIVARJA HRUŠKE VILJAMOVKE
(*PYRUS COMMUNIS L.*)**

**DESTILATE`S FRACTIONS ANALYSIS OF
FERMENTATED FRUIT PURÉE OF WILLIAMS PEAR
CULTIVAR (*PYRUS COMMUNIS L.*)**

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložno sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Zahvala

*Hvala mami, ati, za smer in vrednote,
hvala sestra, ker ti ni vseeno
in hvala tebi Kaja, da sva skupaj sestavila teh sedem črk!*

Hvaležen sem tudi mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm in izr. Prof. dr. Heleni Prosen, ki ste mi z nasveti veliko pomagali – hvala!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložno samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm
Član diplomske komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm

Luka Plešec

Ljubljana, Junij 2012

Vsebina

Povzetek	V
Abstract.....	VI
Seznam okrajšav	VII
1. Uvod	1
1.1. Viljamovka	1
1.1.1. Sistematska uvrstitev viljamovke	1
1.1.2. Zgodovina viljamovke.....	1
1.1.3. Opis Viljamovke.....	2
1.2. Aroma	3
1.2.1. Olfaktroni organ	3
1.2.2. Vonj	4
1.2.3. Analiza arome.....	4
1.2.5. Destilat viljamovke in njegova aroma	9
1.2.6. Destilacija	12
2. Namen dela	13
3. Materiali in metode.....	14
3.1. Materiali	14
3.1.1. Vzorci	14
3.1.2. Standardi.....	17
3.1.3. Topila za redčenje.....	19
3.1.4. Kvasovke	19
3.1.5. Aparature in laboratorijska oprema	19
3.2. Metode	20

3.2.1. Mikroekstrakcija na trdni fazi in plinska kromatografija z masnim spektrometrom.....	20
3.2.2. Plinska kromatografija z masno spektrometrijo	20
3.2.3. Priprava standardov	21
4. Rezultati in razprava.....	30
4.1. Mikroekstrakcija na trdni fazi in GC-MS.....	30
4.1.1. Izbira SPME vlakna in faze za ekstrakcijo.....	30
4.1.2. Analiza etanola in metanola	34
4.2. GC-MS z direktnim injiciranjem.....	38
4.2.1. Optimizacija GC-MS metode	38
4.3. Analiza frakcij destilata	41
4.3.1. Kvalitativna analiza	42
4.3.2. Kvantitativna analiza	44
4.4. Ovrednotenje prispevka spojin k aromi in rekonstrukcija arome.....	66
5. Sklep	68
6. Literatura	69

Povzetek

Kultivar hruške viljamovka (*Pyrus communis* L.) je v svetu najbolj razširjena hruška. Znana je predvsem po svoji značilni bogati aromi, katere sestava nam zaradi maloštevilnih raziskav ni bila natančno znana.

V raziskovalnem delu smo analizirali frakcije, zbrane pri destilaciji fermentirane sadne kaše kultivarja hruške viljamovke. Preizkusili smo dve metodi za kvalitativno in kvantitativno analizo lahko hlapnih spojin ter metanola in etanola.

Prva metoda je bila mikroekstrakcija na trdni fazi z desorbicijo v GC-MS (SPME-GC-MS), ki se je, kljub široki uporabi za analizo hlapnih spojin, izkazala za neuporabno pri kvantitativni analizi metanola in etanola. Delo smo zato nadaljevali z metodo GC-MS s kolono, ki nam je omogočala neposredno injiciranje vzorca.

V 45 vzorcih zbranih med prvo in drugo destilacijo smo identificirali 65 spojin in jih večino kvantificirali. Poleg etanola in metanola smo najvišjo koncentracijo ugotovili za etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoat, ki je bil že v predhodnih raziskavah potrjen za najpomembnejšo aromatično spojino hruške.

Pri ugotavljanju profila destilacije spojin smo ugotovili, da se vsebnost etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoata pri drugi destilaciji spremeni, kar je pomembno spoznanje za ohranjanje čim višje koncentracije v končnem destilatu.

Na podlagi koncentracij smo spojinam izračunali aktivnost vonja in ugotovili, da velika večina prisotnih spojin pomembno prispeva k aromi. Uspešnost analize smo potrdili tudi z rekonstrukcijo arome.

KLJUČNE BESEDE

Viljamovka, mikroekstrakcija na trdni fazi, plinska kromatografija, aroma, hlapne snovi, aktivnost arome

Abstract

Williams` pear (*Pyrus communis L.*) is the most spread pear in the world. It is well known for its characteristic aroma on which not many recent studies have been done.

In our work we analysed fractions collected at the distillation and re-distillation of fermented fruit purée of Williams` pear. We tested two different qualitative and quantitative analysis techniques for volatile compounds.

SPME-GC-MS resulted as inappropriate for quantification of ethanol and methanol, so we decided to perform our analysis on GC-MS system with capillary column, which allowed us to directly inject the samples.

In 45 collected samples we identified 65 volatiles of which majority was quantified. Besides ethanol and methanol we confirmed that ethyl-*trans*-2, *cis*-4-decadienoate is present in the highest concentration among the compounds tested.

We have also showed that during the second distillation ethyl-*trans*-2, *cis*-4-decadienoate distills in different manner which is important in order to achieve highest concentrations of compound in final distillate.

On the basis of calculated odor activity values (AUV) we determined that most of the compounds present are important for the pear aroma. We have successfully concluded our work with a Williams` pear (*Pyrus communis L.*) aroma reconstruction .

KEY WORDS

Williams` pear, Bartlett pear, volatiles, aroma, gas chromatography, odour activity, solid phase microextraction

Seznam okrajšav

ATV – (angl.: *aroma threshold value*) prag zaznave vonja

AUC – (angl.: *area under the curve*) površina pod krivuljo

c – koncentracija

d – (angl.: *density*) gostota

GC-MS – (angl.: *Gas chromatography–mass spectrometry*) plinska kromatografija z masno spektrometrijo

L – Liter

min – minuta

mL – mililiter

N/A – (angl.: not available) ni dostopen

OAV – (angl.: *odour activity value*) aktivnost vonja

ppb – (angl.: parts per billion) delcev na milijardo

ppm – (angl.: *parts per milion*) delcev na milijon

SPME – (angl.: *Solid phase micro extraction*) mikroekstrakcija na trdni fazi

t – Čas

T – Temperatura

t_r – retencijski čas

V – Volumen

ZDA – Združene države Amerike

μL – mikroliter

1. Uvod

1.1. Viljamovka

1.1.1. Sistematska uvrstitev viljamovke

Pyrus communis L. ali navadna hruška je najbolj razširjena in za sadjarstvo najpomembnejša hruška [1]. Po količini letne pridelave, za jabolki zavzema drugo mesto [2]. Njeno izvorno področje je Srednja Evropa, Kavkaz in Turkestan, podatki o gojenju in obrezovanju teh dreves pa segajo že v predantične in antične čase [1, 3, 41]. Sistematsko je *Pyrus communis* L. dvokaličnica (Magnoliopsida) iz redu šipkovcev (Rosales) in jo uvrščamo v družino rožnic (Rosaceae). Ima več podvrst in kultivarjev, med katerimi je tudi viljamovka.

Tabela I: Znanstvena klasifikacija viljamovke

Kraljestvo	Plantae (rastline)
Deblo	Magnoliophyta (kritosemenke)
Razred	Magnoliopsida (dvokaličnice)
Red	Rosales (šipkovci)
Družina	Rosaceae (rožnice)
Poddružina	Maloideae
Rod	Pyrus
Vrsta	communis

1.1.2. Zgodovina viljamovke

Viljamovka je spontani sejanec, ki izvira iz Anglije, kjer jo je v Aldermastonu, leta 1796 odkril vrtnar Williams [1, 2]. Poimenoval jo je Williams` Bon Chretien pozneje pa se je uveljavilo ime Williams` pear, kar v prevodu pomeni Viljamova hruška oz. pogosteje uporabljeno viljamovka. V ZDA in v Kanadi se za Viljamovko uporablja ime Bartlett pear. Tam jo je po sebi poimenoval vrtnar Enoch Bartlett, ki je viljamovko odkril in razširil v Severni Ameriki. Bartlett takrat ni vedel, da so drevesa viljamovke v ZDA prispela iz Anglije, ko pa so leta 1828 iz Evrope tja prispela nova drevesa in so ugotovili, da drevo viljamovke izvira iz Evrope, pa je bilo ime že tako ukoreninjeno, da danes uporabljam obe imeni [4, 5].



Slika 1: Plod viljamovke [2].

1.1.3. Opis Viljamovke

Viljamovka uspeva v zmerno toplem podnebju [3], drevo pa zraste od 3 do 6 m v višino [2]. Za svojo rast glede talnih razmer ni zahtevna in dobro prenaša sušna obdobja [3]. Cveti v aprilu ali začetku maja, cvetovi pa so v združeni v socvetju in so bele barve. Za opraševanje so odgovorne žuželke, posebej pa so pomembne čebele. Drevo zgodaj preide v rodno fazo in nato daje velike in redne pridelke [4], ki jih navadno obirajo od sredine avgusta do začetka septembra.

Plod je srednje velikosti (od 160 do 260 g), najdebelejši v spodnji tretjini, nato pa se proti peclju postopoma zožuje [1, 2, 4]. Kožica ima neravno površino in je sprva zelene barve nato pa se z zorenjem spreminja do rumene, na sončni strani pa se lahko obarva tudi rdečkasto [4, 5]. Meso viljamovke je bele barve in zelo sočno. V polni zrelosti je zelo sladko in ima značilno aromatično muškatno aroma [4]. Zaradi izrazite arome viljamovko priznavajo za najkakovostnejšo sorto hruške [1].



Slika 2: Drevo viljamovke.



Slika 3: Cvet viljamovke.



Slika 4: Plod viljamovke v maju.

Viljamovka je leta 2004 zavzemala 45 % delež gojenih hrušk v ZDA [6]. Za razliko od ostalih hrušk, ki jih večinoma prodajajo kot sveže sadje, viljamovke v večini predelajo v različne produkte. V ZDA dve tretjini pridelanih hrušk viljamovk predelajo za prodajo v konzervah in v sokove [2]. Pomemben in verjetno najbolj znan produkt pa je žganje viljamovka (angl.: *Williams brandy*, fr.: *Poire Williams*), ki zaradi svoje specifične arome sodi med najplemenitejša žganja [7].

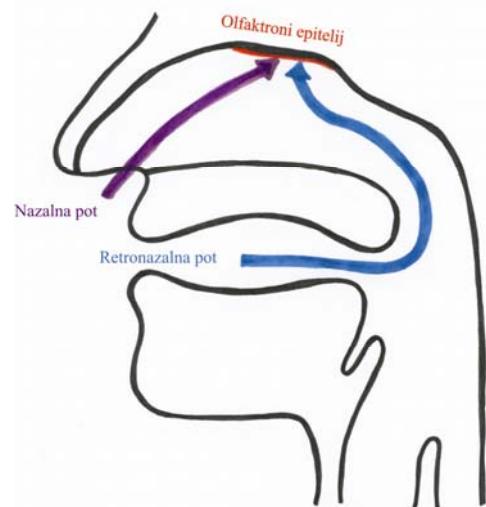
1.2. Aroma

Vonj je po definiciji British Standards Instituta občutenje, ki ga zaznamo preko olfaktornega organa v nosni votlini. Zaznavamo ga z vohom – olfaktornim organom, ki je pri človeku, poleg okusa, edini kemični čut [8]. Aroma je vonj, ki pa za razliko od običajnega ne izvira le iz okolice, vendar dobršen del izvira iz ustne votline. Ko hrano nesemo v usta, prvič zaznamo njen vonj. V ustih jo meljemo in ob tem se lahko hlapne snovi v hrani intenzivneje sproščajo. Po retronazalni poti se nato združijo z vonjem, ki smo ga zaznali preko nosu in to občutenje imenujemo aroma. [9]

1.2.1. Olfaktroni organ

Olfaktorni organ je v nosnih prekatih in obsega za poštno znamko veliki območji rumenega epitelija, ki vsebuje približno 100 milijonov olfaktornih receptorjev. Olfaktorni receptorji so za razliko od receptorjev za okus, ki so prilagojene epitelijske celice, živci, ki so neposredno povezani z limbičnim sistemom. So zelo občutljivi receptorji, ki lahko zaznajo določene spojine v zraku, že če so prisotne le v delcih na milijardo (ppb) in naj bi bili od milijonkrat do milijardokrat občutljivejši od receptorjev za okus. V literaturi so podatki, da naj bi za vzdražitev olfaktornega živca zadostovalo le 8 molekul določene spojine, za identifikacijo vonjave pa 40 molekul. Občutljivost in specifičnost voha omogočata, da človek lahko zazna nepredstavljivo veliko različnih vonjev [8].

Vonj najpogosteje zaznavamo, ko ob dihanju preko nazalne poti zrak v nosno votlino prinese molekule, ki določajo vonj. Poleg nazalne pa obstaja še retronazalna pot, ki pa je bistvena pri aromi hrane, saj ob žvečenju hrane v ustih lahko hlapne spojine po retronazalni poti potujejo do olfaktornega organa in sooblikujejo aroma. Na ta način sta vonj in okus tesno povezana in se ju pri okušanju ne da ločiti. Kljub temu vonj in okus neposredno ne vplivata drug na drugega. Skupaj pa sta odločilna faktorja ali bo določeno živilo sprejemljivo ali ne [8].



Slika 5: Olfaktorne poti [10].

1.2.2. Vonj

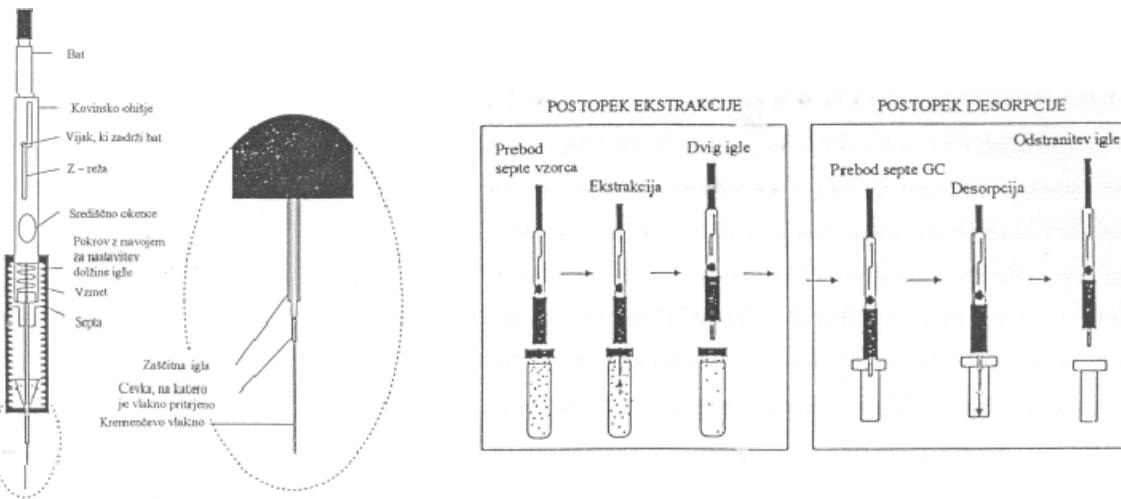
Vonj oziroma aroma določajo spojine, ki so vsaj v nizki meri hlapne. Nabor kemijskih skupin spojin je zelo raznolikih in lahko vključuje alifatske, aliciklične, aromatske in heterociklične spojine. Lahko so zelo hlapne, kot so plini, nekatere, redke, pa so tudi skorajda nehlapne in imajo molekulska maso tudi do 300 g/mol. Aroma je rezultat zmesi aromatičnih spojin, ki so večinoma relativno hidrofobne in so, kot navaja Zavrtanik [11] nosilke organoleptičnih lastnosti. V dosedanjih analizah arome hrane so identificirali približno 10000 takšnih hlapnih spojin. Veliko izmed teh spojin je precej univerzalnih in se pogosto pojavljajo, nekatere pa so bolj značilne. Kot že omenjeno, je aroma vedno rezultat zmesi aromatičnih spojin, število sodelujočih spojin pa je lahko zelo visoko. Na primeru kave so identificirali približno 1000 spojin, ki sodelujejo pri aromi. Že število spojin, ki oblikujejo aroma, nam da predstavo o kompleksnosti, poleg tega pa je doprinos posamezne spojine odvisen od karakteristike vonja spojine, koncentracije spojine v hrani, praga zaznave, parnega tlaka, adsorbcije v matriks živila ter interakcije in sinergizma z ostalimi spojinami. Našteto še dodatno poveča kompleksnost arome. Prag zaznave, ki je določen z minimalno koncentracijo spojine, ki jo zaznamo z vohom, je eden izmed pomembnejših dejavnikov. Različni pragovi zaznave otežujejo ugotavljanje sestave arome, saj je lahko spojina z majhno koncentracijo in nizkim pragom zaznave poglavitna za posamezno aroma, medtem, ko spojina z visokim pragom zaznave, ki je prisotna v veliki koncentraciji sploh ni bistvena za aroma. Kljub temu je Heinz s sodelavci [12] pri preučevanju jakosti arome z merjenjem UV absorpcije vodnih vzorcev ugotovil, da je jakost vonja v korelaciji z koncentracijo določene spojine. Zaradi opisane kompleksnosti arom je tudi analiza arom zelo zapletena [8].

1.2.3. Analiza arome

Osnovni cilj, ki mu pri analizi arom sledimo, je, da med analizo v največji možni meri ohranimo prvotno sestavo arome in razmerje med spojinami.

V prvem koraku je za identifikacijo spojin, ki so odgovorne za aroma, potrebna izolacija spojin iz hrane. Obstaja več tehnik izolacije, med katerima je teoretično najboljša zajem vzorca arome v "headspace" prostoru (zračnem prostoru nad vzorcem), vendar pa so tu koncentracije spojin prenizke in ne omogočajo nadaljnje analize. Z adsorpcijsko metodo ekstrahiramo in koncentriramo vzorec, navadno s pomočjo SPME metode. Metodo izvajamo s pomočjo mikroekstrakcijske igle (slika 6), ki je povezana z batom s katerim

lahko iglo dvigamo in spuščamo. Znotraj zaščitne igle je cevka, na katero je pritrjena igla iz kremenčevih vlaken. Na ta vlakna je v tankem sloju nanesena stacionarna faza, kamor se molekule adsorbirajo [14]. Po končani adsorpciji iglo vstavimo v injektor plinskega kromatografa, kjer poteče desorpcija adsorbiranih spojin. Vlakno lahko uporabljamo v plinasti ali tekoči fazi. Metoda je v analizi hlapnih snovi pogosto uporabljena, saj ima afiniteto za širok nabor spojin, je relativno poceni in je enostavna za uporabo [8, 14].



Slika 6: mikroekstrakcijska igla in postopek ekstrakcije [14].

Destilacija je uporabna predvsem pri analizi arome hrane in pijače z visoko vsebnostjo vode. Slabost te metode je, da je po navadi potrebna dodatna ekstrakcija ter da se lahko med destilacijo tvorijo artefakti, ki sicer niso prisotni v aromi. Ekstrakcija se večinoma uporablja v okviru uporabe SPME vlakna, sicer pa je manj uporabna [8].

Po izolaciji sledi ločitev komponent, ki je ključnega pomena. Ker so spojine navadno prisotne v minimalnih koncentracijah, je uspeh analize odvisen od učinkovitosti ločitve in občutljivosti detekcije. Sledijo identifikacija, kvantifikacija in senzorična analiza. Za senzorično analizo hlapnih spojin uporabljamo GC-olfaktometrijo. To je sistem, ki ga sestavlja plinski kromatograf, povezan s posebnim vonjalnim vmesnikom. Pri analizi naredimo plinsko kromatografijo, nato pa gre del vzorca na detektor, preostali del pa na vonjalni vmesnik – masko (slika 7). Preko vonjalnega vmesnika med analizo vonjamо ločene spojine in sočasno organoleptično opisujemo posamezne vrhove na kromatogramu. Na ta način lahko najbolj točno opredelimo, katere spojine so pomembne za analizirano aroma [8].



Slika 7: Vonjalini vmesnik za GC-olfaktometrijo.

Podobna metoda, ki posnema princip GC-olfaktometrije, je tako imenovan elektronski nos (angl.: *Electronic nose*). Elektronski nos je naprava, ki z nizom kemičnih receptorjev in sistemom za prepoznavanje vzorcev, poskuša posnemati zmožnosti človeškega voha. Ker je voh subjektivna zaznava, se ta uporablja le za kontrolne analize v industriji. Za oceno prijetnosti vonja ali karakterizacije značilnih spojin pa kljub širokemu naboru detektorjev najbolj uporaben ostaja človeški nos [15].

Vlogo spojine pri aromi lahko tudi ocenimo. Oceno naredimo na podlagi praga zaznave (ATV – angl.: *Aroma threshold value*) vonja in koncentracije spojine v aromi. Prag zaznave za posamezno spojino, ugotovi skupina za to posebej izurjenih ocenjevalcev, ki opisno ocenijo aroma spojine. Ker je ta ocena subjektivna in je odvisna od trenutnega razpoloženja, motivacije, izurjenosti, prirojene fiziološke občutljivosti ..., prag zaznave ni točna ocena. Ocene variirajo glede na skupino preizkuševalcev, ki jih je opravila. Če poznamo tudi koncentracijo spojine, lahko izračunamo še aktivnost vonja (OAV – angl.: *odour activity value*). Aktivnost vonja izrazimo z razmerjem koncentracije in pragom zaznave (enačba 1). Spojine z aktivnostjo vonja, večjo od 10, naj bi pomembno prispevale k aromi [8, 16].

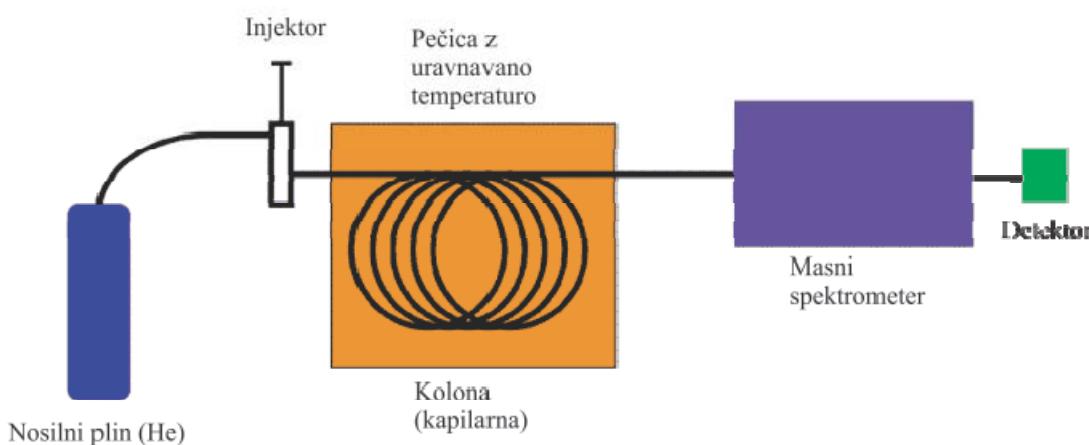
$$OAV_{\text{spojine}} = c_{\text{spojine}} / ATP_{\text{spojine}} \quad (\text{enačba 1})$$

1.2.3.1. Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

Večina spojin, ki sestavlja arome, je hlapnih in v kompleksnih zmeseh, zaradi česar je za analizo najbolj primerna in uporabljena metoda plinska kromatografija (GC). Po injiciranju vzorca plinski kromatograf ta potuje z mobilno fazo (inerten plin: helij, dušik ...) po koloni. Odvisno od vrste kolone se nato spojine adsorbirajo (GSC- gas solid chromatography) oziroma porazdeljujejo (GLC-gas liquid chromatography) v stacionarni fazi, ki je naparjena na stene kolone. Zaradi različne afinitete do porazdelitve oziroma

adsorpcije na stacionarno fazo, spojne po koloni potujejo z različno hitrostjo posledično pa kolono zapustijo ob različnih časih (t_r). Za kolono je detektor (najpogosteje plamensko ionizacijski detektor – FID), ki spojine zazna in posname kromatogram. Signal detektorja je odvisen od koncentracije spojine, kar izkoristimo za kvantitativno analizo. Kromatogram razen retencijskih časov ne vsebuje nikakršnih informacij o strukturi ali identiteti spojine [35, 38].

Za identifikacijo neznanih spojin je potrebna združitev z masnim spektrometrom. Masni spektrometer s tokom elektronov, ki jih emitira segreta volframova nitka, spojino fragmentira na molekulske in fragmentne ione. Najpogosteje uporabljeni energiji za ionizacijo je 70 eV, saj je pri manjših energijah ionizacija neučinkovita, pri večjih pa je fragmentacija prevelika, kar vpliva na kvaliteto spektra. V naslednji stopnji masni analizator (najpogosteje kvadrupolni) glede na razmerje med maso in nabojem porazdeli nastale ione, ki jih zaznamo z elektronsko pomnoževalko, kar nam da masni spekter. Dobljene masne spektre programska oprema nato primerja s spekti, ki jih ima shranjene v knjižnici in na podlagi ujemanja spektrov identificira spojine [39].



