

# SPEKTROMETRIJSKE I KROMATOGRAFSKE METODE U PROIZVODNJI PIVA

---

**Bedeniković, Kristina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:658138>

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

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



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**  
**PIVARSTVO**

**KRISTINA BEDENIKOVIĆ**

**SPEKTROMETRIJSKE I KROMATOGRAFSKE METODE U**  
**PROIZVODNJI PIVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Karlovac, 2023.**



**Veleučilište u Karlovcu**

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Pivarstvo

Kristina Bedeniković

**Spektrometrijske i kromatografske metode u proizvodnji piva**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Jasna Halambek, v.pred.

Broj indeksa studenta: 0314615072

Karlovac, prosinac 2023.

*Od srca veliko hvala mojoj mentorici dr.sc. Jasni Halambek na pruženoj pomoći, literaturi, savjetima i znanju kojim je doprinijela u izradi ovog rada.*

*Željela bih se zahvaliti svojim roditeljima, hvala za svu ljubav i podršku koju ste mi pružili tijekom mog studija.*

*Te na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojem dečku koji je bio veliki oslonac, podrška i poticaj tijekom cijelog ovog procesa, kada je bilo najpotrebnije.*

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Kristina Bedeniković**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Spektrometrijske i kromatografske metode u proizvodnji piva** rezultat vlastitog rada i istraživanja te se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, prosinac 2023.

Kristina Bedeniković

---

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij Prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## SPEKTROMETRIJSKE I KROMATOGRFSKE METODE U PROIZVODNJI PIVA

*Kristina Bedeniković*

**Mentor:** Dr.sc. Jasna Halambek, v.pred.

**Sažetak:** U ovome radu opisuju se dvije najvažnije i najčešće metode analize u prehrambenoj industriji, ali i u ostalim industrijama i područjima kao što su prerada metala, biokemija, medicina, forenzika, itd. Navedenim metodama moguće je odrediti širok spektar komponenata u pojedinim tvarima. Spektrometrija se temelji na lomu svjetlosti na prizmi, dok se kromatografske metode temelje na određivanju hlapljivih komponenata. U pivarskoj industriji vrlo je važno održavati konstantnu i stabilnu kvalitetu proizvoda. Gorčina, polifenoli, diacetil, pentandion, esteri i ostale hlapljive komponente važan su pokazatelj kvalitete proizvoda, te imaju jako velik utjecaj na potrošača.

**Broj stranica:** 35

**Broj slika:** 17

**Broj tablica:** /

**Broj literaturnih navoda:** 11

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** Kvaliteta piva, kromatografija, metode analize, spektrometrija.

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. *Dr.sc. Ines Cindrić, prof. struč. stud.*
2. *Elizabeta Zandona, mag. ing. bioproc., pred.*
3. *Dr.sc. Jasna Halambek, v. pred.*
4. *Dr.sc. Goran Šarić, v.pred. (zamjena)*

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J. J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Hrvatska

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Karlovac University of Applied Sciences**  
**Department of Food Technology**  
**Professional undergraduate study of Food Technology**  
**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Food Technology**

**Final paper**

### **SPECTROMETRIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS IN BEER PRODUCTION**

*Kristina Bedeniković*

**Supervisor:** Ph.D. *Jasna Halambek*, senior lecturer

**Abstract:** This paper describes two most important and mostly used methods of analysis in food industry, but also in other types of industries and areas such as metal industry, biochemistry, forensic ,etc. With the described methods it is possible to determine wide spectar od components in certain materials. Spectrometry is based on light break on prism, while chromatography is based on determination of volatile components. In beer industry it is very important to keep constant and stabile product quality. Bitterness, polyphenols, diacetil, pentandion, esters and other volatile components are important indicator of product quality, and have big infulence on consumer.

**Number of pages:** 35

**Number of figures:** 17

**Number of tables:** /

**Number of references:** 11

**Original in:** Croatian

**Key words:** Analysis methods, beer quality, chromatography, Spectrometry.

**Date of the final paper defense:**

**Reviewers:**

1. *Ph.D. Ines Cindrić, college prof.*
2. *Elizabeta Zandona, lecturer*
3. *Ph.D. Jasna Halambek, sen. lecturer*
4. *Ph.D. Goran Šarić, sen. lecturer (substitute)*

**Final paper deposited in:** Library of Karlovac University of Applied Sciences, J. J. Strossmayera Square 9, 47000 Karlovac, Croatia.



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. SPEKTROMETRIJSKE METODE.....	2
2.1.1. Spektar.....	3
2.1.2. Optička spektrometrijska analiza.....	4
2.1.3. Masena spektrometrija.....	5
2.1.4 Rendgenska spektrometrija.....	6
2.2. UREĐAJI ZA SPEKTROMETRIJSKE ANALIZE.....	7
2.2.1. Osnovni elementi uređaja.....	7
2.2.1.1. Disperzija.....	8
2.2.1.2. Moć razlaganja.....	8
2.2.2. Prizma.....	8
2.2.3. Optička rešetka.....	9
2.2.4. Razrez (Pukotina).....	10
2.2.5. Podjela uređaja.....	10
2.2.6. Kalibracija i održavanje uređaja.....	12
2.3. KROMATOGRFSKE METODE.....	13
2.3.1. Kromatografija na papiru.....	15
2.3.2. Tekućinska kromatografija.....	16
2.3.3. Plinska kromatografija.....	18
2.4. SPEKTROMETRIJSKE ANALIZE U PIVARSKOJ INDUSTRIJI.....	23
2.4.1. Analiza boje piva.....	23
2.4.2. Analiza gorčine piva.....	24
2.4.3. Analiza polifenola u pivu.....	26
2.4.4. Analiza izooktana.....	28
2.5. KROMATOGRFSKE ANALIZE U PIVARSKOJ INDUSTRIJI.....	28
2.5.1. Određivanje diacetila i pentandiona u pivu.....	28
2.5.2. Određivanje ostalih komponenata u pivu.....	31
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	34
<b>5. LITERATURA</b> .....	35

## 1.UVOD

Spektrometrija čini dio instrumentalnih metoda i postupaka kojima se mogu dobiti informacije o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju separacije, detekcije i mjerenja energetskih promjena koje se događaju u atomskim jezgrama, atomskom elektronskom omotaču ili u molekulama kao posljedica interakcije s energijom. Naziv spektrometrija može nositi svaki postupak mjerenja spektra tj. mjerenja intenziteta zračenja ovisno o energiji (energija zračenja, toplinska, električna ili kemijska), valnoj duljini ili frekvenciji zračenja. Spektrometrijske metode možemo podijeliti na optičke, masene i rendgenske metode analiziranja sa širokom primjenom u raznim industrijama, medicini, farmaciji, itd. Spektrometrijske metode omogućuju precizno određivanje pojedinih komponenata u raznovrsnim tvarima.

Kromatografske metode su izuzetno efikasne i primjenjuju se u kemiji, farmaciji, biologiji i biomedicini. Kromatografskim metodama se mogu izdvojiti jako male količine tvari i razdvojiti te tvari prema kemijskim svojstvima te izvršiti odvajanje supstanci iz složenih smjesa. Glavno obilježje kromatografije je da je jedna faza mobilna, a druga stacionarna s velikom površinom. U pivarskoj industriji kao i svim tipovima industrija, održivost stabilne kvalitete je glavni cilj. Stabilna kvaliteta proizvoda osigurava eliminiranje reklamacija na proizvod te dobru prodaju i pozitivan dojam na tržištu. Pivo je osvježavajuće, pjenušavo piće koje sadrži velik broj okusnih tvari koje mogu pozitivno utjecati na okus piva, ali i u nekim slučajevima negativno. Spektrometrijske i kromatografske metode analize pomažu u kontroli tih okusnih parametara, te se na temelju njih radi korekcija u proizvodnji.

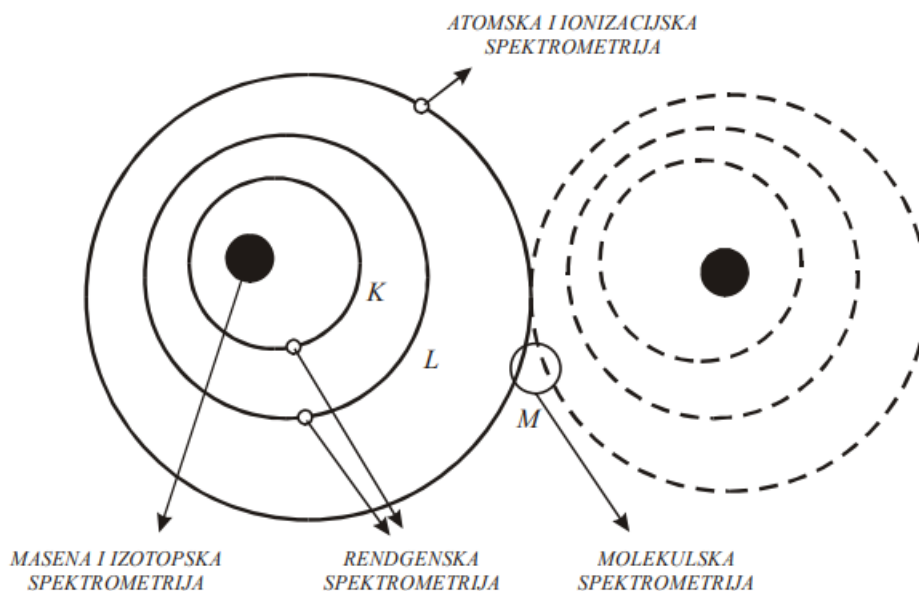
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. SPEKTROMETRIJSKE METODE

Spektrometrijske metode čine dio postupaka instrumentalnih metoda kojima se mogu dobiti informacije o strukturi tvari i kemijskom sastavu na temelju odvajanja (separacije), detekcije i mjerenja energetske promjene što se događaju u atomskim jezgrama, atomskom elektronskom omotaču ili u molekulama kao posljedica interakcije s energijom. Ovisno o tipu spektra, spektrometrijske metode mogu se podijeliti na emisijske i apsorpcijske.

Naziv spektrometrija može nositi svaki postupak mjerenja spektra tj. mjerenja intenziteta zračenja ovisno o energiji (energija zračenja, toplinska, električna ili kemijska), valnoj duljini ili frekvenciji zračenja.

Nekoliko je čimbenika o kojima ovisi odabir metode analize, a to su kemijski sastav i priroda analiziranih uzoraka, vrijeme koje je potrebno za dobivanje rezultata, potrebna oprema te točnost rezultata.



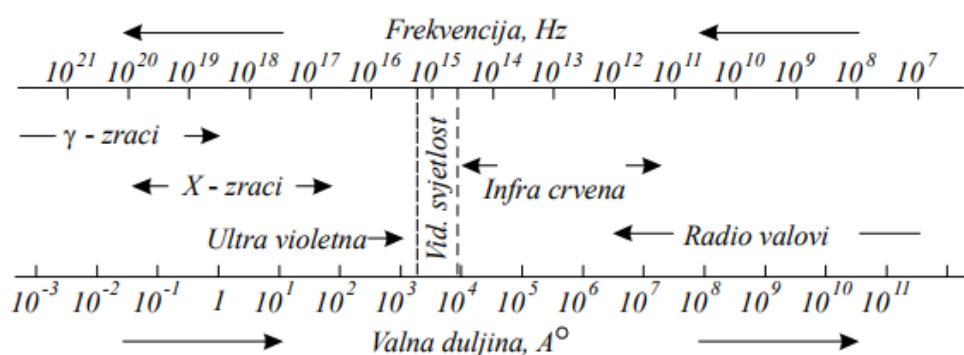
**Slika 1.** Podjela spektrometrijskih metoda po porijeklu zračenja (Tomljanović, 2000).

### 2.1.1. Spektar

Pod pojmom spektar podrazumijevamo niz zračenja određenih prema valnim duljinama. Elektromagnetski spektar prikazan je na Slici 2. Nažalost, ne postoji ni jedan instrument koji bi mogao razložiti u spektar cjelokupno zračenje, koje sadrži sve valne duljine. U slučaju spektrometrijskih metoda, najviše se koriste optička i rendgenska spektrometrijska analiza, odnosno zračenje u optičkom dijelu spektra (ultraljubičasti, vidljivi i infra crveni dio) od 100 do 2000 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ), kao i rendgenskom dijelu spektra zračenja od 0,01 do 2 nm. Za svako snimanje spektra, bitno je imati izvor zračenja, uzorak, monokromator i detektor. Elektromagnetsko zračenje se iz izvora usmjerava na uzorak, koji u tom trenutku može apsorbirati, raspršiti ili reflektirati svjetlo.

Ukoliko uzorak emitira zračenje, izvor zračenja je sam uzorak. Zračenje sa uzorka kreće se prema monokromatoru, koji se u uređaju nalazi u obliku prizme ili optičke rešetke gdje je njegova uloga propuštanje samo jedne valne duljine prema detektoru. Moć samog monokromatora ovisi o širini pukotine između izvora i prizme odnosno optičke rešetke.

Detektor prima zračenje i pretvara ga u električni signal. Svjetlost je zapravo elektromagnetsko zračenje koje je vidljivo ljudskom oku. Ljudsko oko može u prosjeku vidjeti svjetlost s valnom duljinom u rasponu od 390 do 750 nm.



**Slika 2.** Elektromagnetski spektar (Tomljanović, 2000).

### **2.1.2. Optička spektrometrijska analiza**

Optička spektrometrijska analiza provodi se u dijelu elektromagnetskog spektra koji obuhvaća ultraljubičasti, vidljivi i infracrveni dio spektra. Monokromatsko i polikromatsko zračenje se provodi pomoću prizmi koje su napravljene od stakla, kvarca, itd.

Po svom porijeklu, u ovaj dio elektromagnetskog zračenja pripadaju atomski, ionizacijski i molekularni spektar. Optički spektar po vrsti možemo podijeliti na emisijski i apsorpcijski spektar.

Emisijska optička spektrometrijska analiza je najraširenija skupina metoda za ispitivanje tvari anorganskog porijekla kao i primjesa u organskim supstancama.

Spektrometrija je bila prva metoda koja je dala podatke o spektrima nebeskih tijela (Mars, Venera, Sunce). U današnje vrijeme koristi se u kontroli tehnoloških procesa u raznim industrijama.

Najzastupljenija je metoda u metalurškim i metaloprerađivačkim industrijama, te čini oko 60-80% ukupnih analiza koje se rade u tim industrijama. Prednost emisijske optičke spektrometrijske analize temelji se na velikoj preciznosti u određivanju niskih koncentracija tvari i nečistoća, te kratkog trajanja analize. Količina koja je potrebna za analizu je mala, u posebnih uvjetima čak 0,1 mg uzorka može biti dovoljan.

Emisijski spektralni uređaji se sastoji od izvora pobuđivanja, komponente za fokusiranje, prizme ili rešetke, prijemnika, te receptora zračenja (Tomljanović, 2000).

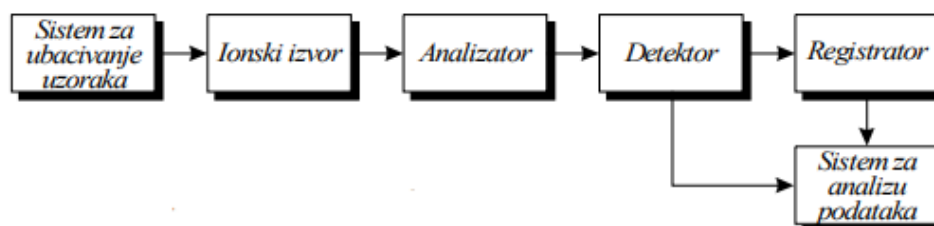
### 2.1.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je instrumentalna analitička tehnika kojom se određuje relativna masa i količina iona nastalih ionizacijom atoma i molekula te raspadom ioniziranih molekula nekog uzorka. Temelji se na pretvaranju ispitivanog uzorka u ionski snop i razdvajanju tog snopa u sastavne komponente na temelju njihovih odnosa mase i elektriciteta ( $m/e$ ).

Odnos mase i elektriciteta ( $m/e$ ) naziva se maseni spektar i predstavlja karakteristiku analiziranog uzorka. Instrumenti kod kojih se ioni prikazuju na foto ploči nazivaju se maseni spektrografi, dok se naziv maseni spektrometri koristi za instrumente sa električnom detekcijom iona.

Masena spektrometrija je prigodna za analitičku primjenu zbog visoke osjetljivosti (granica detekcije je oko  $10^{-14}$  g) i zbog dostupnosti velike količine podataka iz vrlo male količine uzorka. Ova je metoda pronašla primjenu u različitim područjima za analizu tragova organskih i anorganskih materijala u biološkim, medicinskim i ekološkim istraživanjima, geologiji, petrokemiji, kriminalistici, itd. (Tomljanović, 2000).

Maseni spektrometar, koji radi u visokome vakuumu, sastoji se od četiri osnovna dijela: sustava za unošenje uzorka, ionskog izvora koji stvara ione svojstvene ispitivanom uzorku (obično bombardiranjem atoma i molekula elektronima) i u električnom ih polju ubrzava, analizatora (najčešće magnetsko polje) koji savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja ( $m/z$ ), te detektora u kojem se razdvojeni ioni skupljaju i karakteriziraju. Mijenjanjem jakosti magnetskog polja mogu se redom registrirati ioni različitih masa, čime nastaje maseni spektar karakterističan za određeni kemijski spoj.



**Slika 3.** Shematski prikaz masenospektrometrijskog sistema (Tomljanović, 2000).

Masena spektrometrija primjenjuje se za vrlo točno određivanje relativnih atomskih i relativnih molekularnih masa, elementarnoga sastava i bruto-formule kemijskih spojeva, izotopnoga sastava i strukture njihovih molekula, tragova primjesa, za proučavanje ionskih i radikalskih reakcija u plinovitoj fazi, prijelaznoga stanja, fenomena ionizacije i dr. Za analizu složenih smjesa maseni se spektrometar izravno povezuje s plinskim ili tekućinskim kromatografom, u kojem se sastojci smjese, prije analize, prvo razdvajaju.

Uzorci za masenu spektrometrijsku analizu mogu biti u plinovitom, tekućem ili čvrstom stanju, ili u obliku otopine ovisno o načinu unošenja u ionski izvor. Ionski izvor ima ulogu da provede ione iz atoma i molekula uzorka, te formira i ubrza ionski snop prema masenom analizatoru. Maseni analizator je osnovni dio masenog spektrometra jer se uz pomoć njega ostvaruje razdvajanje pojedinih masa iz ioniziranog uzorka i omogućava određivanje njihove količine.