Slika 8: Shema GC-MS [20]

1.2.4. Aroma Viljamovke

Kot pri vsem sadju je tudi pri hruški, aromatična sestava zelo odvisna od sorte, klime, stopnje zrelosti, lege in skladiščenja. Pri viljamovki so ugotovili, da najintenzivnejšo aromo dosežemo, če sadeže poberemo v času biološke zrelosti, ki nastopi 10 do 15 dni pred tehnološko zrelostjo [21] in jih za 60 dni shranimo na temperaturi med -1 °C in 0 °C, nato pa jih zorimo na temperaturi 20 °C [13]. Pri tem postopku zorenja je velikega pomena hranjenje pri normalnem parcialnem tlaku kisika v zraku. Danes sadje zaradi podaljševanja obstojnosti večinoma hranijo v hladilnicah, kjer je parcialni tlak kisika znižan, kar pomembno vpliva na znižanje vsebnosti etildekadienoatov, kot glavnih aromatičnih spojin viljamovke [22].

Prve raziskave na področju arome viljamovke so naredili v 60 letih, ko je Jennings prvi ločil esenco pridobljeno iz sveže zrele hruške viljamovke in dobil 32 frakcij, od katerih jih je na senzoričnem testu 5 spominjalo na vonj hruške in 4, ki so imele neprijeten vonj ter so bile označene za hruško atipične in nezaželene vonje [23]. V nadalnjih delih (Jennings [23] in Jennings in Creveling [24]) so v aromi ugotovili prisotnost ocetne, propanojske, butanojske (maslene), heksanojske (kapronske), oktanojske (kaprilske), nonanojske (pelargonijске) in 2,4-dekadienojske kisline, ter etil-, *n*-propil-, *n*-buti-l, *n*-amil- in *n*-heksilalkohole (9). Kasneje je Jennings s sodelavci [13] komponente arume organoleptično razdelil na dva razreda. Prvi razred opisuje spojine, ki karakteristično vplivajo na aromo, drugi pa spojine, ki sodelujejo pri aromi. Slednje same po sebi nimajo karaterističnega vonja po določeni vrsti sadja, vendar pa pripomorejo k sadnosti in bogatosti arume. Glede na to razdelitev so kot karakterizajoče spojine ugotovili estre 2,4-dekadienojske kisline, kot sodeljujočo spojino pri aromi pa heksilacetat [13]. S takšno karakterizacijo in razvrstitevijo so se kasneje strinjali tudi Suwnagul in Richardson [25] in Vidrih s sodelavci [18]. Glede na 4 možne izomere etildekadienoata, so kot prevladujoč izomer ugotovili etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoat [40]. Hkrati so ugotovili, da imajo etilni, *n*-butilni in *n*-propilni estri vonj, ki zelo spominja na hruško, nasprotno pa *n*-amilni in *n*-heksilni niso zaželjeni, vendar pa so dopustili možnost, da vseeno v zmesi pripomorej k aromi. Vidrih s sodelavci [18] kot neželjene spojine opisuje tudi aldehyde, saj naj bi bili, navkljub majhni koncentraciji, ob senzorični zaznavi agresivni, ostri in neprijetni. Kahle s sodelavci, ki je v hruški ugotovil več kot 150 hlapnih spojin je poleg estrov dekadienojske kisline kot karakteristično spojino ugotovil tudi oktan-1,3-diol [17].

Tabela II: spojine identificirane v aromi viljamovke.

Alkoholi	etil; propil; butil; amil; heksil; heptil; oktil
Acetati	metil; etil; propil; butil; amil; heksil; heptil; oktil; <i>cis</i> -2-heksil
4-oksi-butaenoati	metil; etil
Oktanoati	metil; etil
Dekanoati	metil; etil
dodekanoati	etil
tetradekanoati	etil
Heksadekanoati	metil
oktadekanoati	metil
oktenoati	metil in etil <i>trans</i> -2; metil in etil-3-hidroksi
decenoati	metil in etil <i>cis</i> -4, etil <i>trans</i> -2
dodecenoati	etil <i>cis</i> -6; etil <i>trans</i> -2
tetradecenoati	metil in etil <i>cis</i> -8; metil in etil <i>cis</i> -5
heksadecenoati	metil, etil
oktadecenoati	metil
dekadienoati	metil <i>cis</i> -2, <i>trans</i> -4; metil in etil <i>trans</i> -2, <i>trans</i> -4; metil, etil, propil, butil in heksil <i>trans</i> -2, <i>cis</i> -4
dodekadienoati	metil in etil <i>trans</i> -2, <i>cis</i> -6
tetradekadienoati	metil in etil <i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8
heksadekadienoati	etil
dekatrienoati	etil <i>trans</i> -2, <i>trans</i> -4, <i>cis</i> -7; etil <i>trans</i> -2, <i>cis</i> -4, <i>cis</i> -9
dodekatrienoati	eti <i>trans</i> -2, <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9
tetradekatrienoati	metil in etil <i>trans</i> -2, <i>trans</i> -4, <i>cis</i> -8
α - farnezen	

1.2.5. Destilat viljamovke in njegova aroma

Žganje viljamovka je verjetno najbolj prepoznaven in cenjen produkt iz hrušč viljamovk [7]. Kvaliteta žganja je odvisna od njegove aromatične sestave [19], zaradi česar je zelo pomembna aromatična sestava hrušč, iz katerih se prideluje žganje. Zrele hruške, ki morajo vsebovati maksimalno količino aromatičnih spojin pri pridobivanju žganja zmeljemo v hruškovo kašo. Kaši nato dodamo selektivne kvasovke, ki začnejo alkoholno

vrenje. Nekateri avtorji navajajo, da so hruške in slive, ki so namenjene za predelavo v žganje, za razliko od ostalega sadja lahko tudi prezrele, saj naj bi tako imele še intenzivnejšo aroma [26]. Nasprotno nedozorele hruške niso primerne za alkoholno vrenje, saj vrenje pri teh hruškah ne poteče v celoti, kar pa daje končnemu izdelku neprijeten zeliščni in travnat okus [21]. Po poteku alkoholnega vretja hruškovo kaša destiliramo, pri čemer je za doseganje najboljše sestave arome najprimernejša uporaba bakrenega kotla [19]. Destilacijo ustavimo, ko vsebnosti etanola v destilatu padejo pod 15-20 vol. % in dobljen destilat ponovno destiliramo. Pri alkoholnem vrenju nastajajo tudi zdravju škodljive snovi in spojine z neprijetno aromo, zato pri drugi destilaciji zbiramo in ločimo 3 frakcije, tako da neželene snovi v največji meri izločimo. Prva frakcija destilata predstavlja 0,5- 1,5% količine destilata, ki ga destiliramo. V njej so zbrane spojine z najnižjim vreličcem, med drugim tudi zdravju škodljiv metanol. Naslednja frakcija vsebuje največ etanola in predstavlja željen del destilacije. Tretja frakcija se začne, ko vsebnost etanola v destilatu pade pod 55 vol. %. Vsebuje veliko senzorično neprijetnih komponent, ki kvarijo aroma destilata [19]. Prvo in tretjo frakcijo se zavrzemo. Končen produkt dobimo z redčenjem druge frakcije z vodo, tako da vsebuje od 40 do 45 vol. % etanola [21]. Iz fermentirane sadne kaše 100 kg zrelih hrušk lahko z destilacijo pridobimo od 8-12 L žganja s 50 vol % etanola [26].

Na aroma žganja poleg že omenjene kvalitete sadja, izbire kotla in postopka destilacije vpliva še nekaj drugih dejavnikov v procesu predelave. Nikćević [21] je preučeval različne priprave sadne drozge in metode destilacije na aroma žganja viljamovke. Za pridelavo najkakovostnejšega žganja predlaga dodatek pektinoliznega encima in ustreznih selektivnih kvasovk ter pred začetkom alkoholnega vrenja znižanje pH vrednosti drozge na vrednost 3. Dodatek selektivnih kvasovk in znižanje pH vrednosti prepreči razvoj avtohtonih kvasovk, ki so prisotne na sadju in proizvedejo veliko več neželenih produktov, kot so metanol in kisline. V idealnem primeru bi kvasovke ves sladkor spremenile v etanol, vendar pa kvasovke v praksi, predvsem avtohtone, proizvedejo še mnogo stranskih produktov [26], pri čemer jih selektivne proizvedejo manj. Povečana vsebnost kislin je lahko tudi posledica slabo zaprte posode tekom vrenja. Kisik, ki je prisoten ob vrenju omogoča nadaljnjo oksidacijo etanola do ocetne kisline. Ocetna kislina je sicer pomembna sestavina arome, vendar pa v večjih koncentracijah daje žganju kisel okus in neprijetno aroma [27, 28]. Za ohranitev aromatičnih spojin je pomembna tudi hitrost alkoholnega vrenja, ki mora potekati počasi, na kar vpliva tudi temperatura [21, 26].

Avtorji najpogosteje navajajo, da so najustreznejše temperature za proces alkoholnega vrenja pri hruški od 18-22 °C [21, 26]. Ker hruške in jabolka vsebujejo malo dušikovih spojin, ki so pomembna hrana za kvasovke, v literaturi pogosto najdemo priporočilo o dodatku amonijevi spojin v sadno brozgo pred alkoholnim vretjem [26, 29]. Nikćević [21] je v svojem eksperimentu trem vzorcem dodal $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, zanimivo pa so ta žganja na senzoričnem ocenjevanju doseгла najnižje ocene.

Aroma žganja viljamovke praviloma močno spominja na aromo hruške viljamovke, vendar pa se lahko od nje razlikuje. Vzrok za to je v različni aromatični sestavi, saj pri alkoholnem vrenju in destilaciji lahko pride do določenih kemijskih sprememb. Vesrini s sodelavci [30] v destilatu ugotavlajo povišano vsebnost etil-*trans*-2, *trans*-4-dekadienoata v primerjavi s *trans*-2, *cis*-4 izomerom in prisotnost etil-*trans*-4-decenoata ter etil-*trans*-2, *trans*-4, *cis*-7 dekatrienoata, kar pripisujejo spremembam med alkoholnim vrenjem [30]. Pri destilaciji prihaja predvsem do oksidacije, kjer se iz pentoze tvori furfural, etanol pa se lahko oksidira do acetne kisline. Nastajajo tudi manjše količine acetala, ki nastane z reakcijo aldehida in etanola [27]. V končnem destilatu želimo doseči čim večjo koncentracijo spojin, ki jih je Jennings [13] opisal kot karakteristične in sodeljujoče pri aromi, hkrati pa čim manjšo koncentracijo neželenih in toksičnih spojin, kot so metanol, etilacetat in furfural, ki ima izrazit vonj po grenkih mandljih. Nekatere spojine pa so zaželene samo v majhnih koncentracijah, saj so v večjih lahko toksične ali pa aromo kvari. Primer takšnih spojin so višji alkoholi, acetaldehid in etillaktat. Višji alkoholi v minimalnih koncentracijah prispevajo k značilni aromi, v višjih koncentracijah pa dajejo oster vonj in okus. Acetaldehid daje značilno sadno aromo, v višjih koncentracijah pa prav tako povzroča oster vonj in okus [19].

1.2.6. Destilacija

Destilacija je postopek ločevanja hlapnih komponent v zmesi, na podlagi njihovih različnih temperatur vrelišča. Tekom destilacije spojine prehajajo v parno fazo. Para nato potuje v hladilnik, kjer kondenzira, frakcije destilata pa ločeno zbiramo. Počasneje temperatura v kotlu narašča, večja je časovna razlika med doseganjem posameznih temperatur vrelišč, kar nam omogoča boljšo ločbo posameznih spojin. Pri prehajanju spojin v parno fazo ima ključno vlogo temperatura vrelišča in topnost v vodi oziroma alkoholu. Spojine, ki se dobro raztapljajo v etanolu in slabo v vodi, bodo hitreje prehajale v parno fazo iz raztopine z manj etanola in obratno [27]. Specifične pri destilaciji so spojine, ki tvorijo azeotropne zmesi. Za metanol bi glede na njegovo nizko vrelišče ($65,5^{\circ}\text{C}$) pričakovali, da bo destiliral samo na začetku destilacije, Hernandez-Gomez s sodelavci [31] pa je ugotovil, da metanol pri žganju melone destilira skozi vso destilacijo, kar pripisujejo ravno tvorbi azeotropne zmesi. Enako velja za hruškovo žganje, kar je opisal Glatthar s sodelavci [32].

2. Namen dela

Namen diplomske naloge je kvalitativna in kvantitativna analiza frakcij destilata fermentirane sadne kaše kultivarja hruške viljamovke (*Pyrus Communis L.*).

Za ta namen bomo hruškovo kašo fermentirali in jo nato destilirali. Prvi destilat bomo ponovno destilirali, kot je to v praksi pri pridelavi žganja. Pri destilaciji bomo ločeno zbirali posamezne frakcije in jih vzorčili. Vzorce bomo analizirali s plinskim kromatografom, sklopljenim z masnim spektrometrom.

Preizkusili bomo dve različni metodi analize s plinsko kromatografijo in se na podlagi rezultatov odločili, s katero bomo nadaljevali analizo. Pri prvi metodi bomo uporabili mikroekstrakcijo na trdni fazi (SPME) in nato termično desorbcijo v injektorju. Druga metoda bo neposredno injiciranje vzorca v plinski kromatograf. Razvili in optimizirali bomo metodo za analizo aromatičnih spojin v destilatu.

V analizi frakcij nas bo zanimala kemična sestava posameznih frakcij. Poskušali bomo kvalitativno in kvantitativno ovrednotiti sestavo posameznih frakcij. Spremljali bomo razlike v sestavi in koncentraciji spojin v frakcijah med destilacijo. Poskušali bomo ugotoviti spojine, ki so pomembne za aroma viljamovke.

Po opravljeni analizi bomo poskušali pripraviti rekonstrukcijo arome, ki jo bomo nato organoleptično ovrednotili in primerjali z vzorcem destilata.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

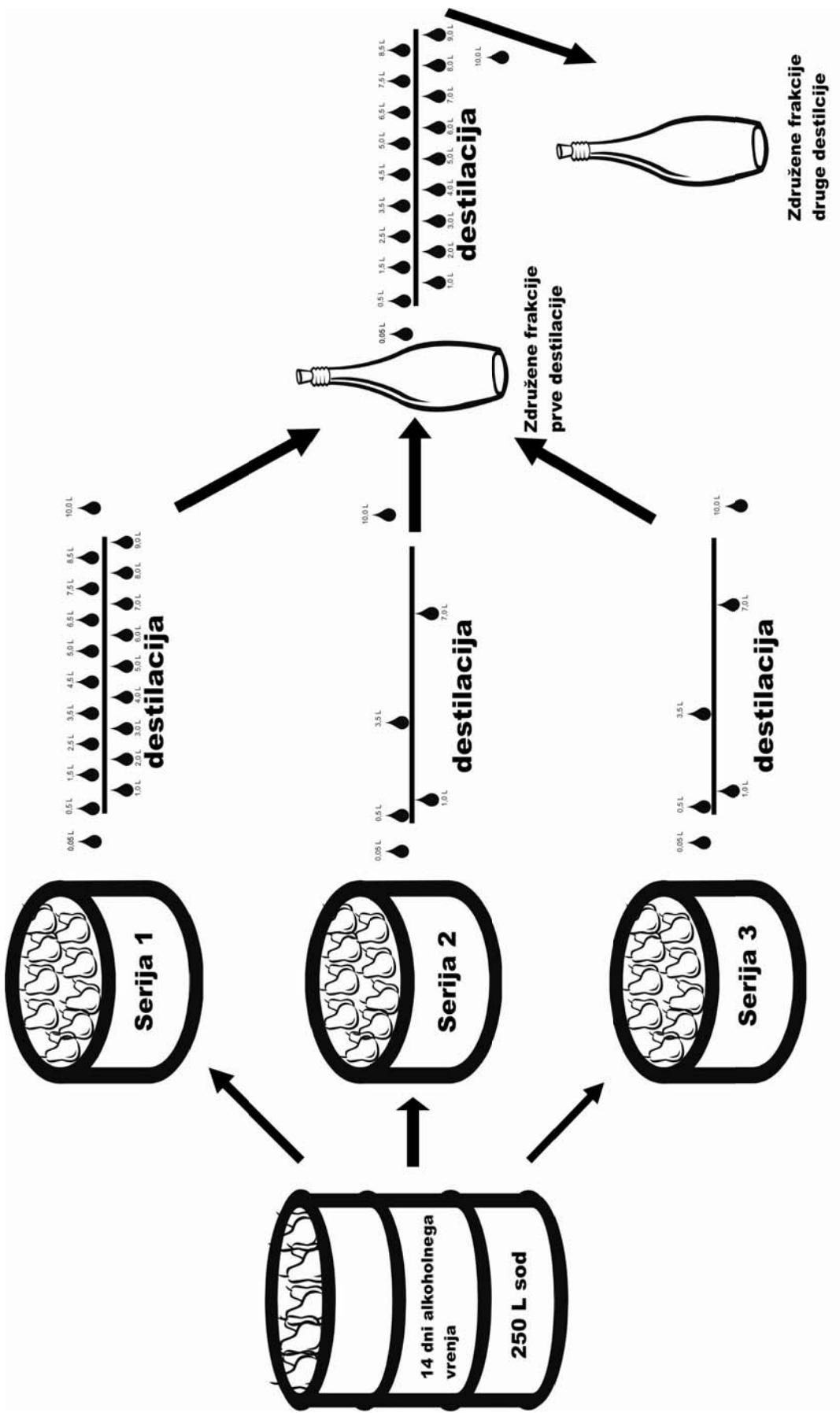
3.1.1. Vzorci

Vzorce smo pridobili z destilacijo sadne kaše kultivarja hruške viljamovke (*Pyrus Communis L.*). Hruške smo s sadnim mlinom zmleli v hruškovo kašo, ki smo jo napolnili v 250 litrski PVC sod. Kaši smo nato po navodilih proizvajalca dodali 40 g/hL selektivnih kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) ter sod zaprli in mu namestili vredno vaho. Sod smo hranili v prostoru s povprečno temperaturo 18 °C, tako da je poteklo alkoholno vrenje. Po 14 dneh, ko se je vrenje ustavilo, smo kašo destilirali s serijsko destilacijo.

Za destilacijo smo uporabili bakren kotel z dvojnim dnom, prostornine 60 L. Kot vir segrevanja smo uporabili plinski gorilnik. Destilacijo smo izvedli v treh serijah, pri čemer smo v eni seriji destilirali 50 L hruškove kaše. Pri destilaciji smo ločeno zbirali frakcije destilata, ki smo jih vzorčili v 5 mL stekleničke, nato pa smo vse frakcije združili. Volumen frakcij, ki smo jih zbirali, je bil odvisen od serije. Pri prvi seriji smo zbrali prvih 50 mL (vzorec 6), ki smo jih vzorčili in nato zavrgli, nadalje pa smo zbirali frakcije po 0,5 L, dokler nismo skupaj zbrali 9 L destilata. Destilacijo smo nato nadaljevali in zbrali še zadnjo frakcijo volumna 1 L (vzorec 25), ki smo jo, enako kot prvo frakcijo, vzorčili in nato zavrgli. Ostali dve seriji sta nam služili za kontrolo ponovljivosti in jih zato nismo vzorčili tako pogosto. Zbrali in vzorčili smo prvih 50 mL (vzorca 1 in 26), ki smo jih zavrgli nato pa frakcije volumna 1L, 2,5 L in 3,5 L. Zbrali smo še nadaljnja 2 L (do 9 L) in ju združili z ostalimi frakcijami. Tako kot pri prvi seriji smo tudi pri ostalih dveh po zbranih 9 litrih destilacijo nadaljevali in zbrali zadnjo frakcijo volumna 1 L, jo vzorčili (vzorca 5 in 30) in nato zavrgli.

Združene frakcije vsake serije smo posebej vzorčili (vzorci 31, 32, 33), nato pa smo vse tri serije združili in jih ponovno destilirali. Ponovno smo zbrali in vzorčili prvih 50 mL (vzorec 34), ki smo ga zavrgli nato pa frakcije volumna 1 L, dokler nismo zbrali 9L destilata. Tudi tu smo nadaljevali destilacijo in zbrali frakcijo 1L (vzorec 44), ki smo jo vzorčili in nato zavrgli.

Vzorce smo do analize hranili v zamrzovalniku pri temperaturi -18 °C.



Slika 9: Shema vzorčenja.

Pridobljene vzorce, volumne frakcij, ki smo jih vzorčili in serijo destilacije predstavlja tabela III.

Tabela III: Vzorci.

# vzorca	V frakcije [L]	Serija
1	0,05	2
2	1,0	2
3	3,5	2
4	7,0	2
5	10,0	2
6	0,05	1
7	0,5	1
8	1,0	1
9	1,5	1
10	2,0	1
11	2,5	1
12	3,0	1
13	3,5	1
14	4,0	1
15	4,5	1
16	5,0	1
17	5,5	1
18	6,0	1
19	6,5	1
20	7,0	1
21	7,5	1
22	8,0	1
23	8,5	1
24	9,0	1

# vzorca	V frakcije [L]	Serija
25	10,0	1
26	0,05	3
27	1,0	3
28	3,5	3
29	7,0	3
30	10,0	3
31	Združene frakcije	1
32	Združene frakcije	2
33	Združene frakcije	3
34	0,05	1+2+3
35	1,0	1+2+3
36	2,0	1+2+3
37	3,0	1+2+3
38	4,0	1+2+3
39	5,0	1+2+3
40	6,0	1+2+3
41	7,0	1+2+3
42	8,0	1+2+3
43	9,0	1+2+3
44	10,0	1+2+3
45	Združene frakcije	1+2+3

3.1.2. Standardi

- metanol Reag. Ph. Eur. (Panreac, Španija)
- etanol (absolutni) (Carlo Erba, Italija)
- metilacetat (Merck, Nemčija)
- 1-heksanol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 1-oktanol (Merck, Nemčija)
- 2-etilfenol (Aldrich, Nemčija)
- 2-feniletanol (Merck, Nemčija)
- 2-fenyletilacetat (Aldrich, Nemčija)
- 2-heptanol (Merck, Nemčija)
- 2-heptanon (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 2-metilbutanojska kislina (Merck, Nemčija)
- 2-metilbutilacetat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 4-etilfenol (Aldrich, Nemčija)
- 4-vinilanisol (4-metoksistiren) (Aldrich, Nemčija)
- butilacetat (Carlo Erba, Italija)
- dekanojska kislina (Merck, Nemčija)
- dietilsukcinat (Merck, Nemčija)
- etilacetat (Carlo Erba, Italija)
- etilbenzoat (Merck, Nemčija)
- etilbutirat (Merck, Nemčija)
- etildekadienoat (SAFC, Nemčija)
- etildekanoat (Merck, Nemčija)
- etildodekanotat (Merck, Nemčija)
- etilheksanoat (Merck, Nemčija)
- etilhidrocinamat (Aldrich, Nemčija)
- etillaktat (Merck, Nemčija)
- etilocitanoat (SAFC, Nemčija)
- etilsorbat (Aldrich, Nemčija)
- etil-2-decenoat (SAFC, Nemčija)
- etil-2-metilbutanoat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- etil-2-oktenoat (SAFC, Nemčija)

- fenilacetaldehid (Aldrich, Nemčija)
- furfural (Aldrich, Nemčija)
- heksanal (Fluka, Nemčija)
- heksanojska kislina (Merck, Nemčija)
- heksilacetat (Merck, Nemčija)
- izoamilacetat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- izoamil-2-metilbutanoat (SAFC, Nemčija)
- izoamilalkohol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- izobutanol (Merck, Nemčija)
- karveol (SAFC, Nemčija)
- kreozol (2-metoksi-4-metilfenol) (Merck, Nemčija)
- linaloloksid (Aldrich, Nemčija)
- metildodekanoat (SAFC, Nemčija)
- metilheksanoat (Merck, Nemčija)
- metilnonanoat (Merck, Nemčija)
- metiloktanoat (Merck, Nemčija)
- metildekanoat (SAFC, Nemčija)
- ocetna kislina (Merck, Nemčija)
- oktanojska kislina (Merck, Nemčija)
- stiren (Fluka, Nemčija)
- etiltetradekanoat (Merck, Nemčija)

3.1.3. Topila za redčenje

- deionizirana voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani)
- metanol, Reag. Ph. Eur. (Panreac, Španija)
- etanol (absolutni) (Carlo Erba, Italija)

3.1.4. Kvasovke

- SIHA-Aktiv 3 (E. Begerow GmbH & Co., Nemčija)

3.1.5. Aparature in laboratorijska oprema

- avtomatske pipete Proline 10 µL, 100 µL, 1000 µL (Biohit, Finska)
- mikroekstrakcijsko vlakno PDMS, debelina faze 100 µm (Supelco, ZDA)
- mikroekstrakcijsko vlakno DVB/CAR/PDMS, debelina faze 50/30 µm (Supelco, ZDA)
- plinski kromatograf HP 5890 Series II (Hewlett Packard, ZDA)
- kapilarna kolona VOCOL, 60 m x 0,25 mm I.D., z debelina stacionarne faze 1,5 µm (Supelco, MO, ZDA)
- GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Japonska),
- kapilarna kolona Rtx-1 F&F, 30m x 0.25 mm, 0,25 µm dimetilpolisilosan, (Restek, PA, ZDA).

3.2. Metode

3.2.1. Mikroekstrakcija na trdni fazi in plinska kromatografija z masnim spektrometrom

Uporabili smo mikroekstrakcijsko iglo (SPME) s $100 \mu\text{m}$ nanosom polidimetilsilosana. Analizo smo izvajali na plinskem kromatografu HP 5890 Series II, Hewlett Packard (ZDA), s SiO_2 kapilarno kolono VOCOL, $60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm I.D.}$, z debelino stacionarne faze $1,5 \mu\text{m}$. Temperatura injektorja je bila 220°C , temperatura peči je bila prve 4 minute 70°C nato pa se je s hitrostjo 15°C/min dvignila na temperaturo 210°C , nato smo jo zadržali še za 4 minute. Za nosilni plin smo uporabili helij, s pretokom $0,6 \text{ mL/min}$.

S plinskim kromatografom je bil sklopljen masni spektrometer HP 6890 Series Hewlett-Packard kvadrupolnim masnim analizatorjem. Ionizacijsko energijo smo nastavili na 70 eV , temperaturo ionskega izvora pa na 200°C . Programska oprema je zajemala knjižnico spektrov Wiley 138.

3.2.2. Plinska kromatografija z masnim spektrometrom

Za analizo vzorcev smo uporabljali plinski kromatograf, povezan z masnim spektrometrom GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu s kapilarno kolono Rtx-1 F&F, $30\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$, $0.25 \mu\text{m}$ dimetilpolisilosan. Programska oprema je zajemala knjižnici spektrov NIST08 in FFNSC 1.3.



Slika 10: GC-MS, ki smo ga uporabili za analizo.

Zaradi velike razlike v koncentracijah analiziranih spojin smo razvili tri različne metode, ki so pokrile celoten spekter analiziranih spojin. S prvo metodo smo analizirali spojine, ki imajo t_r

večji od 5 minut, z drugo metodo spojine s t_r , manjšim od 5 minut, z izjemo etanola, ki smo ga analizirali s tretjo metodo.

3.2.2.1. Analiza spojin s t_r , večjim od 5 min

Uporabili smo »split« način injiciranja z razmerjem 10, T injiciranja 250 °C ter volumnom injiciranja 1 μL . Začetno temperaturo kolone smo prvih 5 minut nastavili na 40 °C, nato se je linearne višala, z gradientom 10 °C/min do končne T 250 °C, nato smo jo zadržali še 5 min. Ionizacijska napetost je bila 70 eV, pri čemer je bila temperatura ionizacije 200 °C. Detektor smo z napetostjo 1 kV vključili pri času 5 min in ga pustili vklopljenega do konca metode.

Zaradi zasičenosti detektorja pri retencijskih časih etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoata pri vseh vzorcih in etildekanoata in etiloktanoata pri vzorcih 1, 35 in 36 smo za te vzorce uporabili osnovno metodo, ki smo ji povečali razmerje »split« injiciranja na 500 in zmanjšali V injiciranja na 0,5 μL . Drugi parametri so ostali nespremenjeni.

3.2.2.2. Analiza spojin s t_r , manjšim od 5 min

Uporabili smo »split« način injiciranja z razmerjem 500, temperaturo injiciranja 250 °C ter volumnom injiciranja 0,5 μL . Prvih 5 min smo temperaturo kolone nastavili na 40 °C, nato se je s hitrostjo 10 °C/min višala do končne 250 °C, nato smo jo zadržali še 5 min. Napetost na detektorju je bila 1 kV, ionizacijska napetost je bila 0,7 eV pri čemer je bila temperatura ionizacije 200 °C. Detektor smo vključili pri $t = 0$ min in ga pustili vklopljenega do konca metode.

3.2.2.3. Analiza etanola

Vzorce smo redčili z deionizirano vodo v razmerju 1:100. Uporabili smo »split« način injiciranja z razmerjem 500, temperaturo injektorja 250 °C ter volumen injiciranja 0,5 μL . Začetno temperaturo kolone smo prvih 5 min nastavili na 40 °C, nato se je linearne višala, s hitrostjo 100 °C/min do končne 250 °C, nato smo jo zadržali še 5 min. Ionizacijska napetost je bila 0,7 eV, pri čemer je bila temperatura ionizacije 200 °C. Detektor smo pri napetosti 0,84 kV vključili pri času 0 min in ga pustili vklopljenega do 12. minute.

3.2.3. Priprava standardov

Zaradi velikega števila spojin, za katere smo morali pripraviti standardne raztopine, smo laboratorijsko delo optimizirali tako, da smo spojine združili v smiselne skupine in nato pripravili standardne raztopine za vsako skupino posebej. Pri združevanju spojin v skupine je bilo nujno, da so vse spojine znotraj skupine pri analizi zahtevale enako metodo ter da so bili vrhovi vseh spojin v kromatogramu dobro ločeni. V nadaljevanju opisujemo splošne postopke, po katerih smo pripravili standardne raztopine za posamezne skupine, pri čemer

operiramo z okvirnimi vrednostmi koncentracij. Točni podatki za koncentracije so za posamezno spojino razvidni v tabelah.

3.2.3.1. Standardi aromatičnih spojin s t_r, večjim od 5 minut

Ker smo pri analizi tega dela spektra, za nekatere vzorce uporabili dve metodi, z različnima »split« razmerjem, smo morali za vsako metodo narediti svoje umeritvene premice. Priprava standardnih raztopin je potekala po enaki shemi redčenja, razlikovala se je le v pripravi osnovnih standardnih raztopin.

»Split« 1000

V 10 mL merilno bučko smo odpipetirali 150 µL posamezne spojine ter z etanolom dopolnili do oznake (raztopina s c₀). 5 mL pripravljene raztopine s c₀ smo odpipetirali v 20 mL merilno bučko in z etanolom dopolnili do oznake. 5 mL dobljene raztopine smo odpipetirali v 10 mL bučko in z etanolom dopolnili do oznake. Dobili smo osnovno standardno raztopino c₁. Nato smo 5 mL osnovne standardne raztopine odpipetirali v novo 10 mL bučko in z etanolom dopolnili do oznake, ter tako dobili standardno raztopino c₂. Standardno raztopino c₂ smo po enakem postopku redčili, da smo dobili standardno raztopino c₃, to pa naprej, da smo dobili standardno raztopino c₄. Koncentracijo posameznih spojin smo preračunali iz volumna, gostote posamezne spojine in volumna bučke (enačba 2).

Enačba za izračun c:

$$C_{\text{spojine}} = (V_{\text{pipetiranja}} \cdot d_{\text{spojine}}) / V_{\text{bučke}} \quad (\text{enačba } 2)$$

$$V_{\text{pipetiranja}} = 0,15 \text{ mL}$$

$$V_{\text{bučke}} = 10 \text{ mL}$$

Tabela IV: Izračunane koncentracije spojin v standardnih raztopinah (»split« 1000).

spojina	d	V [µL]	c ₀ [mg/mL]	c ₁ [mg/mL]	c ₂ [mg/mL]	c ₃ [mg/mL]
1-heksanol	0,8136	150	12,204	1,5255	0,76275	0,381375
1-oktanol	0,824	150	12,36	1,545	0,7725	0,38625
2-etilfenol	1,037	150	15,555	1,944375	0,972188	0,486094
2-feniletanol	1,02	150	15,3	1,9125	0,95625	0,478125
2-feniletacetat	1,03	150	15,45	1,93125	0,965625	0,482813
2-heptanol	0,82	150	12,3	1,5375	0,76875	0,384375
2-heptanon	0,815	150	12,225	1,528125	0,764063	0,382031
2-metilbutilacetat	0,876	150	13,14	1,6425	0,82125	0,410625

2-metilbutanojska kislina	0,94	150	14,1	1,7625	0,88125	0,440625
4-etilfenol	1,011	150	15,165	1,895625	0,947813	0,473906
4-vinilanisol (4-metoksistiren)	0,997	150	14,955	1,869375	0,934688	0,467344
butilacetat	0,88	150	13,2	1,65	0,825	0,4125
dekanojska kislina	0,893	150	13,395	1,674375	0,837188	0,418594
dietilsukcinat	1,04	150	15,6	1,95	0,975	0,4875
etilbenzoat	1,05	150	15,75	1,96875	0,984375	0,492188
etilbutirat	0,878	150	13,17	1,64625	0,823125	0,411563
etildekanoat	0,86	150	12,9	1,6125	0,80625	0,403125
etildodekanotat	0,863	150	12,945	1,618125	0,809063	0,404531
etilheksanoat	0,87	150	13,05	1,63125	0,815625	0,407813
etilhidrocinamat	1,014	150	15,21	1,90125	0,950625	0,475313
etillaktat	1,03	150	15,45	1,93125	0,965625	0,482813
etiloktanoat	0,867	150	13,005	1,625625	0,812813	0,406406
etil sorbat	0,956	150	14,34	1,7925	0,89625	0,448125
etil-2-decenoat	0,88	150	13,2	1,65	0,825	0,4125
etil-2-metilbutanoat	0,875	150	13,125	1,640625	0,820313	0,410156
etil-2-oktenoat	0,892	150	13,38	1,6725	0,83625	0,418125
fenilacetaldehid	1,075	150	16,125	2,015625	1,007813	0,503906
furfural	1,16	150	17,4	2,175	1,0875	0,54375
heksanal	0,816	150	12,24	1,53	0,765	0,3825
heksanojska kislina	0,93	150	13,95	1,74375	0,871875	0,435938
heksilacetat	0,87	150	13,05	1,63125	0,815625	0,407813
izoamil-2-metilbutanoat	0,857	150	12,855	1,606875	0,803438	0,401719
izoamilacetat	0,876	150	13,14	1,6425	0,82125	0,410625
karveol	0,958	150	14,37	1,79625	0,898125	0,449063
kreozol (2-metoksi-4-metilfenol)	1,092	150	16,38	2,0475	1,02375	0,511875
linaloloksid	0,945	150	14,175	1,771875	0,885938	0,442969
metildodekanat	0,87	150	13,05	1,63125	0,815625	0,407813
metilheksanoat	0,885	150	13,275	1,659375	0,829688	0,414844
metilnonanoat	0,88	150	13,2	1,65	0,825	0,4125
metiloktanoat	0,877	150	13,155	1,644375	0,822188	0,411094
metildekanoat	0,871	150	13,065	1,633125	0,816563	0,408281

oktanojska kislina	0,91	150	13,65	1,70625	0,853125	0,426563
stiren	0,906	150	13,59	1,69875	0,849375	0,424688

»Split« 10

Pri pripravi osnovne standardne raztopine za »split« 10 smo si pomagali z raztopino c_0 ki smo jo pripravili pri »split« razmerju 1000. 1 mL raztopine c_0 smo odpipetirali v 100 mL merilno bučko in z etanolom dopolnili do oznake. 5 mL pripravljeni raztopine smo odpipetirali v 10 mL bučko in z etanolom dopolnili do oznake (raztopina s c_1). Nato smo z redčenjem po enaki shemi pripravili še 4 raztopine. Preračunane koncentracije spojin (enačba 2) v raztopinah so prikazane v tabeli V.

Tabela V: Izračunane koncentracije spojin v standardnih raztopinah (»split« 10).

spojina	d	V [µL]	c_1 [mg/mL]	c_2 [mg/mL]	c_3 [mg/mL]	c_4 [mg/mL]	c_5 [mg/mL]
1-heksanol	0,8136	150	0,06102	0,03051	0,015255	0,007628	0,003814
1-oktanol	0,824	150	0,0618	0,0309	0,01545	0,007725	0,003863
2-etilfenol	1,037	150	0,077775	0,038888	0,019444	0,009722	0,004861
2-feniletanol	1,02	150	0,0765	0,03825	0,019125	0,009563	0,004781
2-feniletilacetat	1,03	150	0,07725	0,038625	0,019313	0,009656	0,004828
2-heptanol	0,82	150	0,0615	0,03075	0,015375	0,007688	0,003844
2-heptanon	0,815	150	0,061125	0,030563	0,015281	0,007641	0,00382
2-metilbutilacetat	0,876	150	0,0657	0,03285	0,016425	0,008213	0,004106
2-metilbutanojska kislina	0,94	150	0,0705	0,03525	0,017625	0,008813	0,004406
4-etilfenol	1,011	150	0,075825	0,037913	0,018956	0,009478	0,004739
4-vinilanisol (4-metoksistiren)	0,997	150	0,074775	0,037388	0,018694	0,009347	0,004673
butilacetat	0,88	150	0,066	0,033	0,0165	0,00825	0,004125
dekanojska kislina	0,893	150	0,066975	0,033488	0,016744	0,008372	0,004186
dietilsukcinat	1,04	150	0,078	0,039	0,0195	0,00975	0,004875
etilbenzoat	1,05	150	0,07875	0,039375	0,019688	0,009844	0,004922
etilbutirat	0,878	150	0,06585	0,032925	0,016463	0,008231	0,004116
etildekanoat	0,86	150	0,0645	0,03225	0,016125	0,008063	0,004031
etildodekanotat	0,863	150	0,064725	0,032363	0,016181	0,008091	0,004045

etilheksanoat	0,87	150	0,06525	0,032625	0,016313	0,008156	0,004078
etilhidrocinamat	1,014	150	0,07605	0,038025	0,019013	0,009506	0,004753
etillaktat	1,03	150	0,07725	0,038625	0,019313	0,009656	0,004828
etiloktanoat	0,867	150	0,065025	0,032513	0,016256	0,008128	0,004064
etil sorbat	0,956	150	0,0717	0,03585	0,017925	0,008963	0,004481
etil-2-decenoat	0,88	150	0,066	0,033	0,0165	0,00825	0,004125
etil-2-							
metilbutanoat	0,875	150	0,065625	0,032813	0,016406	0,008203	0,004102
etil-2-oktenoat	0,892	150	0,0669	0,03345	0,016725	0,008363	0,004181
fenilacetaldehid	1,075	150	0,080625	0,040313	0,020156	0,010078	0,005039
furfural	1,16	150	0,087	0,0435	0,02175	0,010875	0,005438
heksanal	0,816	150	0,0612	0,0306	0,0153	0,00765	0,003825
heksanojska							
kislina	0,93	150	0,06975	0,034875	0,017438	0,008719	0,004359
heksilacetat	0,87	150	0,06525	0,032625	0,016313	0,008156	0,004078
izoamil-2-							
metilbutanoat	0,857	150	0,064275	0,032138	0,016069	0,008034	0,004017
izoamilacetat	0,876	150	0,0657	0,03285	0,016425	0,008213	0,004106
karveol	0,958	150	0,07185	0,035925	0,017963	0,008981	0,004491
kreozol (2-metoksi-4-metilfenol)	1,092	150	0,0819	0,04095	0,020475	0,010238	0,005119
linaloloksid	0,945	150	0,070875	0,035438	0,017719	0,008859	0,00443
metildodekanoat	0,87	150	0,06525	0,032625	0,016313	0,008156	0,004078
metilheksanoat	0,885	150	0,066375	0,033188	0,016594	0,008297	0,004148
metilnonanoat	0,88	150	0,066	0,033	0,0165	0,00825	0,004125
metiloktanoat	0,877	150	0,065775	0,032888	0,016444	0,008222	0,004111
metildekanoat	0,871	150	0,065325	0,032663	0,016331	0,008166	0,004083
oktanojska							
kislina	0,91	150	0,06825	0,034125	0,017063	0,008531	0,004266
stiren	0,906	150	0,06795	0,033975	0,016988	0,008494	0,004247

3.2.3.2. Standard etil-trans-2, cis-4-dekadienoata

Zaradi več izomerov spojine prisotnih v standardu, smo morali za etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoat pripravili svojo umeritveno premico, saj bi se sicer vrhovi izomerov prekrivali z vrhovi ostalih standardnih spojin. Enako, kot pri standardih aromatičnih spojin, smo tudi v tem primeru uporabljali dve metodi in smo zato pripravili dve umeritveni premici.

»Split« 1000

V 10 mL merilno bučko smo odpipetirali 150 μ L spojine ter z etanolom dopolnili do oznake (raztopina c_0). 5 mL pripravljeni raztopine c_0 smo odpipetirali v 20 mL merilno bučko in z etanolom dopolnili do oznake. 5 mL dobljene raztopine smo odpipetirali v 10 mL bučko in z etanolom dopolnili do oznake. Dobili smo osnovno standardno raztopino c_1 . Nato smo 5 mL osnovne standardne raztopine odpipetirali v novo 10 mL bučko in z etanolom dopolnili do oznake, ter tako dobili standardno raztopino c_3 . Standardno raztopino c_4 smo po enakem postopku redčenja pripravili iz standardne raztopine c_3 in nato iz slednje še standardno raztopino c_5 . Standardno raztopino c_2 smo pripravili tako, da smo v 20 mL bučko, z 10 mL in 5 mL pipeto, odpipetirali 15 mL standardne raztopine c_1 in do oznake dopolnili z etanolom. Koncentracijo posameznih spojin smo preračunali iz pipetirnega volumna in gostote posamezne spojine in volumna bučke (enačba 2).

Tabela VI: Izračunane koncentracije etil-*tans*-2, *cis*-4 dekadienoata v standardnih raztopinah (»split« 1000).

spojina	d	V [μ L]	c_0 [mg/mL]	c_1 [mg/mL]	c_2 [mg/mL]	c_3 [mg/mL]	c_4 [mg/mL]	c_5 [mg/mL]
etil- <i>tans</i> -2, <i>cis</i> -4 dekadienoat	0,902	150	13,53	1,69125	1,268438	0,845625	0,4228125	0,211406

»Split« 10

V 100 mL bučko smo odpipetirali 10 μ L standarda etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoata in z etanolom dopolnili do oznake in tako dobili osnovno standardno raztopino s c_1 . 5 mL osnovne standardne raztopine smo nato odpipetirali v 10 mL merilno bučko in z etanolom dopolnili do oznake (c_2). Dobljeno raztopino smo odpipetirali v 10 mL merilno bučko in z etanolom dopolnili do oznake (c_3). Po enaki shemi redčenja smo pripravili še dve raztopini (c_4 ; c_5). Koncentracije standardnih raztopin smo preračunali po enačbi 2 in so predstavljene v tabeli VII.

Tabela VII: Izračunane koncentracije etil-*tans*-2, *cis*-4 dekadienoata v standardnih raztopinah (»split« 10).

spojina	d	V [μ L]	c_1 [mg/mL]	c_2 [mg/mL]	c_3 [mg/mL]	c_4 [mg/mL]	c_5 [mg/mL]
etil- <i>trans</i> -2, <i>cis</i> -4	0,902	10	0,0902	0,0451	0,02255	0,011275	0,0056375

dekadienoat						
-------------	--	--	--	--	--	--

3.2.3.3. Standardi spojin s t_r manjšim od 5min, (1- propanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, etilacetat, izoamilalkohol, izobutanol, metanol in metilacetat)

V 100 mL merilno bučko smo natehtali približno 2 grama vsake spojine in z metanolom dopolnili do oznake. Iz pripravljene osnovne raztopine, ki je vsebovala približno 20 mg/mL posamezne spojine, smo z redčenjem pripravili še standardne raztopine s koncentracijami 10, 5, 1, in 0,5 mg/mL. Ker nismo imeli na razpolago primerne polnilne pipete in merilne bučke, s katerima bi iz osnovne standardne raztopine z redčenjem pripravili raztopino s koncentracijo 0,1 mg/mL, smo to pripravili iz raztopine s koncentracijo 1 mg/mL . Shema po kateri smo redčili, je prikazana v tabeli VIII.

Tabela VIII: Shema redčenja pri pripravi standardnih raztopin.

Standardna raztopina	c standardov [mg/mL]	V osnovne raztopine (polnilne pipete)[mL]	V merilne bučke [mL]
c ₁	20	ne redčimo	ne redčimo
c ₂	10	25	50
c ₃	5	25	100
c ₄	1	5	100
c ₅	0,5	5	200
c ₆	0,1	5 (redčimo raztopino s c = 1mg/mL)	50

Tabela IX:Izračunane koncentracije v standardnih raztopinah.

spojina	natehta [mg]	c ₁ [mg/mL]	c ₂ [mg/mL]	c ₃ [mg/mL]	c ₄ [mg/mL]	c ₅ [mg/mL]	c ₆ [mg/mL]
1-propanol	2020,8	20,208	10,104	5,052	1,0104	0,5052	0,10104
1-butanol	2020,6	20,206	10,103	5,0515	1,0103	0,50515	0,10103
2-metil-1-butanol	2027,4	20,274	10,137	5,0685	1,0137	0,50685	0,10137
etilacetat	2019,6	20,196	10,098	5,049	1,0098	0,5049	0,10098
izoamilalkohol	2018,4	20,184	10,092	5,046	1,0092	0,5046	0,10092
izobutanol	2006,2	20,062	10,031	5,0155	1,0031	0,50155	0,10031
metilacetat	2021,7	20,217	10,1085	5,05425	1,01085	0,505425	0,101085

3.2.3.4. Standardi acetona, metanola in ocetne kislina

Glede na analize vzorcev bi lahko aceton, metanol in ocetno kislino vključili v skupino spojin s t_r , manjšim od 5 min, vendar, ker spojine v prejšnji skupini niso zadosti topne v vodi, smo metanol izbrali kot topilo. Visoka koncentracija metanola bi zasitila detektor, zaradi česar smo detektor vklopili šele pri času 1,65 min. Aceton ima podoben t_r kot metanol in zato ne bi bil viden. Ocetno kislino smo v to skupino vključili, saj ob uporabi hidrofobne kolone kisline v kromatogramu tvorijo značilne repe, ki se lahko prekrivajo s sosednjimi vrhovi.

Standardne raztopine smo pripravili po enakem postopku, kot je opisan za spojine s t_r , manjšim od 5 min, le da smo za topilo uporabili prečiščeno vodo.

Tabela X: Izračunane koncentracije v standardnih raztopinah.

spojina	natehta [mg]	c ₁ [mg/mL]	c ₂ [mg/mL]	c ₃ [mg/mL]	c ₄ [mg/mL]	c ₅ [mg/mL]	c ₆ [mg/mL]
aceton	2037,9	20,379	10,1895	5,09475	1,01895	0,509475	0,101895
metanol	1932,6	19,326	9,663	4,8315	0,9663	0,48315	0,09663
ocetna kislina	2140,5	21,405	10,7025	5,35125	1,07025	0,535125	0,107025

3.2.3.5. Standardi etanola

Standardno raztopino etanola smo pripravili tako, da smo v 100 mL bučko natehtali 10 g absolutnega etanola in do oznake dopolnili s prečiščeno vodo. Nato smo s polnilno pipeto odpipetirali 10 mL pripravljenе raztopine v novo 100 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Dobili smo osnovno standardno raztopino, ki je vsebovala 10 mg/mL etanola. Iz osnovne standardne raztopine smo z mikropipeto pripravili standardne raztopine, ki so navedene v tabeli XI.

$$m_{(\text{etanol})} = 10000,4 \text{ mg}$$

Tabela XI: Shema redčenja za pripravo standardnih raztopin etanola

c Etanola [mg/mL]	V osnovne standardne raztopine [μL]	V prečiščene vode [μL]
10,0	1000	0
5,0	500	500
1,0	100	900
0,5	50	950
0,1	10	990

4. Rezultati in razprava

4.1. Mikroekstrakcija na trdni fazi in GC-MS

Eksperimentalno delo smo začeli z mikroekstrakcijo na trdni fazi (SPME) in analizo na plinskem kromatografu sklopljenim z masnim spektrometrom (GC-MS). Analiza frakcij destilata je zajemala veliko število vzorcev z različno sestavo in koncentracijo spojin, zato smo začetne analize žeeli opraviti na čim bolj reprezentativnem vzorcu, na katerem bomo lahko razvili metodo uporabno tudi za vse ostale vzorce. Izbrali smo si vzorec 33, ki vsebuje združene frakcije prve destilacije, zaradi česar smo sklepali, da bo vseboval večino spojin, ki so prisotne v ostalih vzorcih.