Osjetljivost masene spektrometrijske analize i moći razlaganja uveliko ovisi o metodi detekcije. Izbor detektora ovisi o nekoliko osnovnih zahtjeva, kao što su postizanje maksimalne osjetljivosti, što manji mogući utjecaj na moć razlaganja, osiguravanje određene točnosti analize, brzini snimanja masenog spektra, vremenskoj stabilnosti i širokom dinamičkom opsegu. Kod detekcije ionski snopovi se pretvaraju u električni signal ili u lik negativna na fotoploči.

#### **2.1.4 Rendgenska spektrometrija**

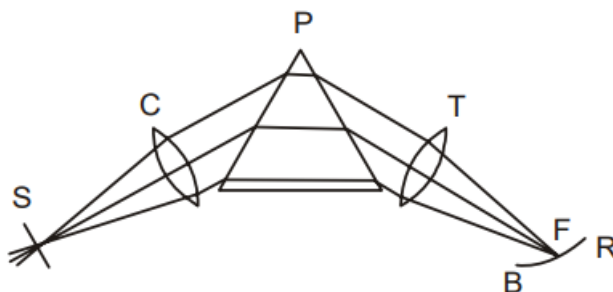
Rendgenska spektrometrija je opći pojam za nekoliko spektroskopskih tehnika za proučavanje materijala primjenom rendgenskih zraka. Rendgenske zrake su transverzalni elektromagnetski valovi vrlo malih valnih duljina. Područje valnih duljina rendgenskih zraka nije strogo definirano budući da se proteže od ultraljubičastog do gama područja i djelomično se s njima preklapa. W.C. Röntgen 1895. godine, otkrio je novu vrstu zraka u eksperimentu s katodnim zrakama i nazvao ih X-zrakama zbog njihove nepoznate prirode. X-zrake šire se u pravcima, bacaju oštre sjene, djeluju na fotografsku ploču i u nekim tvarima izazivaju fluorescenciju. Rendgenske zrake nastaju prijelazima u elektronskom plaštu ili kočenjem brzih elektrona, dok  $\gamma$  - zrake nastaju kvantnim prijelazima unutar jezgre. Rendgenske zrake u rendgenskoj cijevi nastaju sudarom katodnih zraka, tj. elektrona vrlo velikih brzina, sa čvrstim tijelom. Uređaj za dobivanje rendgenskih zraka (rendgenska cijev) mora sadržavati izvor elektrona ili katodu, metu u koju elektroni udaraju, a koja se obično naziva antikatoda ili anoda i uređaj za dobivanje visokog napona, koji ubrzava elektrone tako da postignu dovoljnu brzinu kod udara u metu.

## 2.2. UREĐAJI ZA SPEKTROMETRIJSKE ANALIZE

Spektrometrijski instrumenti su uređaji u kojima nastaju i mjere se spektri, omogućavaju razlaganje zračenja koje emitira izvor i koje pada na pukotinu (razrez) prema valnim duljinama.

### 2.2.1. Osnovni elementi uređaja

Spektralni uređaji moraju sadržavati kolimatorski dio, disperzijski element (prizma ili rešetka) i optičku leću. Kolimatorski dio sastoji se od uske pukotine postavljene u žarištu objektiva. Duljina kolimatora jednaka je žarišnoj daljini leće, tako da zrake svjetlosti poslije izlaza iz kolimatora budu paralelne. Disperzijski element (prizma ili rešetka) služi za razlaganje svjetlosnog snopa na zrake različite valne duljine. Optička leća u svome žarištu skuplja monokromatske zrake pri čemu daje monokromatske slike ulazne pukotine.



**Slika 4.** Optički sistem spektroskopa, S-pukotina; C-kolimatorska leća; P-prizma; T-Optička leća; F-krivulja različitih valnih duljina u žarištu; B-plavi ili kratkovalni dio; R-crveni ili dugovalni dio spektra (Tomljanović, 2000).

Kod izbora odgovarajućeg tipa uređaja od primarnog značaja su raspon valnih duljina u kojoj se on može koristiti, veličina disperzije, promjena disperzije sa valnom duljinom, moć razlaganja i jasnost spektra, a od sekundarnog značaja su odsutnost raspršene svjetlosti i lažnih linija, oblik i veličina dobivenih spektralnih linija i jednostavnost upotrebe uređaja.



### **2.2.1.1. Disperzija**

Disperzija spektroskopa je mjera koliko uređaj razlaže svjetlost u prostoru prema valnim duljinama. Ako disperzija koju uređaj prikaže iznosi  $30 \text{ A}^\circ/\text{mm}$ , znači da je disperzija mala za razliku od disperzije koja iznosi  $1 \text{ A}^\circ/\text{mm}$  koja je relativno velika. Pojedini uređaj sa prizmom može mjeriti samo određen raspon valnih duljina zbog promjena disperzije promjenom valne duljine. Uređaji sa prizmom upotrebljavaju se za dobivanje jednostavnih apsorpcijskih i emisijskih spektara. Prednost spektroskopa sa difrakcijskom rešetkom od uređaja sa prizmom je u ujednačenijoj disperziji i u širem spektralnom rasponu, a glavni nedostatak je prisutnost astigmatizma (iskrivljenost slike).

### **2.2.1.2. Moć razlaganja**

Moć razlaganja određuje u kojoj će mjeri svjetlost biti razdvojena od svjetlosti drugih valnih duljina koje padaju blizu nje. Da bi se postigla što veća moć razlaganja potrebno je da rešetka ima što više proreza i da se za razlaganje linija koristi što veći red difrakcije.

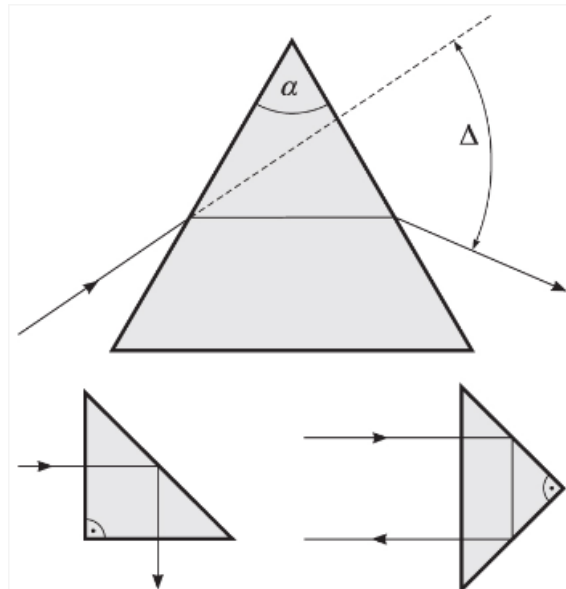
### **2.2.2. Prizma**

Optička prizma je optički instrument (najčešće trostrana prizma) napravljena od nekog prozirnog materijala (najčešće stakla). Njezina je glavna uloga razlaganje (disperzija) bijele svjetlosti na boje. Karakteriziraju je različiti indeksi lomova za pojedinu boju (valnu duljinu).

Kada zraka monokromatske svjetlosti padne na jednu plohu trostrane prizme, ona se lomi pri ulazu i pri izlazu iz prizme. Kut devijacije je najmanji kada zraka prolazi kroz prizmu simetrično.

Budući da kut devijacije ovisi o indeksu loma, a indeks loma o valnoj duljini svjetlosti, prizmom se može svjetlost rastaviti na komponente i tako dobiti disperzija svjetlosti. Upravo se to svojstvo prizme iskorištava za dobivanje spektara kod spektroskopskih instrumenata. Prizma za totalnu refleksiju trostrana je pravokutna prizma kojom se može zraka svjetlosti zakrenuti za  $90^\circ$  ili vratiti natrag i preokrenuti.

Optičku prizmu opisuje kut prizme ( $\alpha$ ), kut koji zatvara optičko sredstvo iz kojeg svjetlost dolazi u prizmu i optičko sredstvo u koje svjetlost iz prizme izlazi, upadni kut između upadne zrake svjetlosti i okomice na upadnu plohu prizme, te kut devijacije ( $\Delta$ ) gdje zraka svjetlosti, prošavši kroz prizmu, skrene iz svoga prvotnoga smjera, a ovisi o kutu prizme, indeksu loma materijala od kojega je prizma načinjena i o upadnome kutu zrake svjetlosti.



**Slika 5.** Optička prizma,  $\alpha$  kut prizme,  $\Delta$  kut devijacije svjetlosne zrake

(<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=71130>, pristupljeno 15.08.2023.)

### 2.2.3. Optička rešetka

Optička rešetka ili difrakcijska rešetka sastoji se od velikog broja usko poredanih ureza ili difrakcijskih linija. Što je veći broj ureza, u teoriji veća je i sama moć razlaganja rešetke, te ukoliko su difrakcijske linije bliže jedna drugoj, toliko je veća i disperzija rešetke. Kada svjetlost padne na optičku rešetku, svaka od njezinih pukotina postaje izvor novih svjetlosnih valova. Među valovima koji se šire od različitih pukotina nastaje interferencija. Razlikujemo dva tipa rešetki, transparentne i refleksijske rešetke. Transparentne rešetke sastoje se od prozirnih pločica na kojima se nalaze tisuće difraktirajućih linija. Na grubim rešetkama može biti samo do 200 linija po centimetru, dok na finim (visokodisperzijskim) rešetkama može biti i do 1200 ureza po centimetru. Refleksijske rešetke sastoje se od 2000-12000 ureza po centimetru.