4.1.1. Izbira SPME vlakna in faze za ekstrakcijo

Na voljo smo imeli dve SPME vlakni:

- divinilbenzen/karboksen/polidimetilsilosan (DVB/CAR/PDMS), debelina trdne faze 50/30 µm (v nadaljevanju: Vlakno A)
- polidimetilsilosan (PDMS), debelina trdne faze 100 µm (v nadaljevanju: Vlakno B)

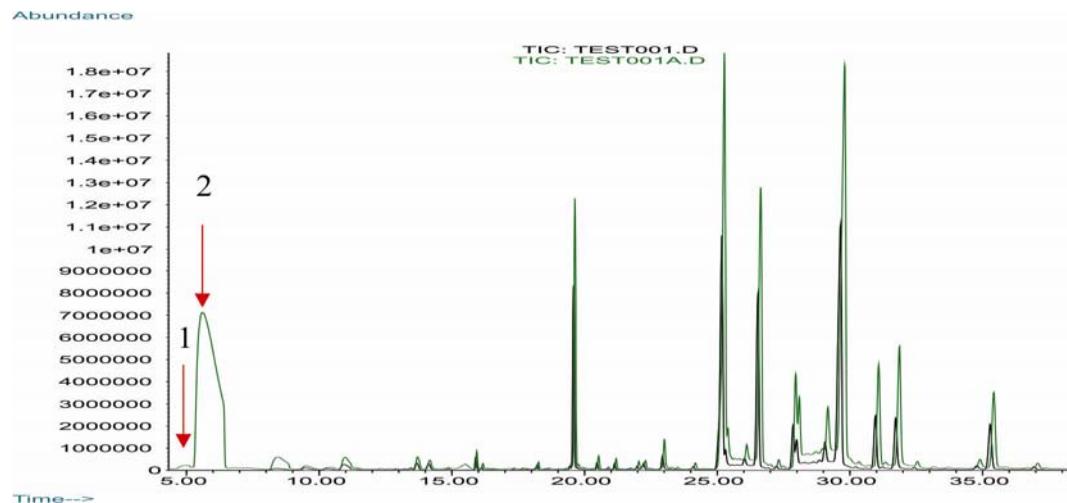
Žeeli smo ugotoviti katero izmed vlaken je bolj ustrezno za naše analize. Da bi to ugotovili, smo z obema vlaknoma naredili mikroekstrakcijo po metodi, ki jo je opisala Bogataj [14]. V stekleničko smo prenesli 1 mL vzorca in jo zaprli s pokrovom z membrano (septumom). Stekleničko smo nato termostatirali na 40 °C. Membrano pokrovčka smo prebodli z zaščitno iglo in v parni fazi nad vzorcem ven potisnili iglo s stacionarno fazo. Ekstrakcijo smo izvajali 20 minut, nato pa smo iglo izvlekli in jo vstavili v injektor. V injektorju smo iglo s stacionarno fazo zopet potisnili ven, tako da so se adsorbirane spojine desorbirale. Temperatura injektorja je bila 220 °C. Temperaturni program plinskega kromatografa je prikazan v tabeli XII.

Tabela XII: temperaturni program

začetna T	70 °C
t začetne T	4 min
temperaturni gradient	15 °C/min
končna T	210 °C
čas končne T	4 min

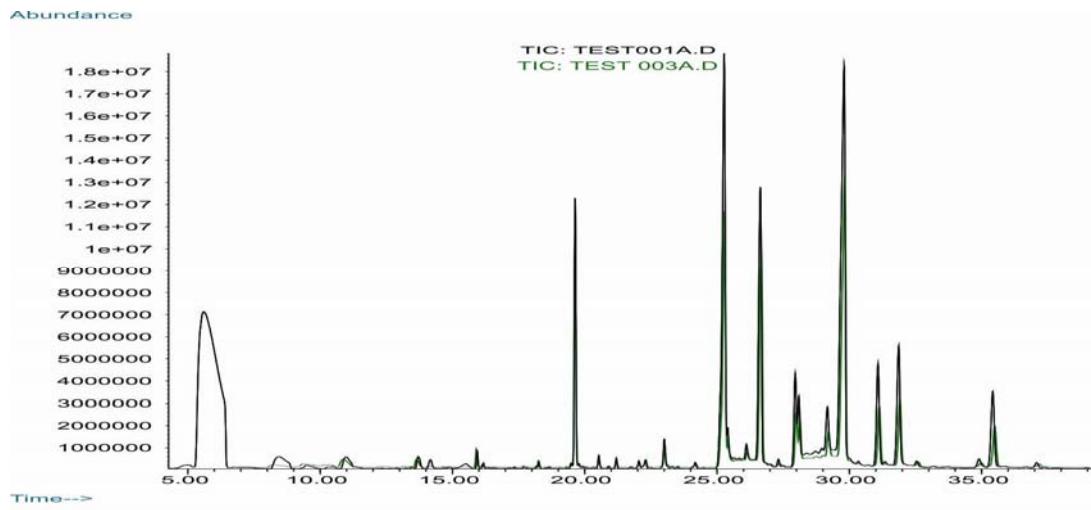
Vlakni smo najprej primerjali na podlagi števila vrhov v kromatogramu, kasneje pa tudi na podlagi površin pod vrhovi za izbrane 4 spojine, ki so bile v literaturi opisane kot značilne za

aromo viljamovke. Na spodnji sliki sta prikazana prekrita kromatograma obeh vlaken. Test 001 pripada vlaknu A, Test 001A pa vlaknu B. Iz kromatogramov lahko razberemo, da je rezultat ekstrakcije z obema vlaknoma približno enak. V obeh kromatogramih so vidni vrhovi pri enakih retencijskih časih, z izjemo vrhov označenih z 1 in 2, ki sta vidna le v kromatogramu vlakna B. Dodatna vrhova v spektru vlakna B sta vidna, ker smo sprva pri analizi z vlaknom A meritveno območje masnega spektrometra nastavili na molsko maso večjo 50 g/mol. Vrh 1 predstavlja metanol z molsko maso 32,04 g/mol, vrh 2 pa predstavlja etanol z molsko maso 46,07 g/mol. Masni spektrometer zaradi molske mase fragmentov nižje od nastavitev meritvenega območja, teh dveh spojin ni zaznal. Pri analizi z vlaknom B smo meritveno območje znižali na molsko maso, večjo od 30 g/mol. Posledično sta v kromatogramu vidna tudi vrhova za metanol in etanol. Pri spektru vlakna B lahko opazimo, da so odzivi nekoliko višji, kar predstavlja prednosti v primerjavi z vlaknom A.



Slika 11: Kromatogram vlakna A in vlakna B po ekstrakciji iz parne faze.

Z vlaknom B smo ekstrakcijo in analizo ponovili in kromatogram primerjali s prvim kromatogramom vlakna B. Iz kromatograma lahko sklepamo, da ekstrakcija z vlaknom B, iz parne faze daje zadovoljivo ponovljive rezultate.



Slika 12: Primerjava dveh kromatogramov posnetih z vlaknom B.

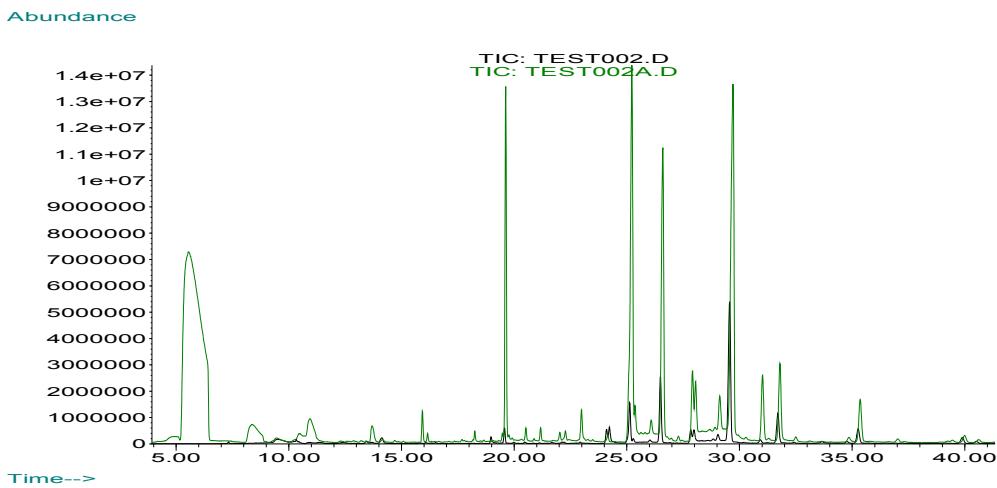
Nato smo primerjali površine pod krivuljo za 4 izbrane spojine. Podatki, prikazani v spodnji tabeli kažejo, da je ekstrakcija z vlaknom B bolj učinkovita, saj so vrednosti površin pod krivuljo pri vseh štirih spojinah večje od površin pod krivuljo istih spojin pri vlaknu A.

Tabela XIII: Tabela površin pod vrhovi za vlakno A in vlakno B

spojina	AUC (Vlakno A)	AUC (Vlakno B)
furfural	$2,43 \times 10^7$	$3,58 \times 10^7$
heksilacetat	$5,56 \times 10^6$	$9,93 \times 10^6$
etildekanoat	$8,21 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$
<i>trans</i> -2, <i>cis</i> -4-dekadienoat	$9,79 \times 10^8$	2×10^9

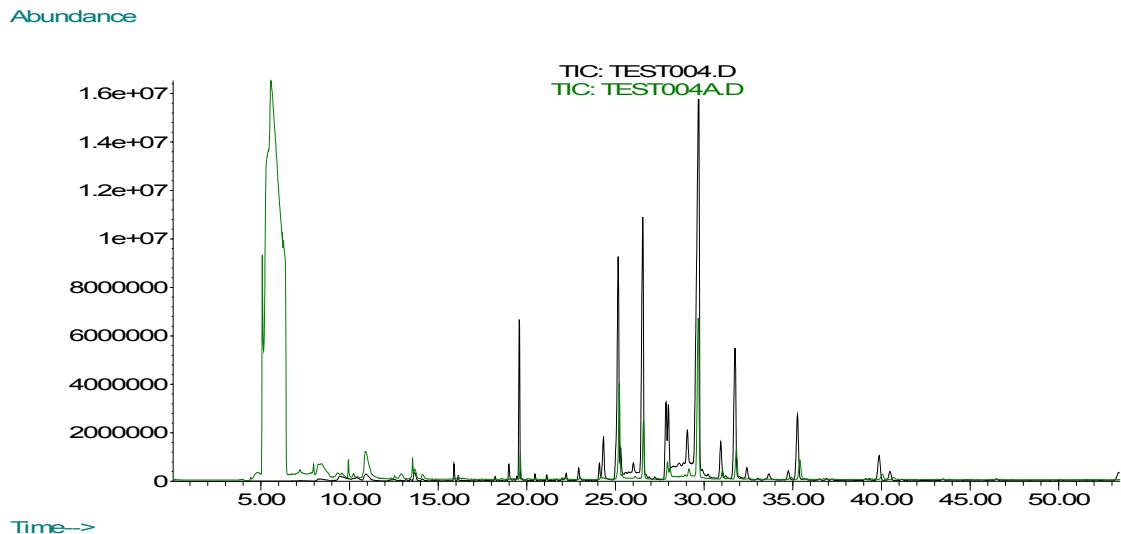
V prvem eksperimentu smo ekstrakcijo izvajali v parni fazi nad vzorcem, druga možnost pa je bila ekstrakcija iz tekoče faze. V drugem eksperimentu smo zato želeli preveriti vpliv faze, iz katere izvajamo ekstrakcijo. Poizkus smo z obema vlaknoma opravili enako kot prvega, le da smo vlakno tokrat potopili v vzorec in tako ekstrakcijo izvajali iz tekoče faze.

Na spodnji sliki sta prikazana prekrita kromatograma obeh vlaken. Test 002 pripada vlaknu A, Test 002A pa vlaknu B. Iz kromatogramov je razvidna velika razlika med vlaknoma. Vlakno B ima tokrat mnogo višje odzive in tudi nekaj vrhov, ki so v kromatogramu vlakna A slabo vidni ali pa jih ni. Vrhov metanola in etanola v kromatogramu vlakna A ni, iz razlogov obrazloženih pri prvem poizkusu.



Slika 13: Primerjava kromatogramov vlakna A in vlakna B po ekstrakciji iz tekoče faze.

Zaradi tako velike razlike, smo se odločili poizkus ponoviti. Na spodnji sliki sta prikazana prekrita kromatograma obeh vlaken. Test 004 pripada vlaknu A, Test 004A pa vlaknu B. Iz kromatogramov je razvidno, da so pri ponovljenem poizkusu v kromatogramu vlakna A odzivi višji od odzivov v kromatogramu vlakna B. Ti podatki so v nasprotju s podatki iz prve meritve.



Slika 14: Primerjava kromatogramov vlakna A in vlakna B po ekstrakciji iz tekoče faze 2.

V prvem eksperimentu smo ugotovili, da daje vlakno B pri ekstrakciji boljše rezultate, pri drugem poizkusu pa zaradi neponovljivosti meritev vlaken med seboj nismo mogli primerjati. Za analize smo se odločili uporabljati vlakno B, ki ga je uporabila tudi Bogataj [14].

S poskusoma smo ugotovili, da je zaradi ponovljivosti ekstrakcijo bolje izvajati iz parne faze nad vzorcem. Poleg tega so, kot je opisano v uvodu, aromatične spojine, ki smo jih analizirali, hlapne, zaradi česar je ekstrakcija iz parne faze bolj smiselna.

4.1.2. Analiza etanola in metanola

Mikroekstrakcija na trdni fazi se pogosto uporablja pri analizi aromatičnih spojin. V svojem delu smo sočasno žeeli kvalitativno in kvantitativno ovrednotiti tudi metanol in etanol. V literaturi smo našli delo, kjer so avtorji z metodo SPME-GC-MS kvantitativno vrednotili tudi etanol in metanol. Vsebnosti etanola v njihovih vzorcih je bila v ozkem območju (39-42 vol. %) [33]. V svojem primeru smo ocenili, da je koncentracija etanola v vzorcih v območju 10-80 vol. %. Da bi preverili ali koncentracija etanola vpliva na ekstrakcijo metanola in obratno, smo pripravili 9 vodnih raztopin z različnimi koncentracijami etanola in metanola, ki so predstavljene v tabeli z številkami 1-9. 1 mL vsake raztopine smo prenesli v stekleničko ter napravili ekstrakcijo in analizo po postopku opisanem pri izbiri SPME vlakna.

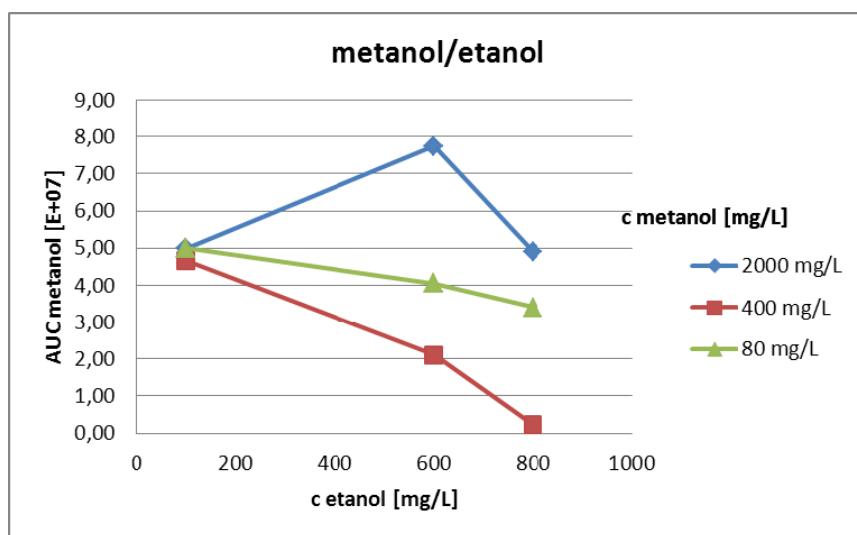
Tabela XIV: Kombinacije raztopine etanola in metanola v različnih koncentracijah.

metanol [mg/L]		etanol [g/L]		
		100	600	800
2000		1	2	3
400		4	5	6
80		7	8	9

Površine pod krivuljami smo zbrali v dveh ločenih tabelah. V eni tabeli smo zbrali površine pod krivuljami za etanol, v drugi tabeli pa smo zbrali površine pod krivuljami za metanol. Nato smo s podatki iz tabele AUC za etanol narisali graf (graf 1), ki prikazuje odvisnost AUC za etanol od koncentracije metanola. Enak graf (graf 2) smo narisali tudi s podatki iz tabele AUC za metanol, le da so bile AUC za metanol predstavljene v odvisnosti od koncentracije etanola.

Tabela XV: AUC za metanol.

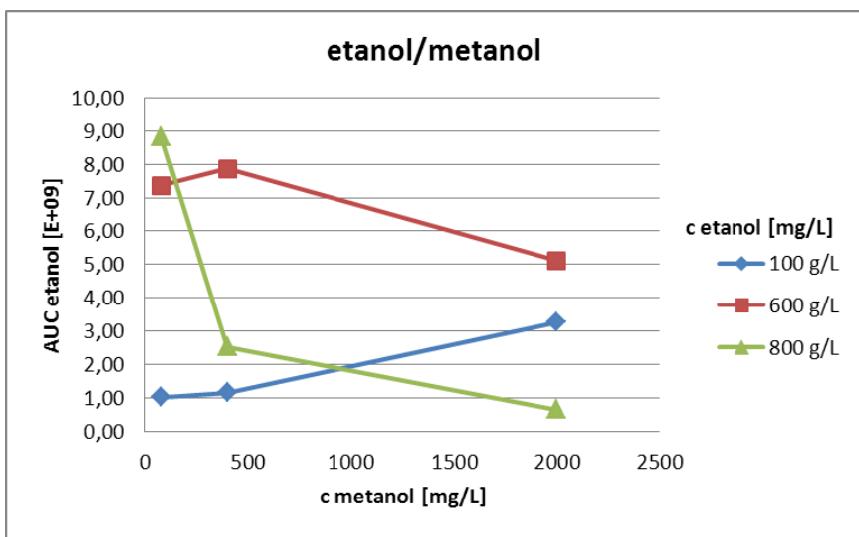
etanol [mg/L]		metanol [mg/L]		
		2000	400	80
100		4,98E+07	4,66E+07	4,99E+07
600		7,74E+07	2,10E+07	4,04E+07
800		4,90E+07	2,26E+06	3,39E+07



Graf 1: AUC metanola v odvisnosti od c etnola.

Tabela XVI: AUC za etanol.

metanol [mg/L]		etanol [g/L]		
		100	600	800
2000		3,26E+09	5,11E+09	6,55E+08
400		1,15E+09	7,87E+09	2,52E+09
80		1,02E+09	7,37E+09	8,84E+09

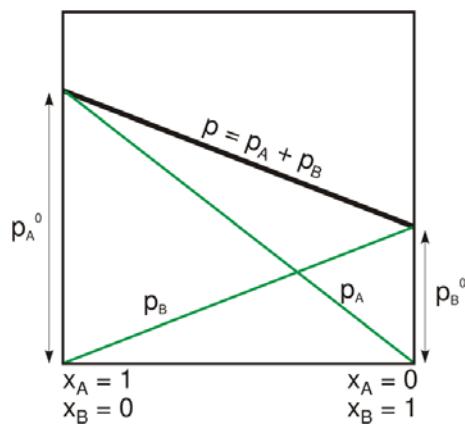


Graf 2: AUC etanola v odvisnosti od koncentracije metanola.

Iz obeh grafov lahko razberemo, da koncentracija ene spojine vpliva na AUC druge. Krivulje v grafih nakazujejo, da se ob večanju koncentracije ene spojine AUC druge manjša. Najbolj verjetna razloga za ta pojav je v Raoultovem zakonu, ki obravnava parne tlake idealnih raztopin. Zakon pravi, da je parni tlak idealne raztopine odvisen od parnega tlaka posamezne komponente in njenega molskega deleža v raztopini. Delni tlak komponente (p_A) je enak produktu tlaka čiste komponente (p_A^0) in njenega molskega deleža v zmesi (x_A) (enačba 3) [36].

Raoultov zakon:

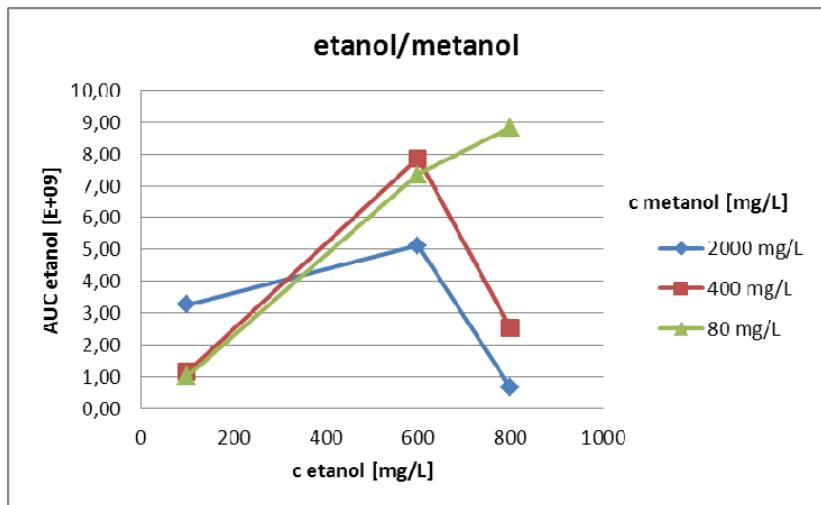
$$p_A = p_A^0 \cdot x_A \quad (\text{enačba 3})$$



Slika 15: Diagram parnih tlakov zmesi komponent A in B [36].

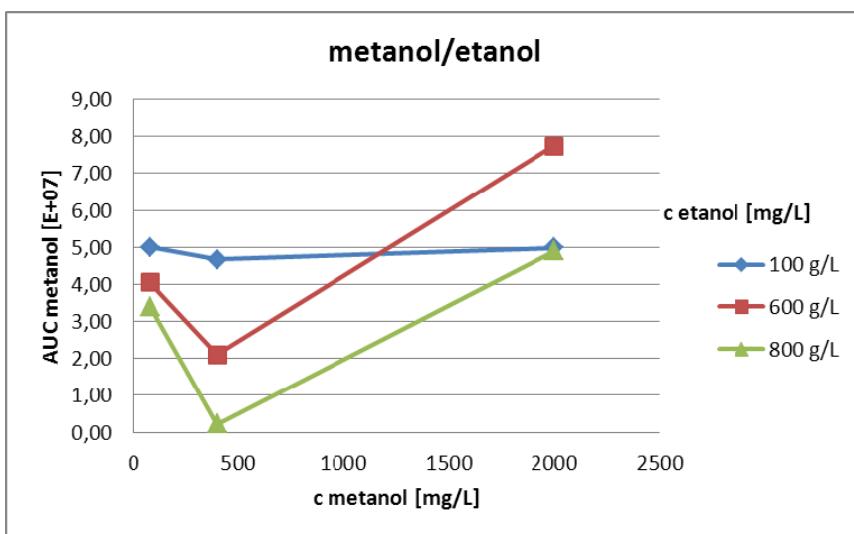
Ob povečanju metanola v zmesi se zmanjša molski delež etanola v zmesi, kar zmanjša njegov delni tlak. Ob manjšem delnem tlaku je v parni fazi nad zmesjo manjši delež etanola, ki se lahko veže na stacionarno fazo SPME vlakna. Ustrezno se zmanjša AUC etanola. Analogno se zgodi z metanolom pri povečanju koncentracije etanola.

S podatki iz tabel XV in XVI smo preverili še linearost premice etanola pri različnih koncentracijah metanola in obratno. Tokrat smo narisali grafa, v katerih smo predstavili AUC vrednosti v odvisnosti od koncentracije spojine za vse 3 koncentracije druge spojine.



Graf 3: AUC etanola v odvisnosti od koncentracije etanola.

Na grafu, ki predstavlja odvisnost AUC etanola od koncentracije etanola pod vplivom treh različnih koncentracij metanola lahko vidimo, da premica etanola v raztopini z 80 mg metanola dokaj linearja, nato pa z višanjem koncentracije metanola v raztopini linearnosti ni premice etanola ni več opazna. Da tudi med AUC metanola in koncentracijo metanola linearja zveza ne obstaja, je razvidno iz grafa 4, ki predstavlja odvisnost AUC metanola in koncentracije metanola.



Graf 4: AUC metanola v odvisnosti od c metanola.

Z eksperimentom smo ugotovili, da zaradi nelinearnosti odziva AUC v odvisnosti od koncentracije in širokega območja koncentracij etanola v vzorcih, metoda z mikroekstrakcijo na trdni fazi ni primerna za kvantitativno analizo metanola in etanola v naših vzorcih. Za

potek eksperimentalnega dela je ta ugotovitev pomenila, da bi morali za kvantitativno analizo metanola in etanola uporabiti drugačno metodo, kot za kvantitativno analizo aromatičnih spojin.