Svjetlost koja nije monokromatska rastavit će se na rešetki u spektar jer pojačanje za različite boje (elektromagnetske valove različitih valnih duljina) nastaje pod različitim kutovima. Pritom neće nastati samo jedan spektar, već nekoliko njih, zato broj dobiva naziv red spektra.

Spektar koji je dobiven optičkom rešetkom razlikuje se od spektra dobivenoga optičkom prizmom po tome što je njegova disperzija proporcionalna valnoj duljini, tj. najviše se otklanja crvena boja, a najmanje ljubičasta, dok optička prizma najviše otklanja ljubičastu boju, a najmanje crvenu. Disperzija je veća što je konstanta rešetke manja.

#### **2.2.4. Razrez**

Razrez (pukotina), jedan od najvažnijih dijelova spektroskopa, spektralna linija zapravo je monokromatska slika razreza (pukotine). Preciznost sa kojom je napravljen i sa kojom se može podešavati određuje svojstva spektralnih linija, zbog toga razrez uveliko može utjecati na razlaganje. Kod finih instrumenata sama širina razreza može se podešavati između 1 mm i 0,005 mm. Kako bi razmak između čeljusti dao linije pravilnog oblika, bitno je da rubovi čeljusti leže u istoj ravnini.

Rubovi čeljusti su zaoštreni tako da svjetlost koja se od njih odbija ne ulazi u spektroskop, već je zaoštrena strana okrenuta nasuprot snopu svjetlosti koji ulazi. Čeljusti trebaju biti napravljene od tvrdog i postojanog materijala (stelit, visokokvalitetni nehrđajući čelik) koji se može dobro oštriti i glačati. Razrezi su napravljeni tako da se zatvaraju samo do minimalnog dodira rubova kako se rubovi njihove čeljusti ne mogu oštetiti prilikom nepažljivog zatvaranja (Tomljanović, 2000).

#### **2.2.5. Podjela uređaja**

Spektralne uređaje možemo podijeliti prema disperzijskom elementu i prema registraciji spektra na spektroskope (vizualna registracija), spektrografe (fotografska registracija) i na monokromatore i polikromatore (fotoelektrična registracija). Odabir uređaja određuje se prema fizikalnim, kemijskim i fizikalno-kemijskim osobinama, na kojim se zasnivaju instrumentalne metode. Neke od osobina su ekstenzivne veličine (masa, zapremnina), mehaničke osobine (specifična težina, viskozitet, površinski napon), električne osobine (električna provodljivost, potencijometrija, napon električne energije), termičke osobine (termička provodljivost, toplina kemijske reakcije), nuklearne osobine (radioaktivnost, apsorpcija nuklearnog zračenja) i

osobine koje uključuju interakciju materije i zračenja (emisija zračenja, apsorpcija zračenja, rasipanje zračenja, indeks loma i refrakcija, odnosno disperzija, itd).

Spektrometar je zapravo spektroskop sa skalom valnih duljina, njime je moguće izravno elektronskim detektorom odrediti valnu duljinu spektralnih linija, odnosno odrediti spektar i mjeriti njegov intenzitet. Današnji spektrometar je složen uređaj koji uglavnom ima ugrađeno računalo s višestrukom ulogom planiranja i provođenja mjerenja, nadzor sveukupnog mjernog postupka, bilježenje spektra, pohrana mjerenih digitalnih podataka i njihova obrada.

Spektrofotometar je česti laboratorijski instrument koji mjeri količinu svjetlosti koju apsorbira uzorak i koristi se za određivanje svojstava kao što su koncentracija ili apsorpcija tvari. Sam princip rada spektrofotometra temelji se na mjerenju intenziteta svjetlosti kao funkcije valne duljine, postiže se korištenjem prizme ili rešetke za raspršivanje upadne zrake na različite valne duljine. U praksi se spektrofotometar često koristi za mjerenje koncentracije otopljenih tvari u otopini procjenom količine svjetlosti koju otopina apsorbira unutar kivete postavljene unutar spektrofotometra (Tomljanović, 2000).



**Slika 6.** Spektrofotometar (autor Kristina Bedeniković).

UV-vidljivi spektrofotometar je tip uređaja koji koristi svjetlost u ultraljubičastom (UV) području (185-400 nm) i vidljivom području (400-700 nm) elektromagnetskog spektra. Koristi se za analizu obojenih spojeva i određivanje njihove koncentracije u otopini. Dok infracrveni

(IR) spektrofotometar radi pomoću svjetlosti u infracrvenom rasponu (700-1500 nm) elektromagnetskog spektra, te se koristi za analizu tvari koje apsorbiraju infracrveno svjetlo, i pritom daju informacije o funkcionalnim skupinama i molekularnim strukturama.

Maseni spektrometar se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu kemijsku analizu, predstavlja neku vrstu kemijskog reaktora u kojemu se događa različita razgradnja molekula. Osnovna funkcija mu je stvaranje naelektriziranih iona, razdvajanje nastalih iona prema odnosu mase i elektriciteta, te identifikacija vrste i količine prisutnih iona. Njime se može mjeriti čistoća uzorka i molarna masa, a prednost nad drugim tehnikama mu je visoka osjetljivost i zato je izvrstan uređaj za identifikaciju nepoznatih komponenti u uzorku.

Rendgenski spektrometar može se podijeliti na disperziju valnih duljina, odnosno na disperziju energije zračenja. Postoje dva osnovna principa analiza kao rendgenska fluorescentna analiza (RFA) i kao rendgenska strukturalna analiza (RSA). Rendgenska fluorescentna analiza (RFA) analizira na rendgenskim spektrometrima pomoću primarnog rendgenskog snopa zraka koji dolazi iz rendgenske cijevi i pada na uzorak za analizu, dok rendgenska strukturalna analiza (RSA) analizira strukturalne građe materijala pomoću difraktiranog snopa rendgenskih zraka.

#### **2.2.6. Kalibracija i održavanje uređaja**

Kalibracija ili umjeravanje je skup aktivnosti kojima se u određenim uvjetima uspostavlja odnos između vrijednosti koju uređaj mjeri i pokazuje, i referentne vrijednosti kojom se provjerava ispravnost mjernog uređaja. Proces kalibracije se sastoji od pripreme kalibracijske krivulje koja prikazuje grafičke varijacije eksperimentalnih mjerenja. Početak kalibracijske krivulje (nulta točka) se odrađuje nuliranjem uređaja sa tzv. slijepom probom, a kraj kalibracijske krivulje se određuje sa najkoncentriranijim standardom. Provođenje redovite kalibracije je neophodno zbog pouzdanosti mjernih rezultata i sljedivosti rezultata. Proces kalibracije osigurava da uređaj precizno i dosljedno mjeri zadane vrijednosti, te ukoliko se uređaj ne kalibrira redovito, njegova dugoročna stabilnost može biti neispravna. Kalibracija ili umjeravanje je postupak kojim se određuju i dokumentiraju odstupanja od zadane vrijednosti mjerenja rezultata, te je to skup postupaka propisan normama.

Kod emisijske metode kalibracije otopine nepoznatih koncentracija uspoređuju se sa standardnim otopinama. Proces se započinje nuliranjem uređaja sa slijepom probom, a zatim se uvodi standard najviše koncentracije kako bi se prikazao maksimum mjernog područja i formirao graf ovisnosti mjerenja uređaja i koncentracija. Apsorpcijska metoda kalibracije se

temelji na određivanju nulte i maksimalne apsorpcije prolaskom svjetla kroz uređaj u svrhu određivanja radnog područja uređaja (Tomljanović, 2000).

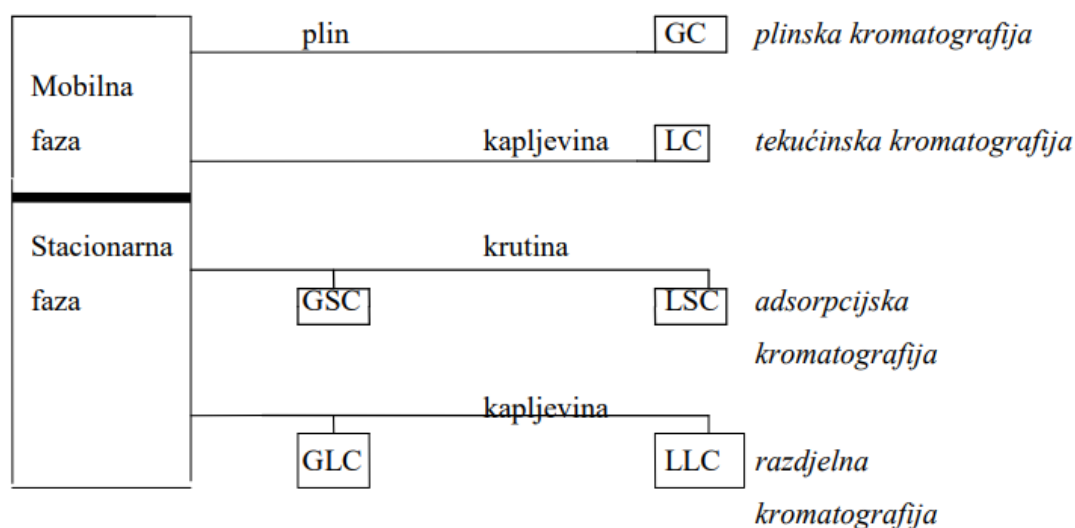
### **2.3. KROMATOGRFSKE METODE**

U suvremenim metodama kemijskih analiza vrlo bitno mjesto zauzimaju kromatografske metode. Ovaj tip metoda je izuzetno efikasan i primjenjuje se u kemiji, farmaciji, biologiji i biomedicini. Kromatografskim metodama se mogu izdvojiti jako male količine tvari i razdvojiti te tvari prema kemijskim svojstvima, te izvršiti odvajanje supstanci iz složenih smjesa. Kromatografiju je izumio ruski kemičar Mikhail Semyonovich Tsvet, koji je 1906. godine uveo ovu tehniku za odjeljivanje biljnih boja. Kromatografija označava metodu razdvajanja sastojaka smjese u sustavu relativne pokretljivosti dvije faze. Glavno obilježje kromatografije je da je jedna faza mobilna, a druga stacionarna s velikom površinom. Mobilna faza može biti tekućina, plin ili fluid koji prolazi kroz ili uzduž nepokretne faze, odnosno stacionarne faze utjecajem kapilarnih sila, sile teže, razlike tlakova u određenom smjeru, dok stacionarna faza može biti čvrsta tvar ili tekućina koja ispunjava usku cijev ili je nanosena na ravnoj plohi.

Kromatografski proces se temelji na uspostavljanju dinamičke ravnoteže određenog spoja između stacionarne i mobilne faze, gdje se u stacionarnoj fazi nalazi dio tvari koji je u ravnoteži s dijelom u mobilnoj fazi. Radi gibanja mobilne faze dolazi do narušavanja ravnoteže i zbog toga molekule putuju u smjeru gibanja mobilne faze. Zbog specifične interakcije različitih spojeva sa stacionarnom i mobilnom fazom, različiti spojevi će zapravo putovati različitim brzinama i na taj način se odjeljuju. Proces odjeljivanja zasniva se na određenim načelima kao što su adsorpcija, razdjeljenje, difuzija, ionska izmjena, kiralnost i dr. Velika moć razlučivanja kromatografskih metoda zasniva se na pojavi uzastopnog ponavljanja postupka razdjeljivanja neke tvari između stacionarne i mobilne faze. Do dobrog odjeljivanja tvari dolazi zbog uspostavljanja ravnoteže koje se neprestano ponavlja i zbog male razlike u razdjeljivanju između stacionarne i mobilne faze.

Na samu uspješnost kromatografije (osim prirode tvari, stacionarne i mobilne faze) utječu brzina mobilne faze, temperatura sustava, omjer mase tvari koja se odjeljuje i stacionarne faze, veličina i oblik čestica (stacionarna faza) i dr. (Jerković i Radonić, 2009).

Prema agregatnom stanju stacionarne i mobilne faze, načinu izvedbe, kao i prema fizikalno-kemijskim procesima tijekom razdvajanja razlikujemo vrste kromatografije kao što su adsorpcijska kromatografija, razdjelna kromatografija, ionsko-izmjenjivačka kromatografija, afinitetna kromatografija, kromatografija isključenjem i kiralna kromatografija. Adsorpcijska kromatografija je kromatografija u kojoj se mehanizam odjeljivanja uglavnom temelji na razlici u afinitetu adsorpcije sastojaka uzorka prema površini nepokretne faze. U ovoj kromatografiji stacionarna faza je kruti adsorbens, a mobilna faza može biti tekućina ili plin (tekućinska adsorpcijska kromatografija (LSC, engl. Liquid Solid Chromatography) i plinska adsorpcijska kromatografija (GSC, engl. Gas Solid Chromatography). Razdjelna kromatografija, u kojoj se mehanizam odjeljivanja uglavnom temelji na razlici u topljivosti sastojaka uzorka u pokretnoj i nepokretnoj fazi. Ovdje je stacionarna faza tekućina vezana za sorbens ili fino zrnatu inertnu krutinu, a mobilna tekućina ili inertni plin (tekućinska razdjelna kromatografija (LLC, engl. Liquid Liquid Chromatography) i plinska razdjelna kromatografija (GLC, engl. Gas Liquid Chromatography) (Jerković i Radonić, 2009).



**Slika 7.** Različite vrste adsorpcijske i razdjelne kromatografije (Jerković i Radonić, 2009)

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija, temelji se na interakciji naboja između molekula uzorka i naboja stacionarne faze. U ovom slučaju ionski izmjenjivač je stacionarna faza (npr. polimer koji sadrži benzensulfonske grupe može na sebe vezati proteine sa suprotnim nabojem od

naboja funkcijske skupine na polimeru). Koristi se za pročišćavanje proteina, peptida, aminokarboksilnih kiselina, oligonukleotida i drugih molekula s nabojem. Ispiranje se postiže poništavanjem ionskih interakcija promjenom ionske jakosti ili promjenom pH proteina. Afinitetna kromatografija zasniva se na sposobnosti proteina da vežu određene male molekule, odnosno to je metoda razdvajanja bioloških makromolekula koja je temeljena na njihovom velikom afinitetu prema određenom prirodnom paru. Molekula supstrata odabranog enzima se veže kovalentno za određeni nosač (stacionarna faza), pa se zato i zadržava na kromatografskoj koloni. Zbog toga se iz proteinske otopine koja se propušta kroz kromatografsku kolonu sa određenom stacionarnom fazom veže samo pripadni enzim.

Kromatografija isključenjem, kromatografska metoda kod koje se razdvajanje, odnosno odjeljivanje komponenti temelji na osnovi veličine čestica. Stacionarna faza sadrži pore, tj. ona je polisaharidni gel koji djeluje kao molekulsko sito kroz koje ulaze manje molekule koje se zadržavaju, dok veće molekule prolaze s većom lakoćom. Unutar samih čestica gela nalaze se ispunjene šupljine vodom u koje mogu prodrijeti samo male molekule i one srednje veličine, dok su velike isključene. Kada se gel ispire otapalima, molekule koje su prodrle u šupljine difuzijom opet mogu izaći. Jedna od najboljih metoda kada je u pitanju razdvajanje prirodnih makromolekula i drugih polimera. Kiralna kromatografija, metoda koja se temelji na odjeljivanju sastojaka smjese između stacionarne (nepokretne) faze, u ovom slučaju malih krutih čestica, npr. silikagela i mobilne faze koja se u kromatografsku kolonu ubrizgava pod visokom tlakom. Prednosti ove metode kromatografije su što je brza, visoko efikasna i selektivna, te se može koristiti za preparaciju i analizu kiralnih lijekova. Glavne kromatografske metode možemo podijeliti na kromatografiju na papiru, tekućinsku i plinsku kromatografiju.

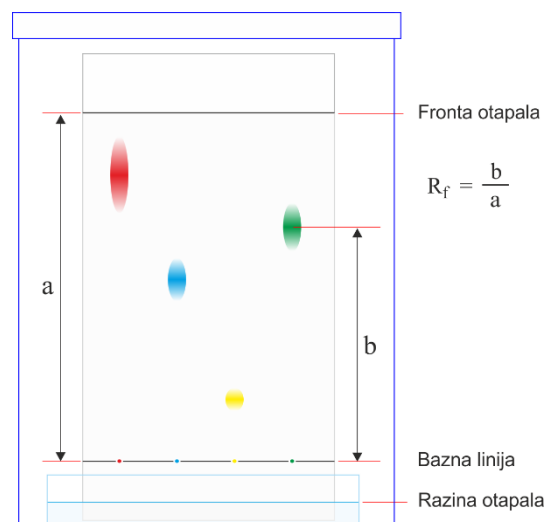
### **2.3.1. Kromatografija na papiru**

Kromatografija na papiru je vrsta kromatografije koja se izvodi na filter papiru koji također predstavlja i stacionarnu fazu. Mobilna faza predstavlja smjesu sastojaka u koju je svojim rubom uronjen filter papir po kojem sastojci smjese putuju različitim brzinama u smjeru širenja otapala kroz filter papir. Razdvajanje čestica se odvija na temelju topljivosti između vodene faze vezane za papir i netopljive organske faze.

Princip rada je da se na kromatografski papir običnom olovkom povuče svijetla tanka linija otprilike 2 cm od donjeg ruba papira, a zatim se na tu liniju nanese točkasto otopina ispitivanog



uzorka koristeći se kapilarom (promjera oko 1-2 mm), te se nanese uzorak mora osušiti. Razvijanje kromatograma započinje kada se kromatografski papir sa nanesenim uzorkom uroni u otapalo u komori za kromatografiju. Pritom je bitno pripaziti da startna linija s uzorkom bude iznad razine otapala u komori. Sastojci smjese putuju zajedno s otapalom prema gore, suprotno od smjera gravitacije zbog utjecaja kapilarne sile. Razvijanje kromatograma završava kada fronta otapala dosegne otprilike oko 2 cm do kraja papira, nakon čega se kromatografski papir izvadi iz komore, odmah se označe fronte otapala na papiru i ostavi se da se osuši na zraku. Obrada kromatograma se provodi identifikacijom pojedinog spoja na temelju njegove pokretljivosti na kromatografskom papiru što se izražava pomoću  $R_f$  vrijednosti.  $R_f$  vrijednost označava omjer udaljenosti koju je neka komponenta smjese prešla i udaljenosti koju je istovremeno prešlo otapalo (Slika 8.). Prednost ovakve kromatografije je što je praktična, jeftina, što se više uzoraka može istovremeno razdvajati i analizirati, te je sama detekcija jednostavnija.



**Slika 8.** Razvijanje kromatograma i određivanje  $R_f$  vrijednosti

(izvor: E. Generalic, <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=papirna+kromatografija>).