Najboljša metoda bi bila, da bi vzorec direktno injicirali v injektor. Problem pri takšni metodi bi bila količina vode, saj je v vzorcih prisotne tudi do 90 % vode. Kolona, ki smo jo uporabljali, takšne količine vode ne prenese. Poskusili bi lahko direktno injicirati vzorce, ki bi jih predhodno redčili z organskim topilom, ki se dobro meša z vodo, hkrati pa bi hitro prepotovalo kolono. Primer takšnih topil bi lahko bili:

- tetrahidrofuran
- acetonitril
- kloroform
- *terc*-butilmetileter

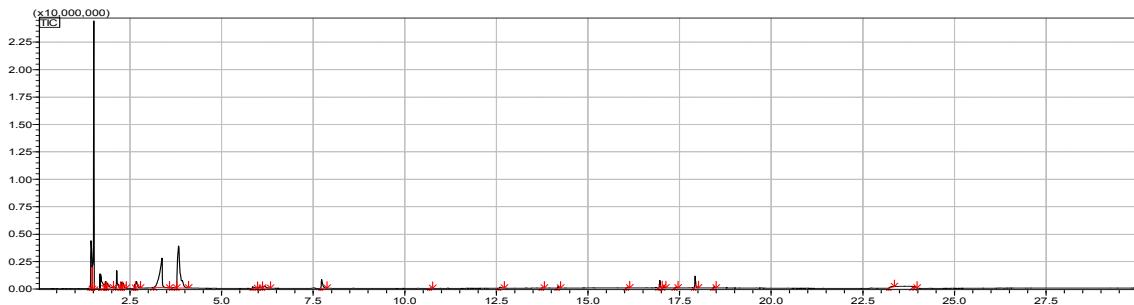
V prihodnje bi bilo potrebno preizkusiti uspešnost take metode, za kar pa se v našem eksperimentalnem delu nismo odločili.

4.2. GC-MS z direktnim injiciranjem

Eksperimentalno delo smo nadaljevali na plinskem kromatografu z masnim spektrometrom, s kolono, ki dobro prenaša vodo. To nam je omogočalo, da smo lahko vzorce direktno injicirali v injektor. Podobno kot pri metodi z mikroekstrakcijo smo tudi pri tej metodi začetne analize opravili na reprezentativnem vzorcu številka 33.

4.2.1. Optimizacija GC-MS metode

Analizo smo začeli z metodo, ki smo ji parametre nastavili na podlagi prejšnjih analiz arome, opravljenih v našem laboratoriju. $1 \mu\text{L}$ vzorca smo direktno injicirali v injektor s temperaturo 250°C . Uporabili smo »split« način injiciranja z razmerjem 10. Začetna temperatura kolone je bila prvih 5 min 40°C , nato se je linearно dvigala, z gradientom $10^\circ\text{C}/\text{min}$ do končne temperature 250°C , ki smo jo zadržali še 5 min. Pretok nosilnega plina je bil $1 \text{ mL}/\text{min}$. Ionizacijska napetost je bila $0,7 \text{ eV}$, pri čemer je bila temperatura ionizacije 200°C . Detektor je imel nastavljeno absolutno napetost 1 kV .



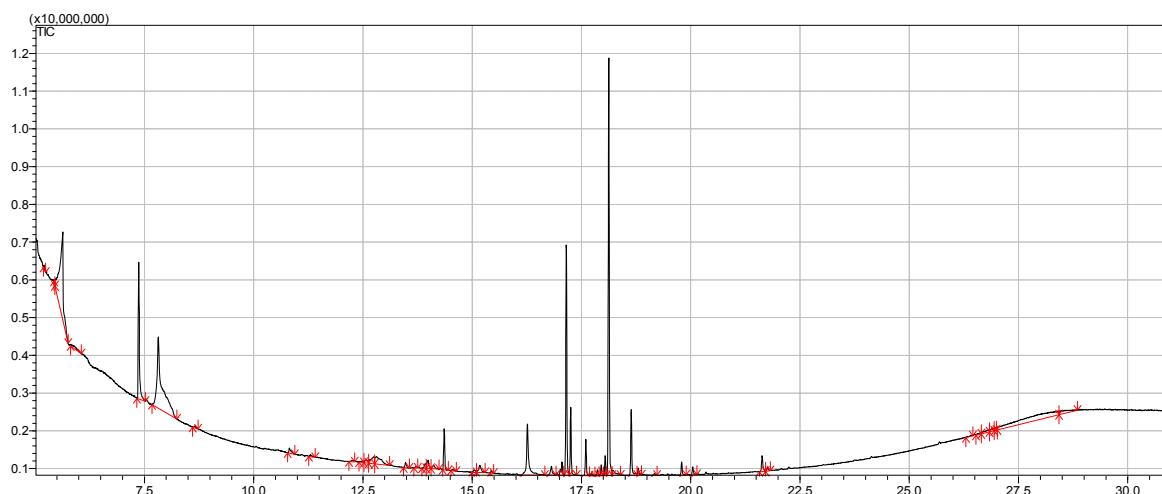
Slika 16: kromatogram reprezentativnega vzorca št. 33

V kromatogramu je bil pri t_r približno 1,5 min vrh, ki pripada etanolu, izrazito višji od ostalih vrhov v kromatogramu in je zasitol detektor. Da bi zmanjšali odziv vrha, smo v metodi spremenili »split« razmerje na 100. Višina vrha je po spremembi metode ostala ista, detektor pa se je tudi tokrat zasitol. Povečanje »split« razmerja je zmanjšalo občutljivost metode, zaradi česar v kromatogramu izgubimo nekatere vrhove. Ti rezultati so pokazali, da vseh spojin v vzorcu ne bomo mogli analizirati z isto metodo.

Zaradi velike razlike med intenziteto odzivov smo se odločili kromatogram ločiti na dva dela, ki ju bomo nato analizirali z različnima metodama. Vrhovi z nižjimi odzivi se pojavijo po $t_r = 5$ min, zato smo za mejo določili $t = 5$ min.

4.2.1.1. Optimizacija metode za spojine s t_r , večjim od 5 min

Hoteli smo preveriti, če bi ob zmanjšanju razmerja »split« v delu kromatograma z nižjimi odzivi zasledili kakšne nove vrhove in zato smo metodi spremenili način iz »split« v »splitless«, detektor pa smo vklopili pri $t = 5$ min, tako da smo se izognili zaznavi vrhov v prvem delu kromatograma. Odzivi za spojine s t_r , večjim od 5 min, so se ustrezeno povišali, vendar pa novih vrhov nismo zaznali. Opazili smo tudi, da je bazna linija na začetku in koncu metode dvignjena, iz česar smo sklepali, da je ob načinu »splitless« presežena kapaciteta kolone. Metoda zato ni primerna za analizo vzorcev.



Slika 17: Kromatogram reprezentativnega vzorca 33 (»splitless«).

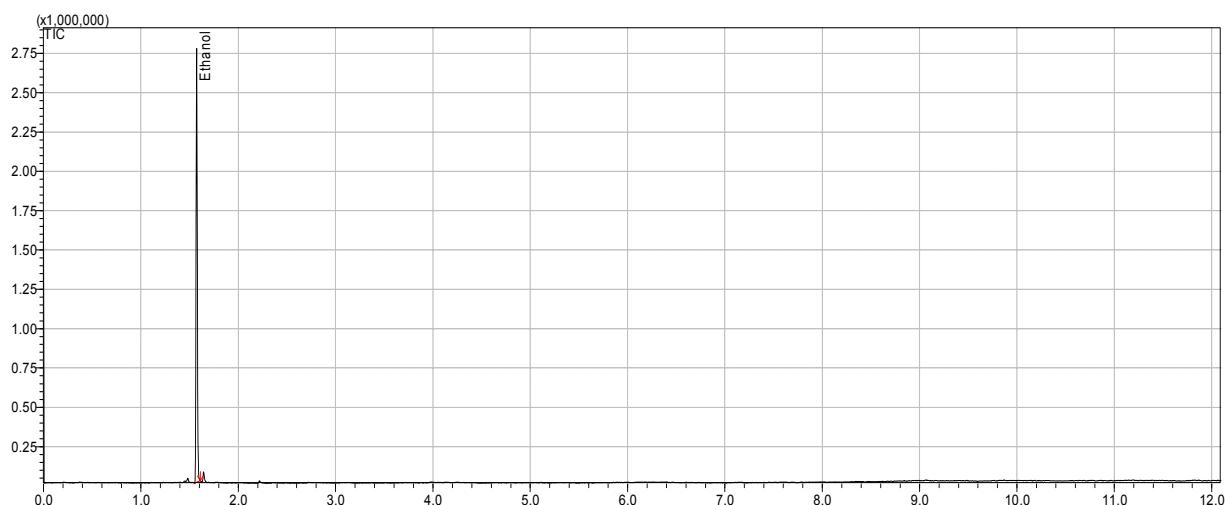
Za spojine, ki imajo t_r večji od 5 min, smo kot optimalno uporabili metodo z načinom »split«, razmerje 10, ter vklopom detektorja pri času 5 min. Temperaturnega programa zaradi ustrezne ločljivosti nismo spremajali.

4.2.1.2. Optimizacija metode za spojine s t_r , manjšim od 5 min

Zaradi visokih odzivov spojin s t_r , manjšim od 5 min, smo v metodi, s katero smo začeli optimizacijo, spremenili »split« razmerje na 500 in volumen injiciranja na $0,5 \mu\text{L}$, kar je ekvivalentno »split« razmerju 1000. Odziv za etanol je bil še vedno enako visok in je kljub večjemu »split« razmerju zasitol detektor, ostali vrhovi pa so se ustrezeno zmanjšali. Odločili smo se, da za te spojine uporabimo metodo s »split« razmerjem 1000, etanol pa bomo analizirali ločeno.

4.2.1.3. Optimizacija metode za etanol

Količina etanola na koloni je bila, kljub vsem spremembam do sedaj, prevelika in je zasitila detektor. Ker aparatura ni dopuščala dodatnega povečanja »split« razmerja smo vzorec pred injiciranjem z vodo redčili v razmerju 1:100. Metodo smo uporabili enako, kot pri spojinah s t_r , manjšim od 5 min. Pri analizi vzorca se tokrat detektor ni zasitil, hkrati pa se je tudi intenziteta odziva za etanol zmanjšala. Ker ima etanol kratek t_r ($\approx 1,57$ min), smo metodo lahko modificirali. Po začetnih 4 minutah smo v delu naraščanja temperature spremenili hitrost naraščanja temperature na $100\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, kar je občutno skrajšalo metodo. Detektor smo po 12 min izključili.



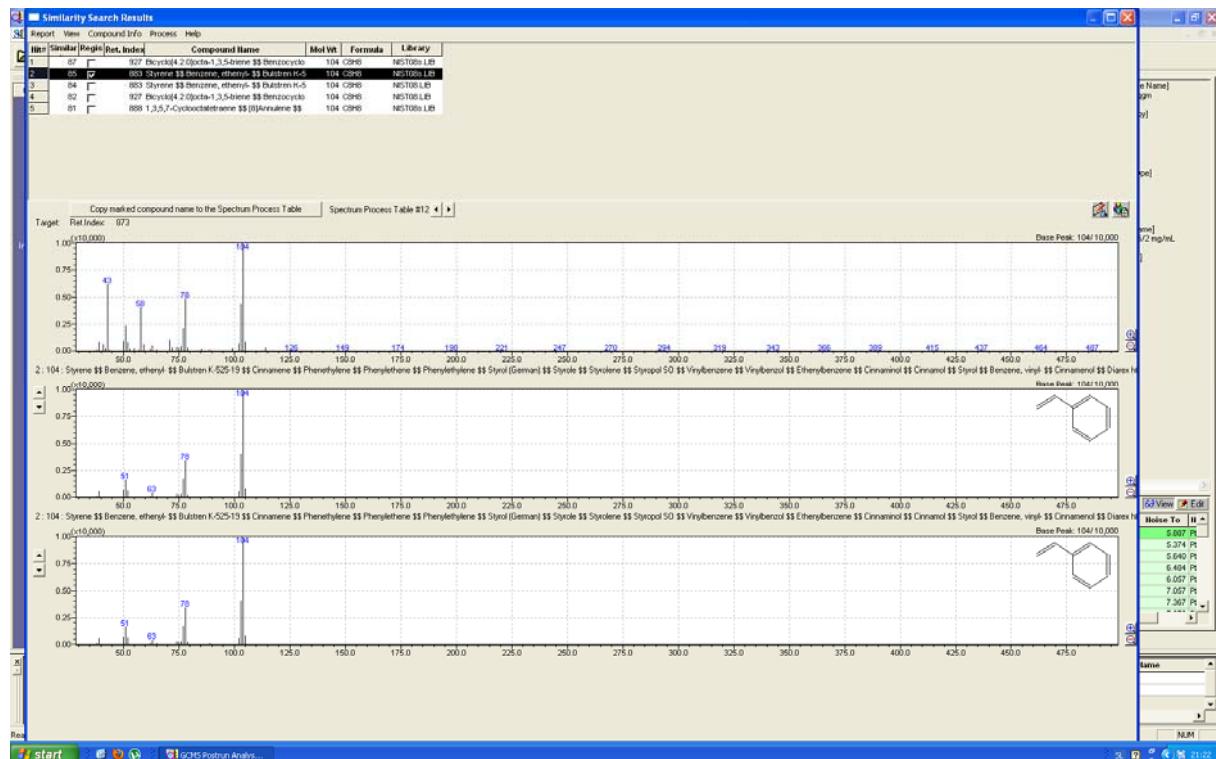
Slika 18: Kromatogram analize etanola.

4.3. Analiza frakcij destilata

V preliminarnih testih smo preizkusili dve različni metodi analize hlapnih snovi z dvema različnima instrumentoma. Pokazali smo, da metoda z mikroekstrakcijo na trdni fazi ne omogoča kvantitativne analize etanola in metanola. Nasprotno smo v preliminarnih testih ugotovili, da z direktnim injiciranjem vzorca v injektor plinskega kromatografa z ustrezno kolono, ki omogoča analizo vzorcev z veliko vsebnostjo vode, lahko kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo vse hlapne spojine prisotne v destilatu sadne kaše kultivarja hruške viljamovke. Analizo smo zato izvedli na plinskem kromatografu z direktnim injiciranjem.

4.3.1. Kvalitativna analiza

Vzorce frakcij smo analizirali z vsako izmed treh metod, ki smo jih razvili z optimizacijo. Po analizi smo za vsak vzorec dobili tri kromatograme, ki so skupaj predstavljali profil vseh prisotnih spojin v vzorcu. Iz kromatogramov smo si v računalniškem programu GC-MS-a lahko ogledali masni spekter za vsak vrh v kromatogramu. Program je masni spekter primerjal z masnimi spektimi, ki jih je imel v svoji knjižnici masnih spektrov (NIST08 in FFNSC 1.3) in nato je, na podlagi odstotka ujemanja, podal predloge identifikacije spojine. Predloge smo pregledali in izbrali najbolj verjeten in smiseln predlog.



Slika 19: Primerjava masnega spektra z spektrom iz knjižnice. Zgoraj levo so podani predlogi identifikacije skupaj z odstotkom ujemanja. V tem primeru smo se odločili za stiren, ki je bil predlagan kot drugi, saj je bila večja verjetnost da je prisoten v vzorcu, kot pa za prvo spojin

Identiteto spojine smo preverili še s primerjavo t_r spojine in t_r njenega standarda. Če sta se t_r ujemala, smo identiteto spojine lahko dokončno potrdili. Za vsak kromatogram smo tako dobili seznam identificiranih spojin.

Sezname identificiranih spojin vseh kromatogramov smo nato pregledali in iz njih sestavili seznam vseh identificiranih spojin. Tako smo dobili seznam 65 spojin, ki so prisotne v vzorcih frakcij destilata. Vse spojine niso nujno prisotne v vseh frakcijah, se pa vsaka spojina pojavi v vsaj eni frakciji. Identificirane spojine so po abecednem vrstnem redu navedene v

tabeli 9, sestave spojin po frakcijah posebej nismo opisali, saj bo ta razvidna pri kvantitativni analizi vzorcev

Tabela XVII: Identificirane spojine v frakcijah destilata.

	spojina
1	1-butanol
2	1-heksanol
3	1-oktanol
4	1-propanol
5	2-etilfenol
6	2-feniletanol
7	2-feniletilacetat
8	2-heptanol
9	2-heptanon
10	2-metil-1-butanol
11	2-metilbutanojska kislina
12	2-metilbutilacetat
13	4-etilfenol
14	4-vinilanisol
15	aceton
16	butilacetat
17	dekanjska kislina
18	dietilsukcinat
19	etanol
20	etyl-2-decenoat
21	etyl-2-metilbutanoat
22	etyl-2-oktenoat
23	etyl- 9,12-oktadekadienoat
24	etylacetat
25	etylbenzoat
26	etylbutirat
27	etyldekanoat
28	etildodekanotat
29	etylheksanoat
30	etylhidrocinamat
31	etillaktat

32	etillinolat
33	etiloktanoat
34	etiloleat
35	etilpalmitat
36	etilpalmitoleat
37	etilsorbat
38	etyl- <i>trans-2,cis-4</i> dekadienoat
39	farnezen
40	fenilacetaldehyd
41	furfural
42	heksanal
43	heksanojska kislina
44	heksilacetat
45	izoamil-2-metilbutanoat
46	izoamilacetat
47	izoamilalkohol
48	izoamilpentanoat
49	izobutanol
50	karveol
51	kreozol
52	linaloloksid
53	metanol
54	metil-9,12,15-oktadekatrienoat
55	metilacetat
56	metildekanoat
57	metildodekanoat
58	metilheksanoat
59	metillinolenat
60	metilnonanoat
61	metiloktanoat
62	metil- <i>trans-2, cis-4</i> dekadienoat
63	ocetna kislina
64	oktanojska kislina

Med drugim nam je uspelo identificirati metil- in etil-*trans*-2, *cis*-4 dekadienoat, ter heksilacetat, ki so v literaturi navedene kot ključne spojine arome viljamovke [1, 2]. Nismo pa uspeli identificirati vseh 4 izomerov etil- in metil-*trans*-2, *cis*-4 dekadienoata.

4.3.2. Kvantitativna analiza

Iz seznama identificiranih spojin smo izločili nekaj spojin, ki jih nismo kvantificirali. Vzrok za izločitev je bil lahko v oceni, da nimajo vpliva na aroma (večinoma estri višjih maščobnih kislin), nedosegljivost standarda (metil-*trans*-2, *cis*-4 dekadienoat), nečist standard (farnezen), oziroma neustrezna metoda analize (aceton). Vse ostale identificirane spojine smo na podlagi površin pod vrhovi v kromatogramih kvantitativno ovrednotili. Za vsako spojino smo izdelali umeritveno premico. Izdelali smo jih tako, da smo pripravili standardne raztopine spojin z različnimi koncentracijami (postopek opisan v poglavju 3.2.3.) in jih analizirali z enako metodo, s katero smo spojine analizirali v vzorcih. Iz odnosa površine pod vrhovi v kromatogramih standardnih raztopin in njihove koncentracije smo za vsako spojino izračunali enačbo umeritvene premice.

Ustreznost (linearnost) posamezne umeritvene premice smo ocenili na njihovega podlagi njenega R^2 . Za večino umeritvenih premic smo dosegli R^2 , ki je bil večji od 0,99. Samo v redkih primerih je bil R^2 med 0,95 in 0,99. Glede na dejstvo, da so bile vse spojine v isti raztopini, ki smo jo za raztopine z manjšo koncentracijo redčili, smo možnost nenatančnosti pri izdelavi umeritvenih premicah izključili. Pri teh spojinah je linearost umeritvene premice v ožjem območju, kar pa na našo analizo ni vplivalo. Do odstopanj je namreč prišlo pri večjih koncentracijah, ki pa v vzorcih niso prisotne.

Za etil-*trans*-2, *cis*-4 dekadienoat, etildodekanoat in etildekanoat smo napravili dve umeritveni premici. Vzrok za to je, da smo med analizo ugotovili, da nekateri vzorci vsebujejo veliko višje koncentracije teh spojin, zaradi česar se je detektor občasno zasitol. Za te vzorce smo analizo ponovili z drugo metodo (opisano v poglavju 3.2.2.1.), kar je zahtevalo dodatne umeritvene premice.

4.3.2.1. Analiza spojin s t_r večjim od 5 min

Koncentracije v tabelah so podane v ppm. Spojine, ki v določeni frakciji ni bilo prisotne, imajo v tej frakciji zabeleženo koncentracijo 0 ppm. ? pomeni, da spojine v frakciji nismo mogli kvantificirati. Spojine so v tabelah navedene po naraščajočem t_r . Številka v oklepaju predstavlja številko vzorca.

Tabela XVIII: Koncentracije spojin s t_r, većim od 5 min, pridobljene s serijo 1.

spojina	0,05 (6)	0,5 L (7)	1 L (8)	1,5 L (9)	2 L (10)	2,5 L (11)	3 L (12)	3,5 L (13)	4 L (14)	4,5 L (15)	5 L (16)	5,5 L (17)	6 L (18)	6,5 L (19)	7 L (20)	7,5 L (21)	8 L (22)	8,5 L (23)	9 L (24)	10 L (25)	zdr. fr. (31)
heksanal	2,90	1,17	7,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etilbutirat	11,85	10,42	2,51	0,42	1,45	0,61	1,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,83
etillaktat	14,49	25,88	16,85	37,72	15,50	16,86	30,67	41,78	39,65	48,45	21,95	16,23	56,65	0,66	28,53	15,38	12,54	29,88	43,63	25,98	37,28
butilacetat	8,97	8,08	3,02	2,95	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	2,27
furfural	0,00	0,00	0,82	1,07	1,67	1,42	2,36	3,77	4,17	4,43	7,09	6,60	13,69	8,29	5,90	14,77	10,82	14,48	18,87	7,95	6,35
etyl-2-metilburanoat	7,54	5,33	1,22	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42
2-metilbutanojska kislina	2,56	13,97	8,10	11,72	10,96	11,28	12,93	12,67	12,98	11,77	17,24	13,94	30,15	7,20	7,21	17,60	11,57	17,30	20,58	6,59	12,33
1-heksanol	373,10	387,75	216,53	194,23	126,51	80,96	52,21	57,37	30,45	21,62	13,64	11,71	7,99	4,46	2,55	2,08	1,41	0,84	0,63	0,00	63,34
Izoamilacetat	14,35	11,55	2,18	0,39	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,74
2-metilbutilacetat	3,60	3,13	0,37	0,32	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62
stiren	4,23	2,63	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-heptanol	7,68	7,18	3,43	2,20	1,22	0,60	0,37	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83
metilheksanoat	0,87	0,69	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
heksanojska kislina	1,16	2,26	1,15	1,55	1,41	1,59	1,99	2,04	1,94	1,98	2,62	1,90	5,98	0,67	1,09	2,62	1,55	2,66	3,06	0,90	1,79
etylheksanoat	21,50	13,91	3,56	1,13	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85
heksilacetat	4,69	3,20	0,86	0,28	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
fenilacetaldehid	0,07	0,10	0,07	0,10	0,11	0,12	0,12	0,15	0,18	0,17	0,19	0,23	0,33	0,12	0,16	0,19	0,16	0,19	0,22	0,12	0,14
1-oktanol	0,48	0,42	0,46	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
linaloloksid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etilsorbat	0,54	0,26	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-feniletanol	1,62	3,80	3,23	4,57	4,80	5,35	5,45	5,95	5,40	5,28	6,73	6,20	12,26	2,50	3,91	8,59	6,14	8,04	9,56	4,21	5,10
izoamil-2-metilbutanoat	0,32	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-etilfenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
metiloktanoat	1,38	0,96	0,25	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-vinilanisol (4-metoksistiren)	18,44	18,37	6,81	3,96	2,37	1,50	1,17	1,09	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58
4-etilfenol	0,25	0,27	0,19	0,26	0,20	0,23	0,26	0,25	0,24	0,24	0,34	0,25	0,62	0,15	0,15	0,37	0,22	0,35	0,43	0,13	0,23
etilbenzoat	0,49	0,53	0,27	0,20	0,14	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08

oktanojska kislina	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?		
dietilsukcionat	1,02	0,95	0,39	0,26	0,19	0,13	0,14	0,15	0,16	0,12	0,16	0,08	0,28	0,05	0,04	0,14	0,08	0,13	0,13	0,00	0,18
kreozol (2-metoksi-4-metilfenol)	0,40	0,61	0,41	0,45	0,39	0,39	0,45	0,47	0,44	0,36	0,58	0,42	1,03	0,36	0,22	0,61	0,32	0,52	0,62	0,18	0,40
etiloktanoat	49,97	31,97	7,22	3,52	1,50	1,32	1,11	0,95	0,68	0,38	0,38	0,31	0,12	0,10	0,17	0,14	0,10	0,10	0,00	0,00	1,71
karveol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
metilnonanoat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etil-2-oktenoat	38,79	32,71	9,30	6,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,17
2-feniletilacetat	0,69	0,68	0,41	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
metildekanoat	1,65	0,85	0,16	0,11	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,10
etilhidrocinamat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
dekanjska kislina	39,10	5,93	3,60	2,67	3,05	0,13	2,82	3,23	2,89	2,42	2,99	2,15	4,54	2,38	2,48	3,22	2,53	2,24	2,79	2,75	3,11
etildekanoat	103,75	37,58	5,28	3,75	0,89	1,77	1,68	1,82	1,52	0,47	0,53	0,50	0,30	0,34	0,35	0,42	0,26	0,23	0,16	0,16	1,87
etil-2-deenoat	11,45	4,44	0,61	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42
etil-trans-2-cis-4-dekadienoat	3227,27	1087,83	106,32	85,38	23,72	45,77	43,32	57,91	37,50	13,15	15,25	15,36	11,07	11,03	10,17	12,88	8,88	6,81	6,51	6,01	34,53
metildodekanoat	0,86	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etildodekanoat	37,78	7,66	0,39	0,31	0,00	0,19	0,17	0,17	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18
etil tetradekanoat	8,14	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela XIX: Koncentracije spojin s t_r, većim od 5 min, pridobljene s serijo 2.

spojina	0,05 (1)	1,0 L (2)	3,5 L (3)	7,0 L (4)	10,0 L (5)	zdr. fr. (32)
heksanal	1,67	1,93	0,00	0,00	0,00	0,00
etilbutirat	36,41	3,98	0,37	0,61	0,00	0,53
etillaktat	18,59	13,40	7,78	12,87	168,86	29,67
butilacetat	22,13	6,99	?	?	?	1,14
furfural	0,00	0,48	2,39	21,13	62,00	9,72
etil-2-metilburanoat	23,80	2,11	0,00	0,00	0,00	0,42
2-metilbutanojska kislina	6,40	11,76	11,98	13,67	9,96	11,68
1-heksanol	463,05	355,02	74,52	22,06	2,49	52,63
Izoamilacetat	37,92	7,34	0,00	0,00	0,00	0,63
2-metilbutilacetat	8,28	2,42	0,00	0,00	0,00	0,14
stiren	14,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-heptanol	11,62	5,62	0,44	0,00	0,00	0,56
metilheksanoat	2,44	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
heksanojska kislina	8,50	1,40	1,50	1,90	4,41	1,52
etilheksanoat	58,78	6,63	0,00	0,00	0,00	0,84
heksilacetat	12,24	1,68	0,00	0,00	0,00	0,20
fenilacetaldehid	0,07	0,07	0,18	0,24	0,35	0,14
1-oktanol	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
linaloloksid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etilsorbat	0,34	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00
2-feniletanol	2,04	3,00	4,59	4,76	11,20	4,51
izoamil-2-metilbutanoat	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-etilfenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
metiloktanoat	3,35	0,64	0,00	0,00	0,00	0,00
4-vinilanisol (4-metoksistiren)	39,39	13,71	1,24	0,00	0,00	1,43
4-etilfenol	0,58	0,31	0,29	0,36	0,60	0,21
etilbenzoat	0,82	0,52	0,11	0,00	0,00	0,00
oktanojska kislina	?	?	?	?	?	?
dietilsukcionat	1,91	0,72	0,14	0,00	0,00	0,18
kreozol (2-metoksi-4-metilfenol)	0,27	0,52	0,52	0,63	0,88	0,40
etiloctanoat	301,80	22,64	1,29	0,41	0,34	3,01
karveol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
metilnonanoat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etil-2-oktenoat	65,14	20,97	0,00	0,00	0,00	2,75
2-fenilettilacetat	0,79	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
metildekanoat	3,16	0,58	0,04	0,00	0,00	0,00
etilhidrocinamat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
dekanjska kislina	30,54	4,32	2,21	2,18	3,38	3,38
etildekanoat	163,76	22,78	1,45	0,73	0,32	4,80
etil-2-decanoat	9,88	1,68	0,00	0,00	0,00	0,42
etil-trans-2-cis-4-dekadienoat	3236,39	435,55	34,34	21,11	8,58	51,73
metildodekanoat	1,39	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
etildodekanoat	181,60	2,02	0,12	0,00	0,00	0,39
etil tetradekanoat	28,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

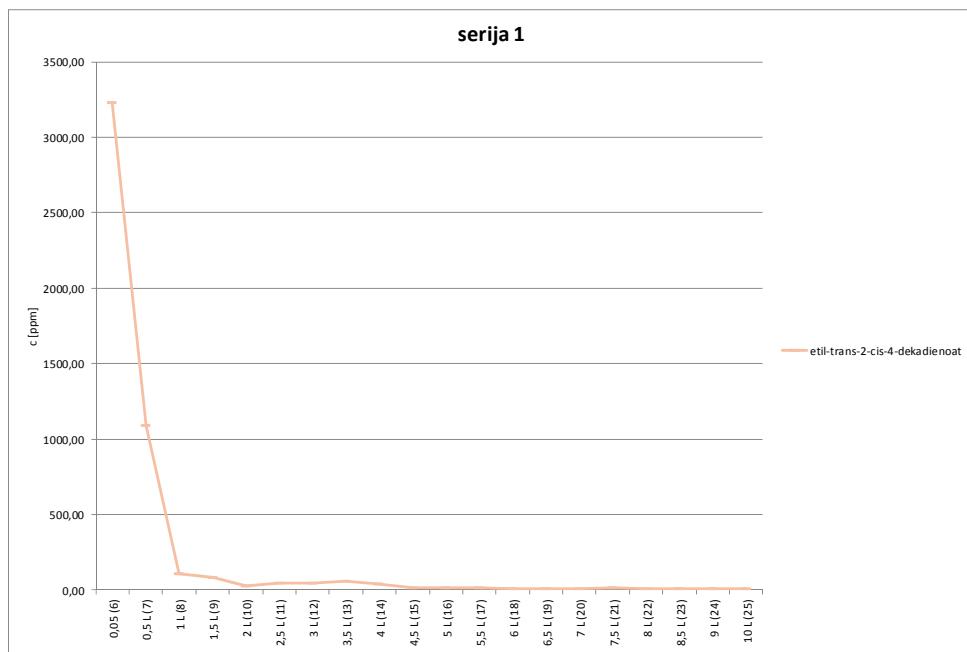
Tabela XX: Koncentracije spojin s t_r , većim od 5 min, pridobljene s serijom 3.

spojina	0,05 (26)	1,0 L (27)	3,5 L (28)	7,0 L (29)	10,0 L (30)	zdrav. fr. (33)
heksanal	2,65	3,18	0,00	0,00	0,00	1,55
etilbutirat	26,43	6,47	1,19	0,00	0,00	0,32
etillaktat	16,54	32,61	60,60	88,20	251,65	8,35
butilacetat	15,75	5,76	?	?	?	0,36
furfural	0,73	1,03	4,77	18,11	78,28	8,08
etil-2-metilburanoat	16,95	3,01	0,00	0,00	0,00	0,00
2-metilbutanojska kislina	2,96	19,40	20,67	22,43	19,51	12,16
1-heksanol	455,48	378,51	136,32	13,99	0,77	122,70
Izoamilacetat	31,33	7,56	0,21	0,00	0,00	0,00
2-metilbutilacetat	6,76	1,95	0,18	0,00	0,00	0,00
stiren	9,60	1,19	0,00	0,00	0,00	0,00
2-heptanol	9,73	6,55	0,95	0,13	0,00	1,14
metilheksanoat	1,74	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
heksanojska kislina	1,20	3,12	4,60	3,20	6,65	1,39
etilheksanoat	44,75	8,53	0,49	0,00	0,00	0,33
heksilacetat	9,68	1,95	0,00	0,00	0,00	0,00
fenilacetaldehid	0,07	0,11	0,24	0,39	0,41	0,16
1-oktanol	0,92	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00
linaloloksid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etilsorbat	0,27	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00
2-feniletanol	2,18	5,13	7,36	9,06	15,97	3,55
izoamil-2-metilbutanoat	0,69	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
2-etilfenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
metiloktanoat	3,14	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00
4-vinilanisol (4-metoksistiren)	26,97	13,31	2,33	0,00	0,00	1,30
4-etilfenol	0,37	0,38	0,39	0,40	0,81	0,24
etilbenzoat	0,60	0,43	0,15	0,00	0,00	0,10
oktanojska kislina	?	?	?	?	?	?
dietilsukcionat	1,41	0,83	0,35	0,25	0,34	0,18
kreozol (2-metoksi-4-metilfenol)	0,54	0,77	0,74	0,65	1,28	0,59
etiloctanoat	138,28	27,20	2,35	0,54	0,17	1,09
karveol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
metilnonanoat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
etil-2-oktenoat	68,49	16,55	0,00	0,00	0,00	2,14
2-fenilettilacetat	0,69	0,62	0,43	0,00	0,00	0,40
metildekanoat	3,73	0,77	0,10	0,00	0,00	0,00
etilhidrocinamat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
dekanjska kislina	128,42	11,11	5,73	4,27	5,21	3,83
etildekanoat	183,65	28,37	3,37	0,97	0,27	1,73
etil-2-decanoat	25,29	2,07	0,54	0,00	0,00	0,00
etil-trans-2-cis-4-dekadienoat	4240,15	519,00	60,91	22,42	7,85	45,48
metildodekanoat	2,17	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00
etildodekanoat	113,60	3,26	0,36	0,11	0,00	0,16
etil tetradekanoat	39,86	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00

Iz rezultatov lahko razberemo, da so spojine s t_r , večjim od 5 min, prisotne v zelo majhnih koncentracijah. Med njimi v vseh treh serijah izstopata 1-heksanol, in etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoat, v prvih dveh serijah pa tudi etillaktat. Slednje imajo koncentracije mnogo višje od ostalih prisotnih spojin.

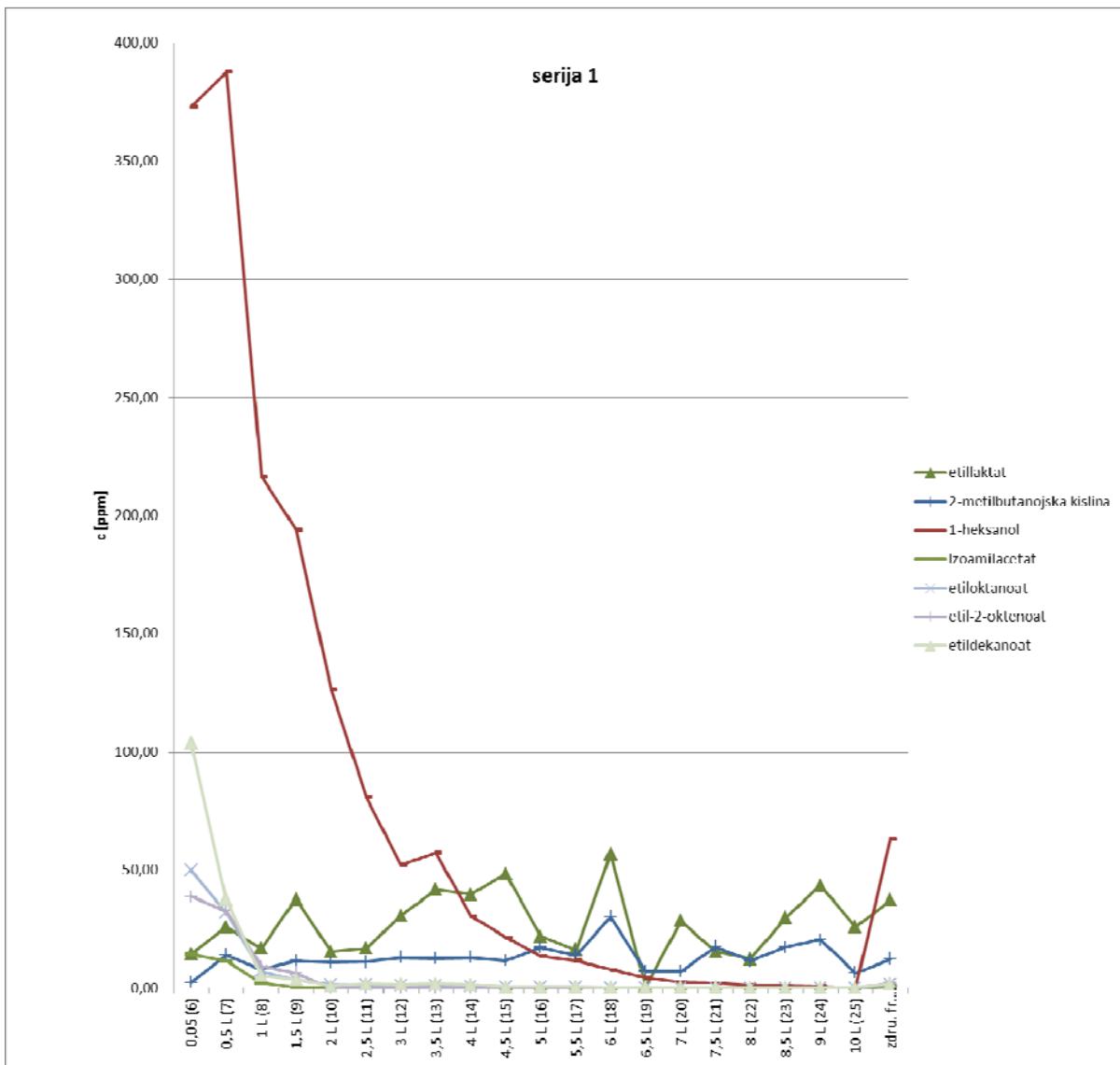
Ker nas je zanimal profil destilacije spojin, smo pridobljene koncentracije v frakcijah predstavili v grafu. V graf smo nanašali koncentracije v ppm v odvisnosti od frakcije destilata. Zaradi boljše preglednosti predstavljamo graf le za nekatere spojine, ki prikazujejo profil destilacije za vse spojine, etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoat pa smo zaradi višje koncentracije predstavili v ločenem grafu.

Na grafu 5 je prikazan profil destilacije etil *trans*-2, *cis*-4-dekadienoata, ki med spojinami v tem delu spektra doseže najvišjo koncentracijo (vzorec 26). Koncentracija je v prvih frakcijah izredno visoka, nato pa naglo pade, zaradi česar v vzorcu združenih frakcij ni zaznavne tako velike razlike. Ti podatki kažejo, da je prva frakcija, ki smo jo zavrgli najbolj bogata z etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoatom, ki je glavna spojina arome hruške.



Graf 5: Profil destilacije etil *trans*-2, *cis*-4-dekadienoata.

Podoben profil destilacije ima tudi večino ostalih spojin s t_r , večjim od 5 min. Po profilu, po katerem destilirata, izstopata etillaktat in 2-metilbutanojska kislina, ki destilirata precej enakomerno preko cele destilacije.



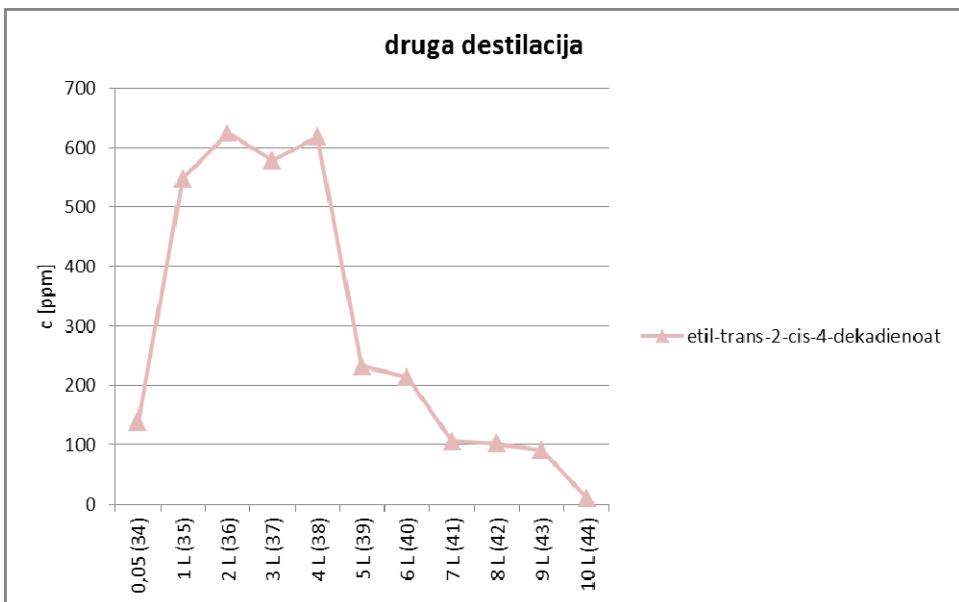
Graf 6: Profil destilacije nekaterih spojin.

Kljub temu, da smo uspeli kvantificirati večino spojin s tr, večjim od 5 minut, smo bili pri kvantifikaciji nekaterih spojin neuspešni. Ker nismo imeli na voljo dovolj čistega standarda, nismo uspeli kvantificirati farnezena. Poleg farnezena nismo mogli kvantificirati tudi oktanojske kisline, saj se je njen vrh prekrival z vrhom dietilsukcinata. Samo delno pa smo uspeli kvantificirati butilacetat. V določenih vzorcih smo butilacetat identificirali in kvantificirali, medtem, ko ga v drugih nismo mogli identificirati. Odkrili smo, da je za tako obnašanje odgovoren etillaktat. Opazili smo namreč, da butilacetata nismo mogli kvantificirati v frakcijah, v katerih je narastla koncentracija etillaktata. Razlog je v repu, ki ga ob višjih koncentracijah za vrhom tvori etillaktat in tako pride do prekrivanja z butilacetatom.

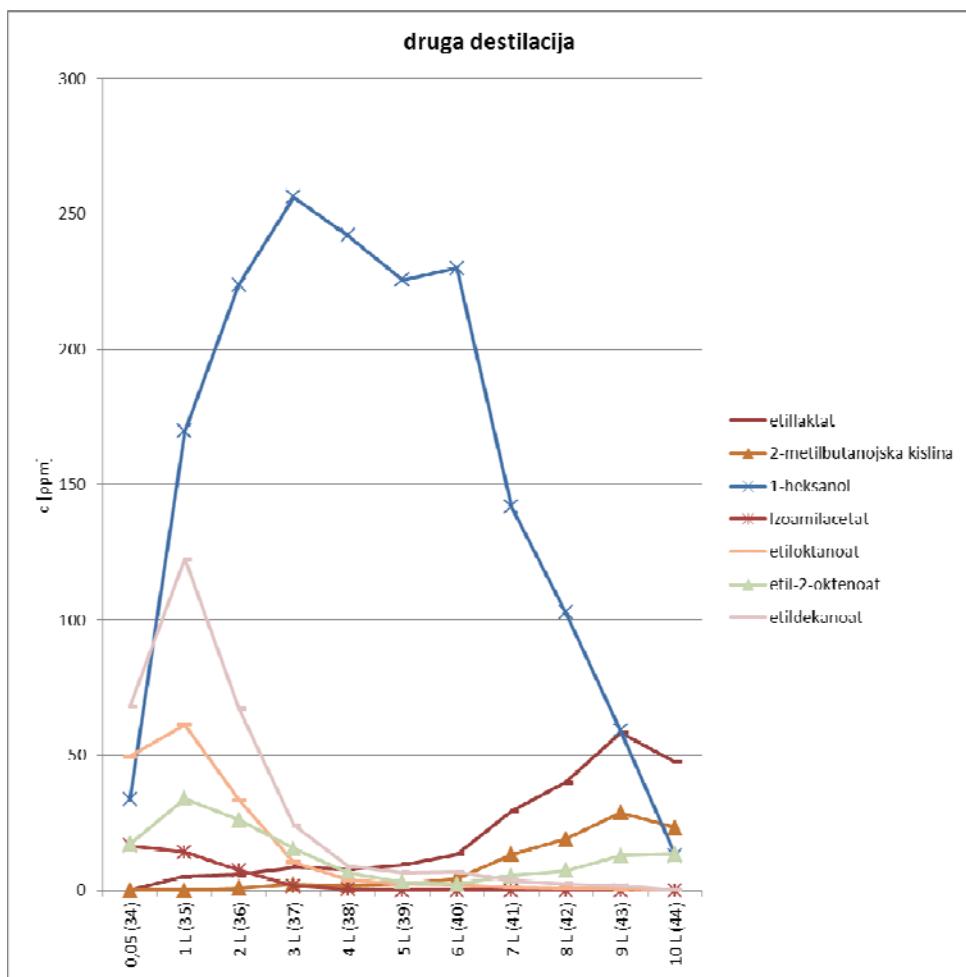
Tabela XXI: Koncentracije spojin s t_r većim od 5 min, pridobljene z drugo destilacijo.

spojina	0,05 (34)	1 L (35)	2 L (36)	3 L (37)	4 L (38)	5 L (39)	6 L (40)	7 L (41)	8 L (42)	9 L (43)	10 L (44)	zdru. fr. (45)
heksanal	5,34	3,26	2,19	0,89	0	0	0	0	0	0	0	0
etilbutirat	23,44	14,32	6,17	1,71	0,37	0	0	0	0	0	0	0,67
etillaktat	0,27	5,16	5,82	8,58	7,93	9,56	13,44	29,27	39,99	58,44	47,46	16,23
butilacetat	10,98	8,6	4,85	2,06	0,91	0,45	?	?	?	?	?	1,18
furfural	3,55	10,69	12,31	14,48	14,5	16,84	19,19	24,04	28,69	28,52	18,51	16,12
etil-2-metilburanoat	14,61	7,59	2,74	0,64	0	0	0	0	0	0	0	0,34
2-metilbutanojska kislina	0	0	0,86	2,33	1,85	2,47	4,32	13,4	18,99	28,83	23,12	6,42
1-heksanol	33,72	169,61	223,81	256,24	242,05	225,64	230,03	141,73	102,76	59,1	12,95	156,85
Izoamilacetat	16,57	14,18	7,37	1,7	0,56	0	0	0	0	0	0	0,71
2-metilbutilacetat	3,72	2,98	6,22	1,42	0,47	0	0	0	0	0	0	0,14
stiren	13,5	3,6	0,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-heptanol	1,05	4,04	4,68	4,78	3,79	3,01	1,82	0,79	0,43	0,41	0	1,81
metilheksanoat	0,94	0,89	0,48	0,18	0	0	0	0	0	0	0	0
heksanojska kislina	0	0	0	0	0	0	0	0,62	1,87	3,59	4,14	0
etilheksanoat	19,82	19,49	9,31	2,72	0,88	0,48	0,37	0	0	0	0	1,16
heksilacetat	3,39	4,26	2,33	0,8	0,27	0,21	0	0	0	0	0	0,3
fenilacetaldehid	0	0,07	0,06	0,12	0,1	0,12	0,15	0,29	0,34	0,44	0,32	0,14
1-oktanol	0	0	0	0	0,54	0,4	0,51	0	0	0	0	0
linaloloksid	0	0	0,26	0,29	0,37	0,57	0,65	0,78	0,87	0,78	0,35	0,39
etilsorbat	0	0,33	0,35	0,35	0,27	0	0	0	0	0	0	0
2-feniletanol	0	0	0,15	0,23	0,15	0,25	0,38	1,43	2,49	4,34	5,73	0,61
izoamil-2-metilbutanoat	0,36	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-etilfenol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
metiloktanoat	1,06	1,44	0,85	0,34	0,14	0	0	0	0	0	0	0,15
4-vinilanisol (4-metoksistiren)	6,52	16,05	16,15	12,75	8,8	5,15	3,23	1,4	0,86	0,49	0	4,34
4-etilfenol	0	0	0	0	0	0	0	0,18	0,28	0,45	0,45	0,09
etilbenzoat	0	0,26	0,3	0,33	0,33	0,29	0,25	0,16	0,12	0,06	0	0,2

oktanojska kislina	0,13	0,52	0,46	0,28	0,15	0,07	0,04	0,19	0,36	0,68	0,56	0,18
dietilsukcionat	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
kreozol (2-metoksi-4-metilfenol)	0	0	0	0	0	0	0,24	0,63	1,02	1,33	1,2	0,33
etiloktanoat	49,54	61,28	33,44	10,55	3,86	2,44	2,17	1,22	0,9	0,74	0,17	4,56
karveol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
metilnonanoat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
etil-2-oktenoat	17,27	33,92	26,12	15,45	6,67	3,03	2,27	5,54	7,31	12,96	13,58	5,28
2-feniletilacetat	0	0	0	0	0	0,44	0,55	0,74	0,84	0,76	0	0,48
metildekanoat	1,08	1,64	1,12	0,5	0,19	0,14	0,12	0,1	0,09	0	0	0,23
etilhidrocinamat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dekanjska kislina	2,58	2,19	2,48	4,68	5,85	6,06	5,13	11,51	15,57	19,95	14,6	5,37
etildekanoat	67,96	122,53	67,26	24,23	9,04	6,69	6,74	3,78	2,48	1,73	0,22	10,74
etil-2-deenoat	2,14	5,49	5,69	4,43	1,64	0,65	0,49	0,48	0,42	0,36	0	1,19
etil- <i>trans</i> -2- <i>cis</i> -4-dekadienoat	138,34	546,88	623,84	577,38	617,93	232,1	212,85	105,87	101,96	90,53	10,13	294,82
metildodekanoat	0,21	0,57	0,37	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0,1
etildodekanoat	5,38	21,15	14,04	6,85	2,34	1,31	1,42	0,92	0,69	0,44	0	2,44
etiltetradekanoat	0,21	1,14	1,1	0,82	0,34	0,2	0,2	0,11	0,11	0	0	0,29



Graf 7: Profil destilacije etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoata pri drugi destilaciji



Graf 8: Profil destilacije nekaterih spojin s t_r večjim od 5 min pri drugi destilaciji

Na grafih 7 in 8 so predstavljeni profili nekaterih spojin, ki predstavljajo profil večine. Opazili pa smo iz vidika arome pomembno odstopanje. 1-heksanol in etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoat imata pri drugi destilaciji popolnoma drugačen profil destilacije. Koncentracija v prvih frakcijah naglo raste in doseže svoj maksimum nekje na polovici destilacije. Proti koncu destilacije nato koncentracija v frakcijah ponovno pada. Če smo pri prvi destilaciji frakcijo z največjo koncentracijo etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoata zavrgli, je pri drugi destilaciji najvišja koncentracija ravno v frakcijah, ki jih zbiramo. Nadalje pa koncentracija do zadnje frakcije, ki jo zavrzemo, ponovno pade.