### 2.3.2. Tekućinska kromatografija

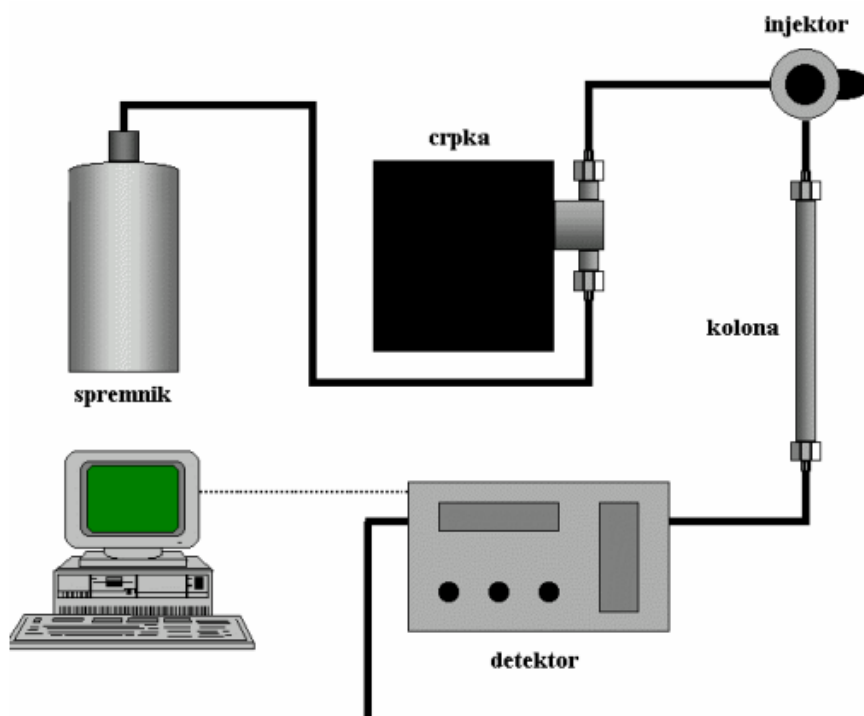
Tekućinska kromatografija (eng. liquid chromatography, LC) je vrsta kromatografije u kojoj je mobilna faza tekućina, dok se stacionarna faza sastoji od čvrstih čestica promjera od 150 do 200  $\mu\text{m}$ . Klasična tekućinska kromatografija provodi se u staklenim kolonama promjera od 10 do 50 mm te dužine od 50 do 500 cm.

Na vrh kolone nanosi se uzorak te se ispiru dodatkom otapala, odnosno mobilne faze, dok sami sastojci smjese i pokretna faza kroz kolonu putuju pod utjecajem gravitacije. Na kraju kolone skupljaju se frakcije, a otapalo (mobilna faza) se mora ukloniti, najčešće isparavanjem, a zaostala krutina se analizira. Tehnika tekućinske kromatografije u kojoj je veličina čestice nepokretne faze, tj. stacionarne faze od 5 do 10  $\mu\text{m}$  naziva se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC (Kirch-Leto, 2021).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) jedna je od najzastupljeniji i najkorisnijih analitičkih tehnika za razdvajanje sastojaka smjese, te se također široko primjenjuje u postupcima određivanja sastojaka proizvoda. Oblik tekućinske kromatografije na stupcu koji sadrži punila granulacije od 10  $\mu\text{m}$  i manje (zbog veće djelotvornosti kromatografske kolone) i koji zahtjeva za postizanje dovoljne brzine protoka upotrebu tlakova od nekoliko milijuna Pa. Analiza pomoću HPLC-a omogućava analizu polarnih i nepolarnih sastojaka u uzorcima, razlikuju se tekućinske kromatografije normalne faze u kojoj je mobilna faza manje polarna u odnosu na stacionarnu fazu, te ona reverzne faze gdje je mobilna faza polarnija u odnosu na stacionarnu fazu. Za razliku od ostalih analitičkih metoda ima univerzalnu primjenu (metoda analize većeg broja uzoraka), vrlo visoku preciznost (do  $\pm 0,5\%$ ), a zbog dostupnosti velikog broja raznovrsnih instrumenata i kolona omogućava analizu velikog broja različitih spojeva.

Najčešće se koristi za separaciju i kvantifikaciju pojedinih sastojaka smjese, kada treba izdvojiti velike molekule ili čestice koje se lako raspadaju pri visokim temperaturama, za analizu tragova nečistoća u čistim tvarima te za izolaciju čistih tvari za sintetičke ili identifikacijske svrhe. Provedba same analize u principu se temelji na određivanju masnih kiselina, triglicerida, sterola, ugljikovodika i alkohola, tj. svih spojeva koji daju specifičan profil nekog proizvoda. Osnovni dijelovi HPLC-a su kolona (10-30 cm, unutrašnjeg promjera 4-10 mm) sa punilima (promjer 5-10  $\mu\text{m}$ ), najčešće silikagel prevučen tankim organskim slojem koji se zatim kemijski ili fizikalno veže na površinu punila, zatim se sastoji od crpke

koja pokreće mobilnu fazu kroz kolonu, spremnika mobilne faze i sustava za obradu otapala (npr. za otplinjavanje) koji osim jednog otapala može omogućiti dva ili više otapala različitih polarosti, te od sustava za unošenje uzoraka (injektora), detekora (UV-VIS detektor, fluorescentni detektor, elektrokemijski detektor, detektor indeksa loma, spektrometar masa i dr.) sa pislačem, integratorom i računalom (Meyer, 2013.).

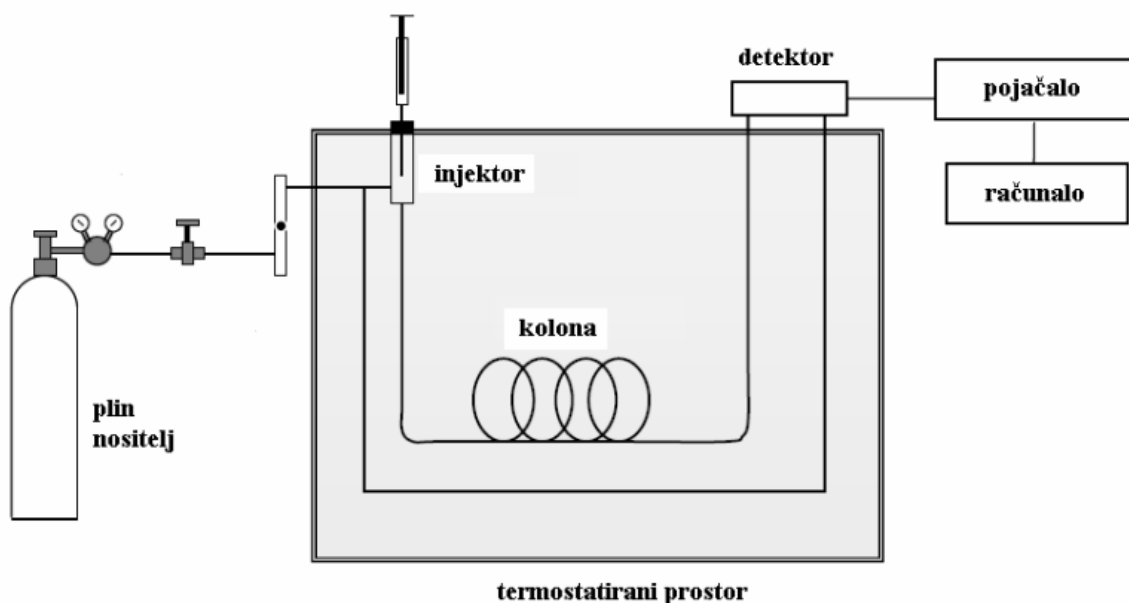


**Slika 9.** Shematski prikaz tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (Jerković i Radonić, 2009).

### 2.3.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. Gas Chromatography, GC) je metoda kojom se mogu odvajati i analizirati spojevi koji se prilikom isparavanja ne raspadaju, tj. tehnika odjeljivanja smjese hlapljivih spojeva. Većinom se koristi kako bi se ispitala čistoća smjese ili za odjeljivanje određenih sastojaka iz smjese, primjerice zaslađivača u soku od jabuke. Plinski kromatograf se sastoji od plina nositelja (inertni plin, najčešće helij, vodik i dušik) s regulatorom tlaka i mjeracem protoka, injektora (sustav za uštrcavanje uzorka najčešće uz pomoć mikrolitarske

igle), kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranom prostoru, detekora, pojačala i računala.