Iz naših rezultatov sledi, da je za najvišjo koncentracijo etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoata v končnem proizvodu je treba v prvi destilaciji zbirati vse frakcije. Pri drugi destilaciji pa prvo lahko prvo frakcijo brez izgub zavrzemo.

4.3.2.2. Analiza spojin s t_r , manjšim od 5 min

Koncentracije v tabelah so podane v ppm. Spojine, ki v določeni frakciji ni bilo prisotne, imajo v tej frakciji zabeleženo koncentracijo 0 ppm. Spojine so v tabelah navedene po naraščajočem t_r .

Tabela XXII: Koncentracije spojin s t_r , manjšim od 5 min, za vzorce pridobljene z destilacijo v seriji 1.

spojina	0,05 (6)	0,5 L (7)	1 L (8)	1,5 L (9)	2 L (10)	2,5 L (11)	3 L (12)	3,5 L (13)	4 L (14)	4,5 L (15)	5 L (16)	5,5 L (17)	6 L (18)	6,5 L (19)	7 L (20)	7,5 L (21)	8 L (22)	8,5 L (23)	9 L (24)	10 L (25)	zdru. fr. (31)
metanol	11765,56	10525,51	7834,76	7265,73	6667,01	6411,43	5892,10	5294,03	5051,83	4438,55	4633,52	4037,72	2987,82	2900,18	2680,52	2789,48	2527,44	1871,11	1583,94	1243,33	4501,58
aceton	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	141,48	81,27	88,97	?
metilacetat	1108,39	1389,08	702,21	379,92	174,40	110,21	57,52	35,70	16,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,22
1-Propanol	483,84	450,87	299,31	244,65	196,97	171,11	144,74	116,65	92,86	74,51	71,93	52,66	31,32	25,34	22,03	18,87	16,33	0,00	0,00	0,00	84,05
ocetna kislina	162,08	325,05	457,66	444,90	405,61	418,27	366,20	409,49	278,28	349,42	364,82	325,11	224,64	219,22	281,08	236,77	306,78	258,29	238,47	211,61	326,18
etilacetat	5528,73	6509,85	2755,03	1230,87	465,16	254,79	115,21	63,11	33,88	23,56	18,94	15,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	375,07
2-metil-1-propanol	910,88	842,96	500,93	359,27	246,87	196,78	138,90	96,63	70,36	45,00	36,19	24,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	89,93
1-butanol	405,77	400,57	248,25	190,52	144,18	120,22	95,42	69,22	52,83	38,16	32,61	26,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,32
3-metil-1-butanol	2112,36	2073,18	1205,61	857,76	588,88	459,07	314,62	220,62	154,51	95,65	78,86	42,80	26,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	212,30
2-metil-1-butanol	524,92	496,49	290,83	195,49	143,19	102,75	71,10	43,45	26,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	49,94

Tabela XXIII: Koncentracije spojin s t_r , manjšim od 5 min, za vzorce pridobljene z destilacijo v seriji 2.

spojina	0,05 (1)	1,0 L (2)	3,5 L (3)	7,0 L (4)	10,0 L (5)	zdrui. fr. (32)
metanol	14097,22	9532,71	7177,02	5991,46	2766,59	4455,44
aceton	?	?	?	?	149,30	?
metilacetat	2207,02	1156,04	81,02	0,00	0,00	84,16
1-Propanol	566,21	462,75	193,23	99,95	0,00	79,46
ocetna kislina	140,78	603,60	512,18	590,97	448,11	197,30
etilacetat	11853,73	5196,20	204,31	43,19	49,33	329,93
2-metil-1-propanol	1247,25	806,61	190,10	52,27	0,00	79,67
1-butanol	549,28	410,61	129,75	50,62	0,00	50,24
3-metil-1-butanol	2936,85	1939,15	447,58	116,97	0,00	176,66
2-metil-1-butanol	731,31	463,28	103,41	0,00	0,00	40,78

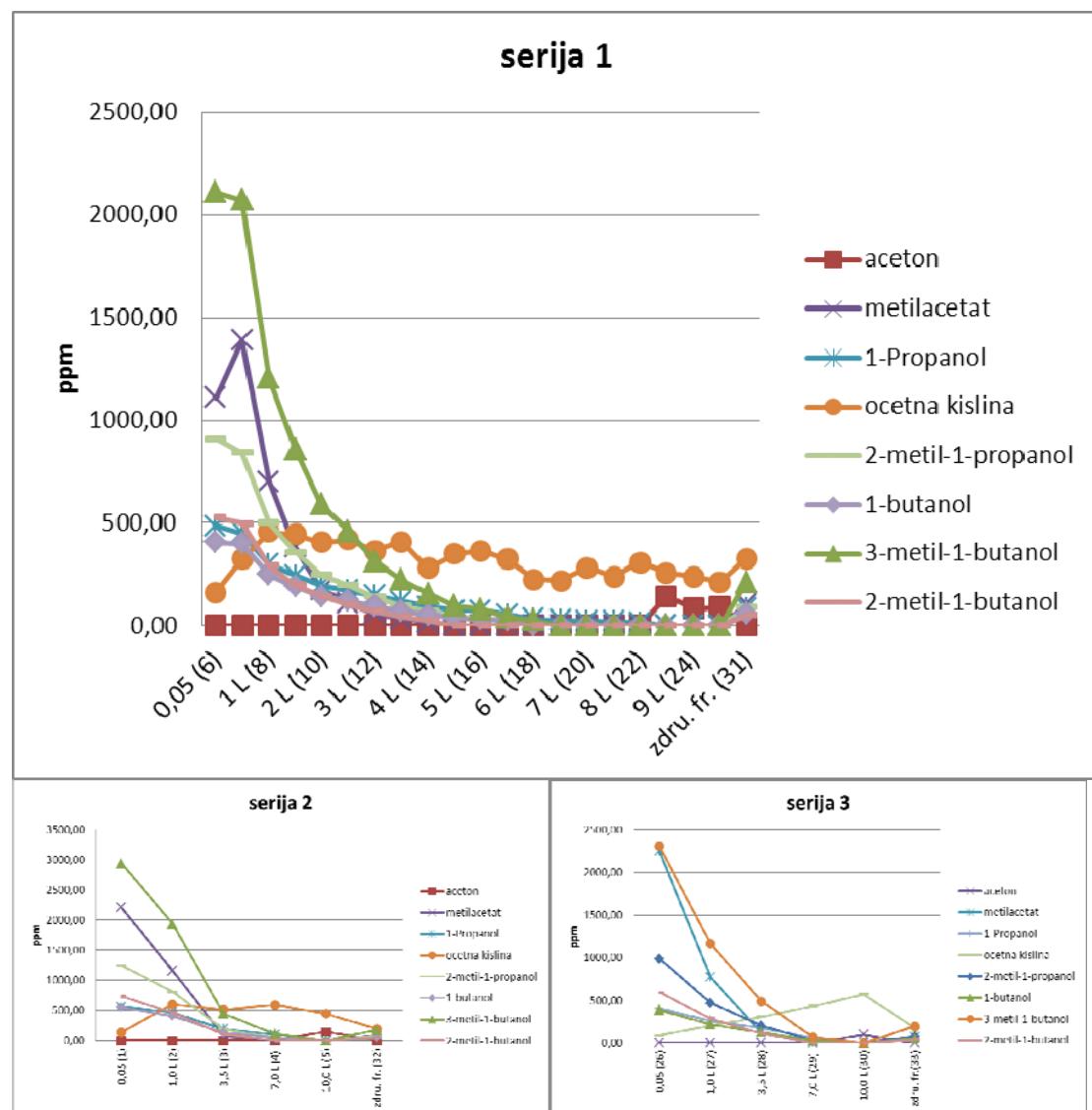
Tabela XXIV: Koncentracije spojin s t_r , manjšim od 5 min, za vzorce pridobljene z destilacijo v seriji 3.

spojina	0,05 (26)	1,0 L (27)	3,5 L (28)	7,0 L (29)	10,0 L (30)	zdrui. fr.(33)
metanol	10120,32	7462,57	6349,46	4570,87	1612,55	4779,62
aceton	?	?	?	?	99,38	?
metilacetat	2245,31	770,74	119,73	0,00	0,00	66,73
1-Propanol	405,86	258,08	176,53	61,64	0,00	80,95
ocetna kislina	90,27	207,82	305,24	431,93	571,86	179,59
etilacetat	12247,70	3365,31	313,00	39,57	0,00	232,60
2-metil-1-propanol	988,60	468,57	203,80	29,19	0,00	77,52
1-butanol	385,46	220,76	125,06	29,94	0,00	50,28
3-metil-1-butanol	2307,10	1162,13	489,16	71,36	0,00	195,17
2-metil-1-butanol	596,74	285,40	113,48	0,00	0,00	41,30

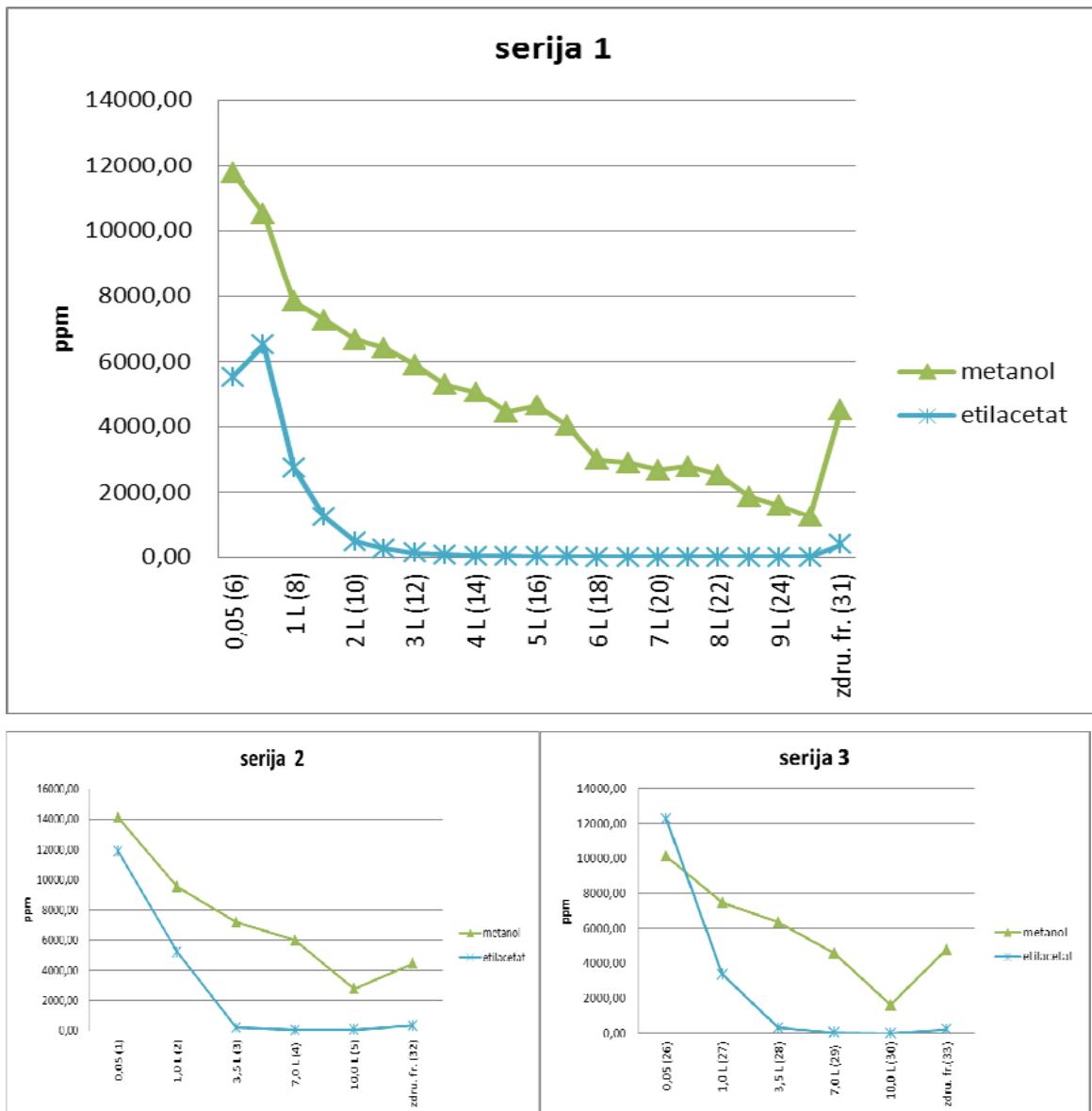
S primerjavo rezultatov kvantitativne analize med tremi serijami destilacije lahko ugotovimo, da so bile izvedene destilacije spojin zelo ponovljive. Pri vseh treh serijah so v združenih frakcijah v največji koncentraciji prisotni etilacetat, 3-metil-1-butanol in ocetna kislina. Ponovno nas je zanimal profil destilacije posameznih spojin. Ker je etilacetat prisoten v precej višji koncentraciji, smo zaradi boljše preglednosti profil destilacije etilacetata predstavili v ločenem grafu.

Iz grafov vseh treh serij (graf 9) se lepo vidi profil destilacije, ki se med serijami ujema. Razlika med serijo 1 in ostalima dvema serijama je le v začetnem delu grafa, kjer je pri 3-metil-1-butanolu in metilacetatu le pri seriji 1 vidno, da koncentracija iz 1 na drugo frakcijo najprej naraste nato pa pada. Vzrok te razlike je v manj pogostem zbiranju frakcij v serijah 2 in 3 zaradi česar so bili volumni frakcij večji in so zakrili to podrobnost. Najbolj natančen profil destilacije torej predstavlja serija 1.

Večina spojin s t_r , manjšim od 5 min, destilira po enakem profilu: iz prve na drugo frakcijo koncentracija v manjši meri naraste nato pa precej naglo pade proti nič. Ta podobnost profilov med spojinami, predstavljenimi v grafih 9 in 10, je logična, saj gre za enostavne alifatske alkohole s podobno molsko maso in molekulsko formulo. Izjema je ocetna kislina, katere koncentracija skozi prve frakcije narašča, ko pa doseže plato pa se skozi destilacijo ne spreminja.

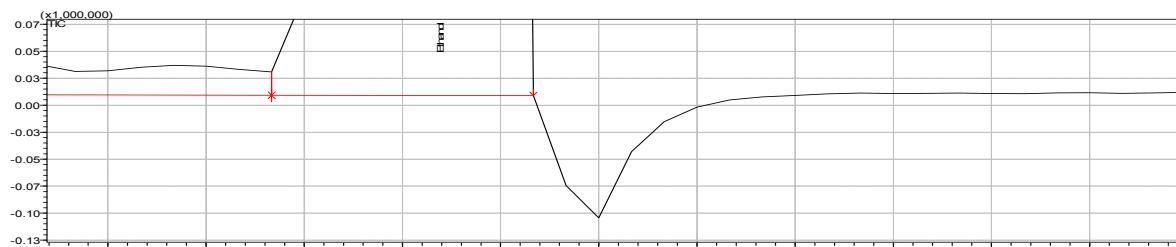


Graf 9: Profil destilacije spojin s t_r , manjšim od 5 min.



Graf 10: Profil destilacije etil acetata.

Tudi v tej skupini nismo uspeli kvantificirati vseh spojin. Neuspešni smo bili pri kvantifikaciji acetona, ker ima t_r zelo podoben t_r -ju etanola. Ker je bil etanol v vzorcih prisoten v visokih koncentracijah, se je detektor pri t_r etanola zasitol. Posledica zasičenja, ki jo opazimo na kromatogramu, je prehod bazne linije za vrhom, ki je zasitol detektor, v negativno (slika 20). Ta prehod nam je zakril vrh acetona, ki ga posledično nismo mogli kvantificirati.

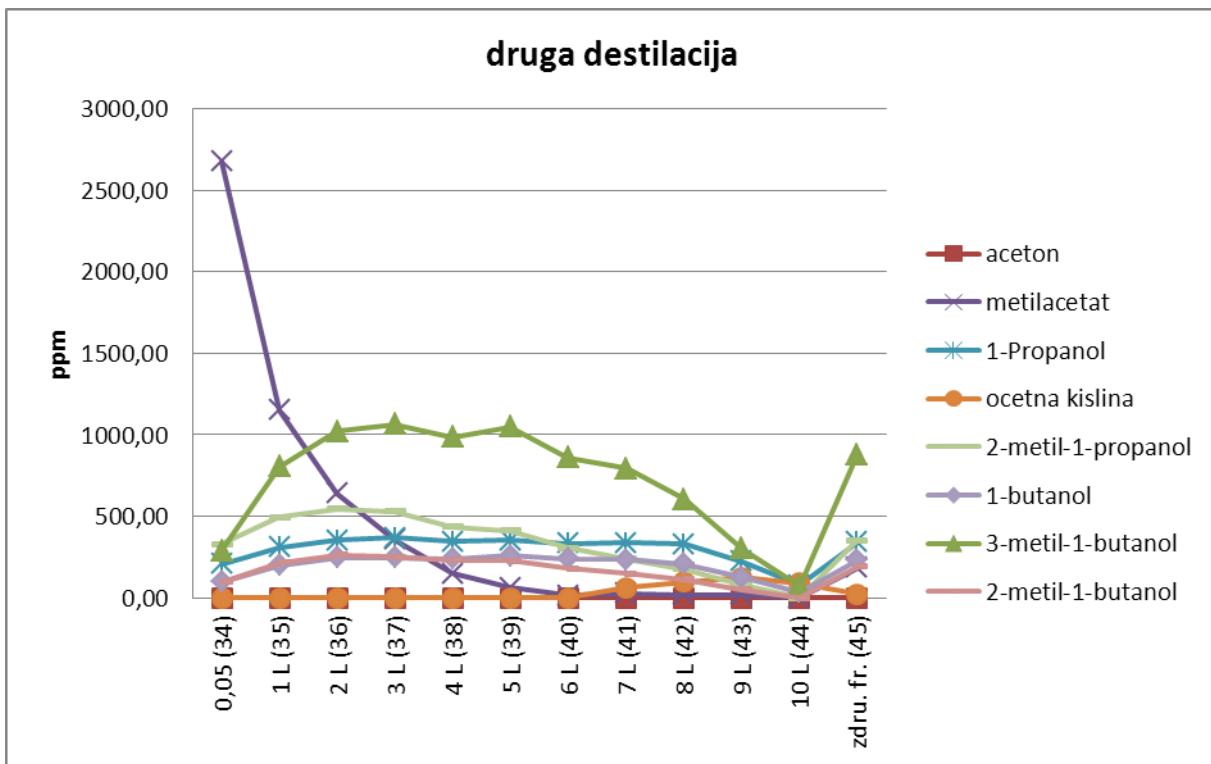


Slika 20: Izsek kromatograma kjer gre zaradi zasičenega detektorja, bazna linija v negativno.

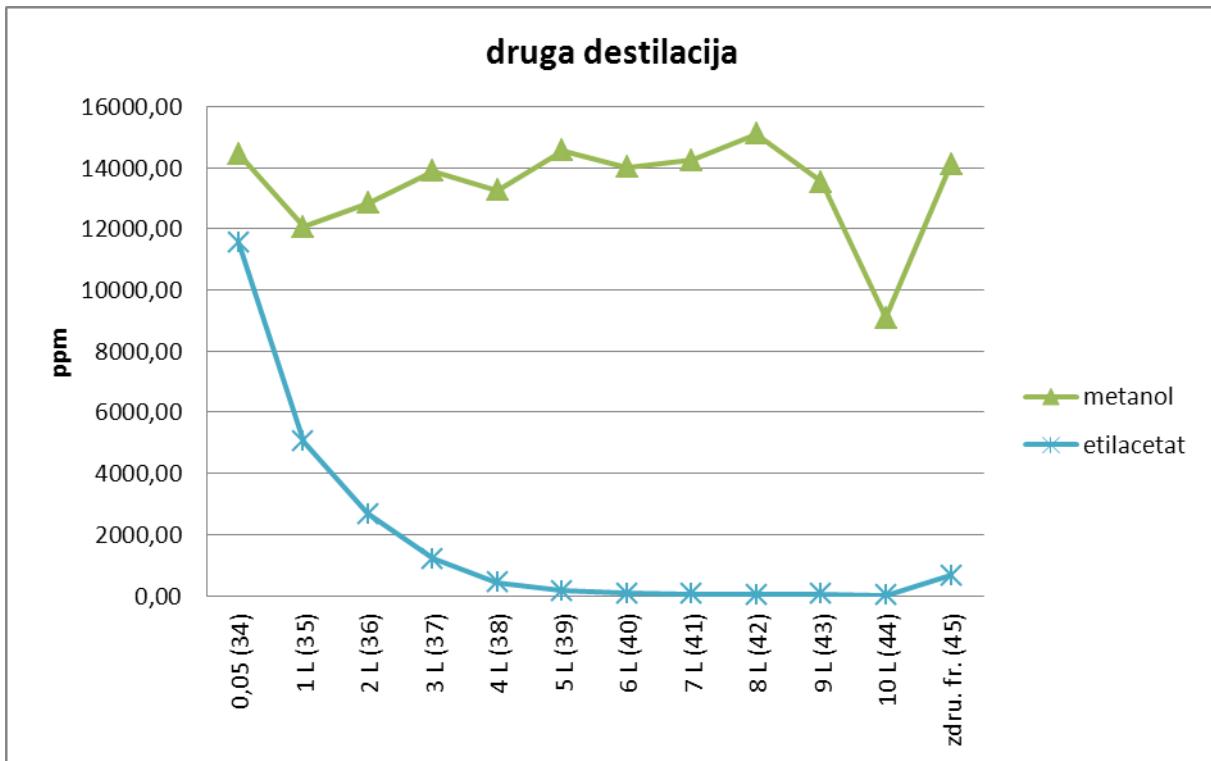
Tabela XXV: Koncentracije spojin s t_r , manjšim od 5 min, za vzorce pridobljene z drugo destilacijo.

spojina	0,05 (34)	1 L (35)	2 L (36)	3 L (37)	4 L (38)	5 L (39)	6 L (40)	7 L (41)	8 L (42)	9 L (43)	10 L (44)	zdru. fr. (45)
metanol	14462,29	12067,63	12853,63	13901,96	13273,08	14561,59	14023,40	14256,27	15117,75	13537,33	9084,39	14128,74
aceton	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
metilacetat	2677,01	1150,19	637,95	357,55	147,43	61,68	16,26	24,46	20,01	17,25	0,00	183,65
1-Propanol	208,46	309,23	350,93	369,37	344,51	353,92	333,05	334,89	329,42	223,57	77,45	340,18
ocetna kislina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	63,47	95,35	125,16	90,75	22,12
etilacetat	11565,06	5035,93	2675,42	1212,91	425,02	159,72	82,40	48,60	42,74	53,68	13,63	656,57
2-metil-1-propanol	328,05	494,36	547,05	527,74	436,31	412,32	305,19	237,36	176,89	83,20	0,00	353,68
1-butanol	97,23	200,25	244,63	246,74	237,45	257,56	237,88	233,64	209,04	125,68	34,29	229,43
3-metil-1-butanol	288,74	804,03	1020,07	1062,87	987,34	1049,71	860,95	791,42	604,23	300,27	74,07	878,65
2-metil-1-butanol	95,38	214,22	260,68	250,90	232,49	227,09	178,12	147,24	113,89	51,37	0,00	190,08

V združenih serijah druge destilacije opazimo, da imata najvišjo koncentracijo ponovno 3-metil-1-butanol in etilacetat. Koncentracije so v primerjavi z združenimi frakcijami prve destilacije višje, kar pa je logično, saj smo z destilacijo dejansko opravili koncentracijo spojin. Če ponovno pogledamo profil destilacije spojin ugotovimo, da se je tudi v tej skupini spojin, večini profil destilacije, v primerjavi s prvo destilacijo, spremenil. Izjeme so metil- in etilacetat, ki sta destilirala po podobnem profilu, kot pri prvi destilaciji, in ocetna kislina, ki je bila prisotna šele v frakcijah druge polovice destilacije. Ostalim spojinam pa pri drugi destilaciji koncentracija raste do platoja, nato se nekaj frakcij koncentracija ne spreminja, v končnih frakcijah pa koncentracija počasi pada proti 0.