**Slika 10.** Shematski prikaz plinskog kromatografa (Jerković i Radonić, 2009).

Plinska kromatografija je tehnika kod koje je pokretna faza plin, a nepokretna faza tekućina ili krutina u koloni, a ovisno o prirodi nepokretne faze, odnosno fizikalno-kemijskim svojstvima na kojemu je zasnovano razdvajanje, možemo ih podijeliti na plin-čvrstu ili adsorpcijsku plinsku i na plin-tekućinsku ili razdjelnu plinsku kromatografiju. Kod plinsko-adsorpcijske kromatografije stacionarna (nepokretna) faza je čvrsta tvar velike specifične površine, gdje je kolona napunjena pogodnim adsorbensom, a sastojci smjese se razdvajaju na osnovi razlike u adsorpcijskom ponašanju između pokretne plinske i adsorpcijske faze. Kod plinsko-tekućinske kromatografije (engl. Gas-Liquid Chromatography, GLC) stacionarna faza je tekućina nanjena na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem, a kolona je napunjena poroznim čvrstim materijalom koji je prekriven tankim slojem neisparive tekućine. Brzina kojom će se ispitivani uzorak kretati kroz kolonu uvelike ovisi o tlaku i brzini kojom pokretna faza, tj. plin prolazi kroz kolonu, afinitetu sa kojim se uzorak veže na nepokretnu fazu, temperaturi i drugim uvjetima. Uzorak za plinsko-kromatografsku analizu mora biti hlapljiv, te se prevodi u hlapljivo stanje kako bi ispario u injektoru, zatim mora biti stabilan na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone s obzirom da kroz nju prolazi uz pomoć plina nositelja. Plin nositelj isparava sastojke smjese koji se odjeljuju na koloni, te se na izlasku iz

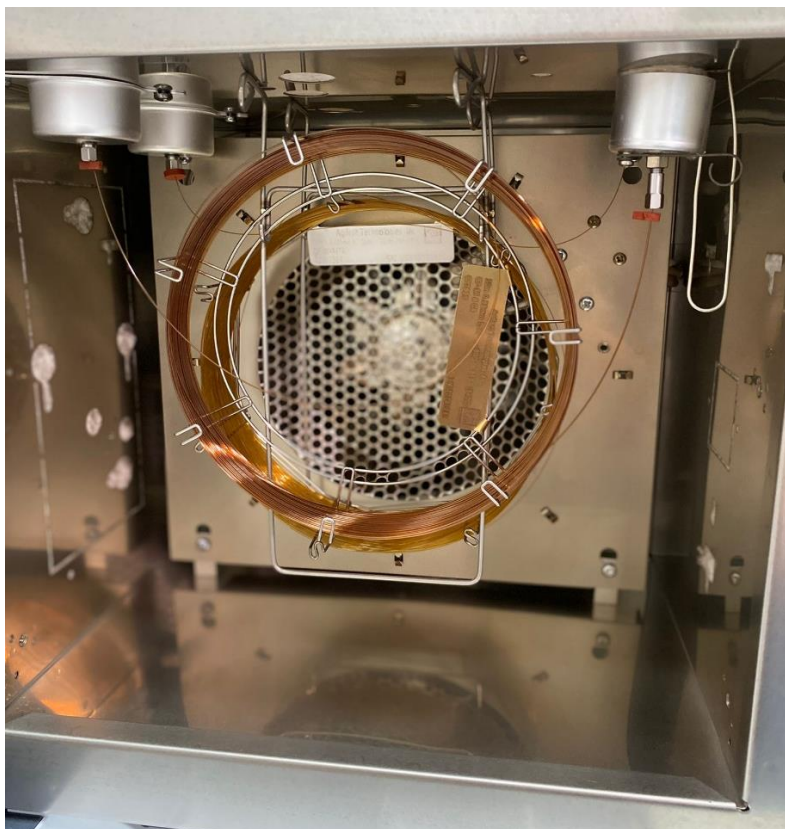
kolone nalazi detektor koji registrira prisustvo određenog spoja u ispitivanom uzorku, a uređaj automatski bilježi rezultate u obliku plinskog kromatograma (McNair i Miller, 1997).

S obzirom da plin nositelj (helij, vodik, dušik) nosi uzorak kroz kolonu do detektorskog sustava, on ne smije nikako utjecati na detektorski sustav što znači da mora biti vrlo visokog stupnja čistoće jer i samo najmanja nečistoća može dovesti u pitanje točnost analize. Pri izboru plina nositelja vodi se računa o izboru detektorskog sustava, njegovom stupnju čistoće, kao i drugim osobinama od kojih ovisi brzina i efikasnost razdvajanja. Brzina analize i vrijeme zadržavanja spoja u koloni ovisi o brzini protoka plina nositelja kroz kolonu i o difuziji uzorka u plinu nositelju. U plinskoj kromatografiji koriste se dvije vrste kolona koje se razlikuju po duljini i promjeru, punjene kolone sitnozrnatim punilom ili čvrstim nosačem na koji je nanesen tanki sloj stacionarne tekuće faze (0,05-1  $\mu\text{m}$ ) i kapilarne kolone sa tankim slojem stacionarne faze (otprilike 30  $\mu\text{m}$ ) na unutrašnjoj stijenci kolone dužine 10-100 metara.

Pri formiranju kromatografske kolone, bitan je pravilan odabir vrste čvrstog nosača, vrsta i količina tekuće nepokretne faze, dimenzija kolone i materijal od kojeg je napravljena kolona. Kolone mogu biti izrađene od različitog materijala, kao što su aluminij, nehrđajući čelik, bakar, staklo i dr. Primjerice staklene kolone su pogodne za razdvajanje nestabilnih spojeva kao što su steroidni hormoni koji bi se mogli u procesu kromatografije razlagati u kontaktu sa metalima. Kod punjenih kolona, najčešćih dimenzija 1-3 m  $\times$  3-6 mm, nepokretna tekuća faza imobilizirana je na granuliranoj podlozi. Kapilarne kolone su dulje, dimenzija 10-50 m  $\times$  0,25 mm (unutarnji promjer) gdje je unutarnja stijenka kapilare prevučena izravno ili preko tankog sloja poroznog čvrstog nosača tankim filmom tekuće nepokretne faze. Radi se o silikonskim cijevima čija je unutrašnja stijenka presvučena imobiliziranim stacionarnom fazom u tekućem obliku. Postoje različite vrste stacionarnih faza ovisno i o samoj prirodi analiziranog uzorka i potrebama analize, dok je najčešći čvrsti nosač dijatomejska zemlja (McNair i Miller, 1997).

Kolona je jednim krajem priključena na injektor, a drugim na detektorski sistem, tj. smještena je u termostatiranom prostoru, a zbog boljeg razdvajanja smjese temperatura kolone nije konstantna već se kontrolirano mijenja tijekom rada (obično linearan porast do određene temperature). Željena temperatura može dostići od 70°C do 400°C, međutim prije početka kromatografije kolona se grije na određenu temperaturu 12-24 sata uz protok samo plina nositelja u svrhu da se iz kolone uklone razne moguće nečistoće, te se takav postupak naziva kondicioniranje kolone. Punilo za kolone je ne hlapljiva tekućina (tekuća faza) koja je nanescena

na čvrsti nosač, a kao nosač najčešće se koristi dijatomejska zemlja, aktivni ugljen, silikagel, alumij-oksidi, itd.



**Slika 11.** Prikaz kolona u plinskom kromatografu (autor Kristina Bedeniković).

Tekućine koje se upotrebljavaju kao nepokretna faza moraju biti termički i kemijski stabilne, niske isparljivosti, s temperaturom vrelišta otprilike  $100^{\circ}\text{C}$  iznad tražene temperature kolone, da ne podliježu procesu oksidacije i dr. Nepokretne faze mogu se podijeliti na polarne i nepolarne gdje se za kromatografiju nepolarnih spojeva izabere nepolarna tekuća faza, a za polarne spojeve polarna nepokretna faza.

Plinskom kromatografijom mogu se razdvajati uzorci u sva tri agregacijska stanja, gdje se plinoviti uzorci unose u kromatografsku kolonu pomoću specijalnih plinskih kiviteta određenog volumena, a tekući uzorci i otopine unose se uz pomoć injektorskih šprica raznog volumena. Za otapanje čvrstih uzoraka koriste se hlapljiva otapala kao što su eter, alkoholi, kloroform, voda, itd., a oni se mogu direktno unositi u sistem za injiciranje uz upotrebu tehnike kapsule. Čvrsti uzorak se unese u metalnu kapsulu, zatvori se i ubaci u dio za unošenje uzoraka pomoću

posebnog sistema za unošenje uzoraka. Probuši se tako da plin nositelj istjera uzorak iz kapsule i unese u kolonu, te se taj dio posebno zagrijava kako bi uzorak prešao u plinovito stanje.

Plinski kromatogram predstavljaju registrirani signali koji dolaze sa detektora na sistem za registraciju-pisač, a registrirani signali nam pružaju kvalitativne i kvantitativne podatke o ispitivanom uzorku.

Prije početka kromatografije potrebno je odrediti neke uvjete i upisati točne podatke za temperaturu, brzinu protoka plina nositelja, brzinu protoka drugih plinova potrebnih za rad detektora, vrstu punila kolone, dimenziju kolone, koncentraciju tekuće faze, vrste detektora i dr. Svi gore navedeni podaci su obavezni kako bi se na snimljeni kromatogram mogli reproducirati dobiveni rezultati. Detektor plinskog kromatografa je uređaj koji u plinu nositelju može temeljem fizikalnih ili kemijskih promjena registrirati prisutnost isparene komponente i njenu količinu, te detektori moraju omogućiti selektivno i/ili osjetljivo dokazivanje. Osjetljivost detektora predstavlja najmanju količinu komponenta koja se može detektirati, a selektivnost razliku između odziva detektora za različite komponente u istoj koncentraciji.

U plinskoj kromatografiji općenito se koristi oko 40 raznih detektora, ali u principu u ovom slučaju najčešće se koriste dvije vrste detektora plamenoionizacijski detektor (FID) i detektor apsorpcije elektrona (ECD). Plamenoionizacijski detektor (engl. Flame Ionization Detector, FID) je jedan od najčešće korištenih detektora kod plinske kromatografije, kod ovog tipa detektora komponenta izlazi iz kolone sa plinom nositeljem miješa se sa zrakom i vodikom koji su mu potrebni za održavanje plamena, te u istom plamenu sagorijevaju. Prilikom sagorijevanja komponente dolazi do stvaranja iona i naglog protoka struje, što se registrira kao kromatografski signal u onom trenutku kad je komponenta napustila kolonu. Plamenoionizacijski detektor je vrlo osjetljiv na sve organske tvari, za razliku od neorganskih plinova i vode na koje ne reagira.