Graf 11: Profil destilacije spojin s t_r , manjšim od 5 min, pri drugi destilaciji.



Graf 12: Profil destilacije etil acetata pri drugi destilaciji.

4.3.2.3. Analiza etanola in metanola

Koncentracije v tabelah so podane v mg/mL. Spojine, ki v določeni frakciji niso bile prisotne, imajo v tej frakciji zabeleženo koncentracijo 0 mg/mL.

Tabela XXVI: Koncentracije etanola in metanola za vzorce pridobljene z destilacijo v seriji 1.

spojina	0,05 (6)	0,5 L (7)	1 L (8)	1,5 L (9)	2 L (10)	2,5 L (11)	3 L (12)	3,5 L (13)	4 L (14)	4,5 L (15)	5 L (16)	5,5 L (17)	6 L (18)	6,5 L (19)	7 L (20)	7,5 L (21)	8 L (22)	8,5 L (23)	9 L (24)	10 L (25)	zdr. fr. (31)
etanol	292,57	322,11	264,66	155,35	142,59	175,31	187,13	108,13	164,44	131,35	101,72	91,68	82,73	95,55	77,88	71,93	50,28	51,66	46,31	46,27	99,12
metanol	11,77	10,53	7,83	7,27	6,67	6,41	5,89	5,29	5,05	4,44	4,63	4,04	2,99	2,90	2,68	2,79	2,53	1,87	1,58	1,24	4,50

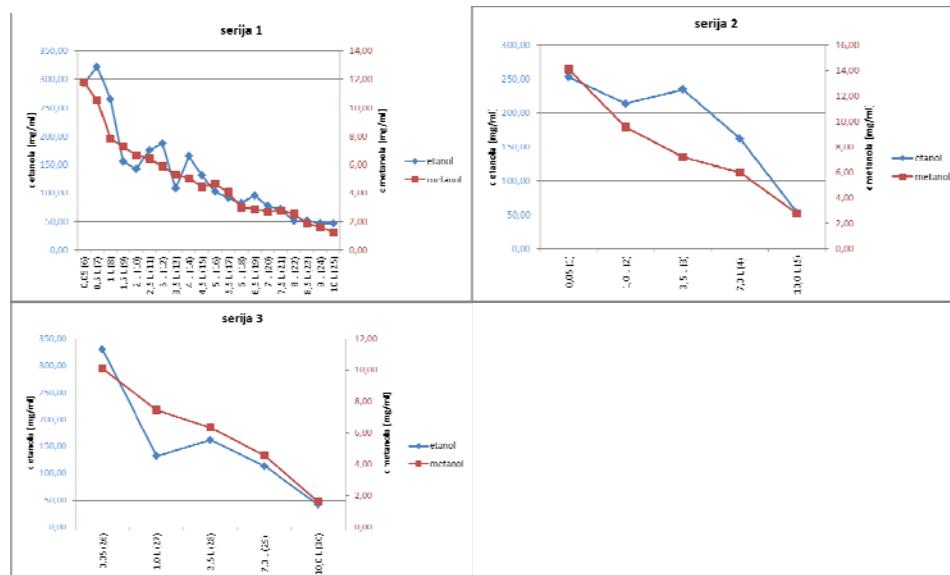
Tabela XXVII: Koncentracije etanola in metanola za vzorce pridobljene z destilacijo v seriji 2.

spojina	0,05 (1)	1,0 L (2)	3,5 L (3)	7,0 L (4)	10,0 L (5)	zdr. fr. (32)
etanol		252,82	213,43	234,27	161,79	53,03
metanol		14,10	9,53	7,18	5,99	2,77
						4,46

Tabela XXVIII: Koncentracije etanola in metanola za vzorce pridobljene z destilacijo v seriji 3.

spojina	0,05 (26)	1,0 L (27)	3,5 L (28)	7,0 L (29)	10,0 L (30)	zdr. fr. (33)
etanol		331,02	132,28	161,78	113,33	41,48
metanol		10,12	7,46	6,35	4,57	1,61
						4,78

Od vseh prisotnih spojin v vzorcu so bile koncentracije etanola pričakovano najvišje. Tudi metanol je bil prisoten v relativno visokih koncentracijah. Profil destilacije imata obe spojini podoben, in sicer so bile koncentracije najvišje v prvih dveh frakcijah, nato pa so dokaj linearno padale proti koncentraciji zadnje frakcije. Glede na nizko vrelišče obeh alkoholov je tak profil pričakovani. Metanol ima pri običajnem zračnem tlaku vrelišče pri 64,5 °C, etanol pa pri 78 °C. V grafu serije 1 se lepo vidi razlika med destilacijo etanola in metanola, ki je posledica razlike v vreliščih. Metanol zaradi nižjega vrelišča začne destilirat prej in zato koncentracija nato samo še pada, etanol pa je imel maksimalno koncentracijo šele v 2 frakciji.



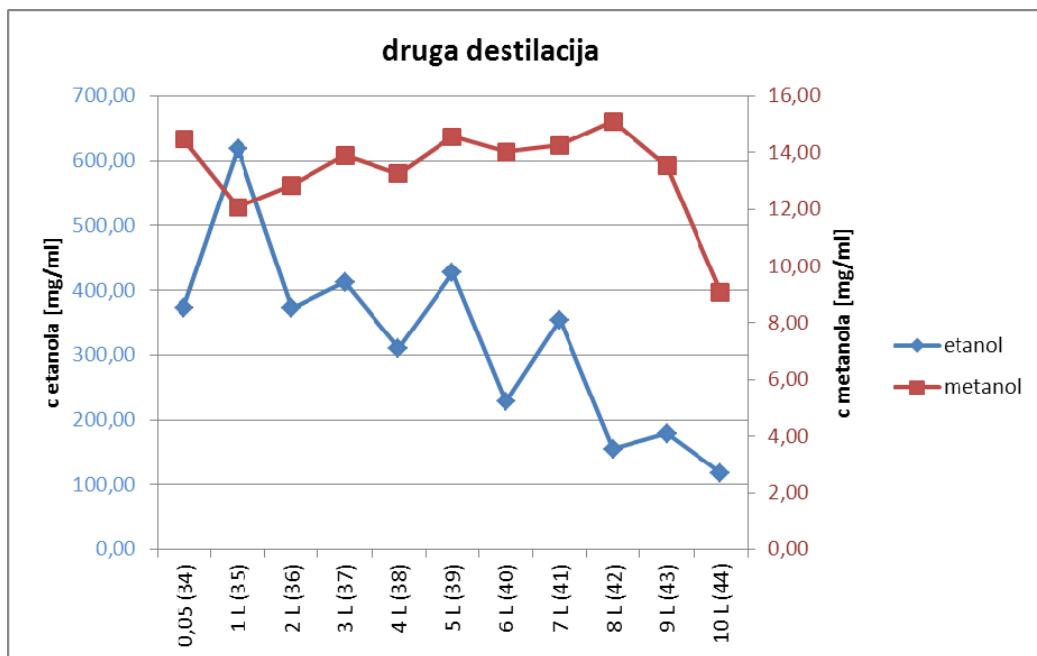
Graf 13: Profil destilacije etanola in metanola pri prvi destilaciji.

Tabela XXIX: Koncentracije etanola in metanola za vzorce pridobljene z drugo destilacijo.

spojina	0,05 (34)	1 L (35)	2 L (36)	3 L (37)	4 L (38)	5 L (39)	6 L (40)	7 L (41)	8 L (42)	9 L (43)	10 L (44)	zdru. fr. (45)
etanol	373,42	618,46	372,72	412,72	310,54	427,04	227,38	354,96	155,00	179,15	117,93	262,34
metanol	14,46	12,07	12,85	13,90	13,27	14,56	14,02	14,26	15,12	13,54	9,08	14,13

V primerjavi s prvo destilacijo se etanol destilira po enakem profilu kot pri prvi destilaciji. Koncentracija na začetku kratek čas narašča, nato pa linearno pada proti koncentraciji zadnje frakcije.

Zanimiv je profil destilacije metanola v drugi frakciji. Glede na temperaturo vrelišča in profil pri prvi destilaciji bi pričakovali, da bo metanol najvišjo koncentracijo dosegel v prvi frakciji, nato pa bo koncentracija naglo padla proti 0 mg/mL. Res je najvišjo koncentracijo ponovno dosegel že v prvi frakciji, vendar pa koncentracija nato ni padla, ampak je ostala približno enaka do predzadnje frakcije, ko je začela padati. Podobno obnašanje metanola pri destilaciji je za melonino žganje opisal Hernandez-Gomez, fenomen pa pripisal tvorbi azeotropne zmesi [31].



Graf 14: Profil destilacije etanola in metanola pri drugi destilaciji.

Pri analizi metanola smo ugotovili zelo visoke koncentracije metanola. Glede na uredbo Sveta Evrope (EGS) št. 1576/89 [34] je v sadnih žganjih najvišja dovoljena vsebnost metanola 1000 g/hL 100% etanola, kar je približno polovico manj kot smo ga ugotovili v naših vzorcih. Iz naših rezultatov bi lahko sklepali, da bi se najlažje metanola znebili z odstranjevanjem prvih frakcij pri prvi destilaciji. S tem pa bi odstranili tudi velik del etanola in aromatičnih spojin, kar bi močno vplivalo na končno aroma destilata, zato tak postopek ni najbolj uporaben.

Predvidevamo, da bi za zmanjšanje vsebnosti metanola morali zagotoviti, čim manjšo produkcijo le tega med alkoholnim vrenjem.

4.4. Ovrednotenje prispevka spojin k aromi in rekonstrukcija arome

Prispevek posamezne spojine k aromi smo ovrednotili z izračunom aktivnosti vonja (OAV). V tabeli so predstavljene spojine, ki smo jih uspešno kvantificirali ter njihove ATV vrednosti. Ker so ATV vrednosti subjektivne ocene, ima večina spojin interval ATV vrednosti. Aktivnosti vonja smo izračunali za tri vzorce, ki so se nam zdeli pomembni:

- Prva frakcija prve destilacije (vzorec 6),
- Združene frakcije prve destilacije (vzorec 31)
- Združene frakcije druge destilacije (vzorec 45)

Velja pravilo, da na aroma pomembno vpliva spojina, ki ima aktivnost vonja večjo od 10.

Glede na izračunane vrednosti smo ugotovili, da ima večina spojin prisotnih v aromi viljamovke visoko aktivnost vonja, kar potrjuje domnevo o kompleksnosti arome.

Našo raziskavo arome viljamovke smo zaključili s pripravo rekonstrukcije analizirane arome. Odločili smo se, da bomo rekonstrukcijo pripravili s spojinami, ki imajo pri vzorcu 45 aktivnost vonja večjo od 10. V tabeli 30 smo te spojine obarvali z rdečo.

Pripravili smo raztopino s koncentracijami, ki ustrezajo koncentracijam teh spojin v vzorcu 45. Pripravljeno rekonstrukcijo je senzorično ocenilo 5 sodelavcev na katedri. Vsi so vonj opisali kot izrazito sadni, večina pa jih je tudi hitro prepoznala vonj hruške. Ta rezultat potrjuje uspešno kvalitativno in kvantitativno analizo arome destilata hruške viljamovke.

Tabela XXX: aktivnost vonja za posamezne spojine. Vrednosti nad 10 so v krepkem tisku. Spojine uporabljene za rekonstrukcijo so v krepkem rdečem tisku.

t _r	spojina	OTV		c (6)	c (31)	c (45)	OAV (6)		OAV (31)		OAV (45)	
1.462	metanol	125	1200	11765,56	4501,58	14128,74	94,12	9,80	36,01	3,75	113,03	11,77
1.566	etanol	3,63	2000	292,57	99,12	262,34	80,60	0,15	27,31	0,05	72,27	0,13
1.736	metilacetat	1,5	47	1108,39	100,22	183,65	738,93	23,58	66,81	2,13	122,43	3,91
1.863	1-Propanol	N/A		483,84	84,05	340,18	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2.033	ocetna kislina	22	180	162,08	326,18	22,12	7,37	0,90	14,83	1,81	1,01	0,12
2.166	etilacetat	0,005	5	5528,73	375,07	656,57	1105746,00	1105,75	75014,00	75,01	131314,00	131,31
2.296	2-metil-1-propanol	0,55	2,3	910,88	89,93	353,68	1656,15	396,03	163,51	39,10	643,05	153,77
2.657	1-butanol	N/A		405,77	57,32	229,43	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3.828	3-metil-1-butanol	0,04	3,1	2112,36	212,30	878,65	52809,00	681,41	5307,50	68,48	21966,25	283,44
3.929	2-metil-1-butanol	N/A		524,92	49,94	190,08	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5.434	heksanal	0,0003	0,48	2,90	0,00	0,00	9666,67	6,04	0,00	0,00	0,00	0,00
5.699	etilbutirat	0,0005	0,0049	11,85	1,83	0,67	23700,00	2418,37	3660,00	373,47	1340,00	136,73
6.027	etillaktat	50	250	14,49	37,28	16,23	0,29	0,06	0,75	0,15	0,32	0,06
6.110	butilacetat	0,058	0,66	8,97	2,27	1,18	154,66	13,59	39,14	3,44	20,34	1,79
6.180	furfural	0,77	9,6	0,00	6,35	16,12	0,00	0,00	8,25	0,66	20,94	1,68
7.221	etil-2-metilbutanoat	0,000006	0,000063	7,54	0,42	0,34	1256666,67	119682,54	70000,00	6666,67	56666,67	5396,83
7.493	2-metilbutanojska kislina	0,5	5,8	2,56	12,33	6,42	5,12	0,44	24,66	2,13	12,84	1,11
7.710	1-heksanol	0,0056	6,25	373,10	63,34	156,85	66625,00	59,70	11310,71	10,13	28008,93	25,10
7.894	izoamilacetat	0,00015	0,002	14,35	0,74	0,71	95666,67	7175,00	4933,33	370,00	4733,33	355,00
7.976	2-metilbutilacetat	0,005	0,011	3,60	0,62	0,14	720,00	327,27	124,00	56,36	28,00	12,73
8.081	Stiren	0,0036	0,065	4,23	0,00	0,00	1175,00	65,08	0,00	0,00	0,00	0,00
8.562	2-heptanol	0,065		7,68	0,83	1,81	118,15		12,77		27,85	
9.075	metilheksanoat	0,01	0,84	0,87	0,00	0,00	87,00	1,04	0,00	0,00	0,00	0,00
10.354	heksanojska kislina	0,036	3	1,16	1,79	0,00	32,22	0,39	49,72	0,60	0,00	0,00
10.697	etilheksanoat	0,001	0,005	21,50	0,85	1,16	21500,00	4300,00	850,00	170,00	1160,00	232,00
10.972	heksilacetat	0,01	8,2	4,69	0,22	0,30	469,00	0,57	22,00	0,03	30,00	0,04
11.179	fenilacetaldehid	0,0003	0,03	0,07	0,14	0,14	233,33	2,33	466,67	4,67	466,67	4,67
12.093	1-oktanol	0,12	0,19	0,48	0,00	0,00	4,00	2,53	0,00	0,00	0,00	0,00
12.100	linaloloksid	0,1	0,32	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	3,90	1,22
12.328	etilsorbitat	N/A		0,54	0,00	0,00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
12.595	2-feniletanol	0,12	1,1	1,62	5,10	0,61	13,50	1,47	42,50	4,64	5,08	0,55
12.641	izoamil-2-metilbutanoat	0,0086	0,14	0,32	0,00	0,00	37,21	2,29	0,00	0,00	0,00	0,00
12.995	metil oktanoat	0,2		1,38	0,00	0,15	6,90		0,00		0,75	
13.308	4-metoksi stirin	N/A		18,44	1,58	4,34	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
13.546	4-etil fenol	0,013	0,021	0,25	0,23	0,09	19,23	11,90	17,69	10,95	6,92	4,29
13.611	etil benzoat	0,053	0,055	0,49	0,08	0,20	9,25	8,91	1,51	1,45	3,77	3,64
13.744	oktanojska kislina	1,4	3	6,44	2,90	2,16	4,60	2,15	2,07	0,97	1,54	0,72
13.750	dietilsukcionat	N/A		1,02	0,80	0,18	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
13.944	kreozol	0,021	0,03	0,40	0,40	0,33	19,05	13,33	19,05	13,33	15,71	11,00
14.183	etiloktanoat	0,015	0,19	49,97	1,71	4,56	3331,33	263,00	114,00	9,00	304,00	24,00
14.858	etil-2-oktenoat	N/A		38,79	2,17	5,28	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14.884	2-feniletilacetat	0,019	0,48	0,69	0,00	0,48	36,32	1,44	0,00	0,00	25,26	1,00
16.067	metildekanoot	0,0043	0,0088	1,65	2,10	0,23	383,72	187,50	488,37	238,64	53,49	26,14
16.642	dekanoska kislina	0,13	10	39,10	3,11	5,37	300,77	3,91	23,92	0,31	41,31	0,54
17.059	etildekanoot	0,005	6,3	103,75	1,87	10,74	20750,00	16,47	374,00	0,30	2148,00	1,70
17.664	etil-2-deceneoat	N/A		11,45	0,42	1,19	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
18.429	etil-trans-2-cis-4-dekadioat	0,1		3227,27	34,53	294,82	32272,70		345,30		2948,20	
18.722	metildodekanoot	N/A		0,86	0,00	0,10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
19.585	etildodikanoot	0,4	5,9	37,78	0,18	2,44	94,45	6,40	0,45	0,03	6,10	0,41
21.857	etiltetradekanoot	0,18	4	8,14	0,00	0,29	45,22	2,04	0,00	0,00	1,61	0,07

5. Sklep

V raziskovalnem delu za diplomsko nalogu smo skladno z našimi cilji analizirali frakcije destilata fermentirane sadne kaše kultivarja hruške viljamovka.

Preizkusili smo 2 metodi analize hlapnih spojin v destilatu sadne kaše hruške viljamovka. Ugotovili smo, da metoda z uporabo SPME vlakna ni primerna za kvantitativno analizo etanola in metanola. Nasprotno smo pokazali, da je analiza vseh lahko hlapnih spojin mogoča z metodo direktnega injiciranja. Ob takšni metodi je potrebna kolona, ki prenese aplikacijo večje količine vode.

Uspešno smo razvili in optimizirali metodo za plinski kromatograf, sklopljen z masnim spektrometrom. Optimizirano metodo smo nato uporabili za kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje frakcij destilata sadne kaše kultivarja hruške viljamovke. Identificirali smo 65 prisotnih spojin in jih večino tudi kvantificirali

Potrdili smo, da je za aroma viljamovke najpomembnejši etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoat, hkrati pa smo ugotovili, da se njegov profil destilacije pomembno razlikuje med prvo in drugo destilacijo. Za najvišjo koncentracijo etil-*trans*-2, *cis*-4-dekadienoata v končnem proizvodu je treba v prvi destilaciji zbirati vse frakcije. Pri drugi destilaciji pa lahko prvo frakcijo brez izgub zavrzemo.

Na podlagi rezultatov kvantifikacije smo izdelali rekonstrukcijo arome in jo senzorično ovrednotili. Kljub temu, da se je rekonstrukcija organoleptično razlikovala od naravne arome, je imela izrazito sadno aroma in je močno spominjala na vonj hruške.

V nadalnjih raziskavah bi bilo potrebno opraviti analizo arome viljamovke z plinsko kromatografijo-olfaktometrijo in podrobneje ugotoviti, katere spojine imajo odločilen prispevek k aromi.

6. Literatura

1. D. Stančević, Kruška, Beograd, Nolit, 1980.
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Williams_pear, 8. 5. 2012.
3. M. Jazbec, Vrabl, Juvanc, Hoznak, V sadnem vrtu, Ljubljana, Kmečki glas, 1987.
4. F. Štampar, Sadjarstvo, Ljubljana, Kmečki glas, 2009.
5. K. Brzica, Vočarstvo za svakog, Zagreb, Naprijed, 1991.
6. U.S. department of agriculture, Pyrus Crop Germplasm Committee: Report and genetic vulnerability statement, 2004.
7. W. Gaigg, Oplemenitena žganja, Slovenj Gradec, Kmetijska založba, 2004.
8. Mottram, Elmore, Aroma, Encyclopedia of food sciences and nutrition, druga izdaja ured., 5174-5179.
9. http://prvi_test.tripod.com/pobuda/Pobuda.htm, 14. 6 .2012
10. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Olfaction>, 10. 6. 2012
11. Zavrtanik, Vpliv zrelosti na lastnosti hrušk sorte Viljamovka, diplomsko delo Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, 1989.
12. Heinz, Jennings, Volatile components of Bartlett Pear. V, J. Food Sci. 31, 69-80, 1966.
13. Jennings, Sevenants, Volatile esters of bartlett pear. III., J. Food Sci. 29, 158-163, 1964.
14. Bogataj A., Analiza arume žganja viljamovke, diplomsko delo, Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 1998.
15. http://en.wikipedia.org/wiki/Electronic_nose, 14. 5.2012
16. Golob, Jamnik, Bertoncelj, Doberšek, Senzorična analiza: metode in preizkuševalci, Acta agriculturae slovenica, 85, 55-66, 2005.
17. Kahle, Preston, Richling, Heckel, Schreier, On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products, Food chem. 91, 449-455, 2005.
18. Vidrih, Zlatić, Čejić in Hribar, Effects of storage temperature on pear viljamovka on the formation of different aroma volatiles, 2011.
19. Garcia-Llobodanin, Achaerandio, Ferrando, Guell, Lopez, Pear distillates from pear juice concentrate: effect of lees in the aromatic composition, J. Agric. Food Chem 55, 3462-3468, 2007.

20. http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry, 9. 6. 2012
21. N. Nikićević, Effects on some production factors on chemical composition and sensory qualities of Williams pear brandy, *J. Agr. Sci.* 50, 193-206, 2005.
22. Chervin, Speirs, Loveys, Patterson, Influence of low oxygen storage on aroma compounds of whole pears and crushed pear flesh, *Postharvest biol. Tec.* 19, 279-285, 2000.
23. Jennings, Volatile esters of Bartlett pears, *J. Food. Sci.* 26, 564-568, 1961.
24. Jennings, Creveling, Volatile esterst of Bartlett pear II., *J. Food. Sci.* 28, 91-94, 1963.
25. Suwanagul, Richardson, Identification od headspace volatile compounds from different pear (*Pyrus communis L.*) varieties, *Acta Horticulturae* 475, 605-623, 1998.
26. Keršek, Zdravilna rastlinska in sadna žganja, Tržič, Učila, 2008.
27. Paunović, Dančić, Vinarstvo i tehnologija jakih alkoholnih pića, Beograd, Zadružna knjiga, 1967.
28. Jenko, Čuš, Košmrelj, Sortni vonj vina ali napaka, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2011.
29. Žvokelj, Potek alkoholne fermentacije hruškove kaše sorte Viljamovka, diplomsко delo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, 1991.
30. Versini, Serra, Orriols, Inama, Marchio, Bartlett pear unsaturated ethyl decanoates and c₉ compounds among components characterizing cv. Catalan roxo grape marc distillates, *Vitis* 34, 57-62, 1995.
31. Hernandez-Gomez, Ubeda, Briones, Melon fruit distillates: comparison of different distillation methods 82, 539-543, 2003.
32. Glatthar, Senn, Pieper, Investigations on reducing the methanol content in distilled spirit and its repercussuin on aromatic quality 97, 209-2016, 2001.
33. Leon-Rodriguez, Gonzales-Hernandez, Barba de la Rosa, Escalante-Minakata, Lopez, Characterization of volatile compounds of Mezcal, an Ethnic alchocolic beverage obtained from Agave salmiana, *J. Agric. Food Chem* 54, 1337-1341, 2006.
34. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008R0110:SL:NOT>, 10.6.2012
35. http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography, 1.6.2012
36. http://sl.wikipedia.org/wiki/Raoultov_zakon, 12. 6. 2012
37. http://apps.kew.org/trees/?page_id=123, 8.5.2012

38. Stran študentov FFA, Študijsko gradivo: Analizna kemija: predavanja: Kromatografija, <http://farma-drustvo.si/studentska-scena/studijsko-gradivo-2/>, 2012.
39. Stran študentov FFA, Študijsko gradivo: Analizna kemija: Predavanja: Masna spektroskopija, <http://farma-drustvo.si/studentska-scena/studijsko-gradivo-2/>, 2012.
40. Jennings, Creveling, Heinz, Volatile esters of Bartlett pear IV. Esters of Trans:2-cis:4-decadienoic acid, J. Food Sci. 29, 730-734, 1964.
41. V. Sancin, Sadje z našega vrta, Trst, Tržaški Tisk, 1988.