Detektor apsorpcije elektrona (engl. Electron Capture Detector, ECD) je posebna vrsta detektora koja se upotrebljava za uzorke koji sadrže atome ili atomske skupine sa velikim afinitetom za elektrone, te ova vrsta detektora ima vrlo nisku granicu detekcije za elektrofilne komponente, kao što su spojevi sa halogenim elementima. Detektor možemo predstaviti kao jednu komoru kroz koju prolazi samo plin nositelj koji se podvrgava ionizaciji, tj. elektroni migriraju do anode i stvara se stalna struja. On također sadrži radioaktivnu foliju, najčešće radioizotop  $^{63}\text{Ni}$  (Nikal) koji emitira  $\beta$ -čestice i koristi se za ionizaciju otopine adsorbata. Pri

prolazu plina nositelja sa uzorkom smanjuje se protok struje jer se nastali negativni ioni kreću sporije od elektrona, te se to smanjenje registrira kao signal. Nedostatak ECD-a je uzak raspon linearnog odziva te ograničena vrsta uzoraka koji su pogodni za detekciju (McNair i Miller, 1997).

## **2.4. SPEKTROMETRIJSKE ANALIZE U PIVARSKOJ INDUSTRIJI**

### **2.4.1. Analiza boje piva**

U prehrambenoj industriji, potrošači procjenjuju kvalitetu proizvoda po vanjskom izgledu i boji, kao primarnim pokazateljima kvalitete. Nakon proizvodnje, te tijekom samog skladištenja, transporta i prodaje boja piva mora ostati konstantna. Boja piva daje bitnu informaciju potrošaču kao što je da tamnije pivo sugerira jači okus i aromu, veći postotak alkohola i bogatiju punoću arome piva, dok je kod svjetlijih upravo obrnuto. Boja piva najviše ovisi o korištenim sastojcima, a slad je jedan od najvažnijih sastojaka te dolazi u različitim bojama, od blijede do tamnije boje. Na boju piva do neke mjere mogu utjecati metode proizvodnje piva, pa tako što se slad duže ukomljava, zrna ostaje dulje u kontaktu s vodom pa pivo postaje tamnije.

Također, koncentracija komponenata koje utječu na boju mogu se povećati tijekom proizvodnje slada, smanjiti tijekom fermentacije te se na kraju mogu prilagoditi krajnjim specifikacijama proizvoda dodavanjem karamele ili obojenog ekstrakta slada, a neki od načina bojenja piva su karamelizacija te Maillardove reakcije. Karamelizacija se odvija kod visokih koncentracija šećera te povišenih temperatura, odnosno to je reakcija raspada molekula šećera pri temperaturama višim od 120°C, te također ovisi o pH i vrsti šećera.

Tijekom kuhanja stvaraju se dodatni produkti Maillard-ovih reakcija gdje se tanini oksidiraju pa je zbog toga termičko izlaganje sladovine još veće, te sladovina postaje sve tamnije što znači da će i pivo biti tamnije boje. Boja piva izražava se u EBC jedinicama, te se prema njihovim vrijednostima pivo deklarira kao svijetlo pivo (intenzitet boje do 15 EBC jedinica), tamno pivo (intenzitet boje u rasponu 15-40 EBC jedinica), te crno pivo (ukoliko je intenzitet boje >40 EBC jedinica). Upotrebom različitih tipova sladova poput svijetlog, tamnog, karamelnog, ječmenog slada ili pšeničnog slada nastaju i različite vrste piva.



SRM	Beer Style	Beer colour	EBC
2	Pale lager, Witbier, Pilsener, Berliner Weisse		4
3	Maibock, Blonde Ale		6
4	Weissbier		8
6	American Pale Ale, India Pale Ale		12
8	Weissbier, Saison		16
10	English Bitter, ESB		20
13	Biere de Garde, Double IPA		26
17	Dark lager, Vienna lager, Marzen, Amber Ale		33
20	Brown Ale, Bock, Dunkel, Dunkelweizen		39
24	Irish Dry Stout, Doppelbock, Porter		47
29	Stout		57
35	Foreign Stout, Baltic Porter		69
40+	Imperial Stout		79

**Slika 12.** EBC mjere boje piva (The Red Lion, 2023).

Spektrofotometrija je primjenjiva na svim vrstama piva, a boja se određuje mjerenjem absorbancije piva koja je prethodno po potrebi razrijeđena i izbistrena na 430 nm u deset milimetara kvarcnoj kivetu. Uzorak piva mora biti temperiran na 20°C, te se zatim pivo filtrira preko naboranog filter papira preko lijevka kako bi odvojili strane čestice i spriječili raspršivanje svjetlosti. Zatim prije mjerenja ispitivanog uzorka, napuni se kiveta sa destiliranom vodom da se namjesti absorbancija na 0,00 potom se ispitivanim uzorkom ispere prvo kivetu, a zatim se napuni s istim i nakon toga se očitava absorbancija na uređaju.

#### 2.4.2. Analiza gorčine piva

Gorčina piva je specifični okusni profil u većini tipova piva, kao i pokazatelj stalne kvalitete, svako pivo ima specifičnu hmeljnu gorčinu i aromu, a određuje se mjerenjem udjela gorkih  $\alpha$  i  $\beta$ -kiselina u pivu spektrofotometrijskom metodom, te se izražava u jedinicama gorčine (BU). Gorčina piva može potjecati od hmelja (primarno), polifenola, proteina i kvasca, a ovisi o masi hmelja upotrijebljenog za hmeljenje sladovine, udjelu gorkih sastojaka, prvenstveno  $\alpha$ -kiselina u hmelju te njihovom iskorištenju, ovisno o temperaturi i trajanju kuhanja. Jedna BU jedinica označava gorčinu jednaku udjelu 1 mg  $\alpha$ -kiselina/l piva, a gorčina standardnih piva iznosi 25-30 BU jedinica. Ako je u ispitivanom uzorku prisutan kvasac, uzorak se mora izbistriti centrifugiranjem.

Rezultati mjerenja vrijede samo ako uzorak ne sadrži određene komponente, kao što su n-heptil-4-hidroksibenzoat, saharin, salicilnu i sorbinsku kiselinu zbog toga jer se ti spojevi također ekstrahiraju sa izooktanom i apsorbiraju elektromagnetsko zračenje pri 275 nm, ali njihovo prisustvo može biti detektirano jer mijenjaju oblik apsorpcijske krivulje. Kod određivanja gorkih tvari izooktanom, mora se pridržavati određenih mjera opreza. Prilikom pipetiranja svih kemikalija obvezno je koristiti propipetor ili pipetor, a za rukovanje kloridnom kiselinom, izooktanom te oktanolom koriste se rukavice od nitrilne gume, ne udisati pare, izbjegavati dodir sa supstancom, omogućiti ulazak svježeg zraka u zatvorene prostorije.

Priprema uzorka započinje da se uzorak temperira na temperaturu oko 20°C s obzirom da je to optimalna temperatura za analizu uzorka, svi oni koji su hladniji moraju se zagrijati u vodenoj kupelji. Ispitivane uzorke mora se otpliniti mućkanjem, nježno u početku i zatim snažno, sve dok plinovi više ne izlaze iz boce ispitivanog uzorka. Pritom se mora izbjeći gubitak pjene i dopustiti da se pjena vrati u uzorak prije uzrokovanja jer je pjena bogata gorkim tvarima. Uzorak ne smije biti mutan niti imati miris po pivu već mora imati miris po oktanolu, također ne smije na površini sadržavati ni male količine pjene. Princip rada započinje tako da se u odmjernu tikvicu odpipetira točno i bez pjenjenja 10 mililitara otplinjenog uzorka ili sladovine, te dodati 1 mililitar klorovodične kiseline i 20 mililitara izooktana. Zatvoriti odmjernu tikvicu staklenim čepom i staviti je na mehaničku mućkalicu u vertikalnom položaju. Mehanička mućkalice je podešena na minimalno 1250 rpm i snažno mućka odmjernu tikvicu 5 minuta pri sobnoj temperaturi, dok se mutni uzorci centrifugiraju pri 3000 rpm kroz 15 minuta. Nakon toga stoji 10 minuta da se emulzija u odmjernoj tikvici istaloži, te se zatim ostavi u mraku na 30 minuta.

Prije mjerenja gorčine uzorka spektrofotometar se kalibrira s čistim izooktanom, a potom se u kivetu treba pažljivo odpipetirati gornji bistri sloj da bi se izbjeglo prenošenje emulzije. Cijeli postupak se ponovi dva puta, a odstupanje između dva rezultata ne smije biti veće od 0,02. Rezultat se izražava kao BU vrijednost na jednu decimalu. Također je bitno napomenuti da se bistri sloj izooktana i gušći sloj emulzije gorčine odvajaju u posebne staklene boce gdje se kasnije izooktan može regenerirati i ponovno koristiti, dok se ostatak prebacuje u kanistre i odnosi na mjesto za opasni otpad. Važne napomene su ukoliko se doda previše oktanela (više od 2 kapi na 100 ml) može doći do nižih rezultata, tj. rezultati neće biti reprezentativni, ekstrakcija se mora započeti što je prije moguće nakon dodavanja kiseline u uzorak, te je važno pažljivo pratiti upute o korištenju, kalibraciji i održavanju spektrofotometra.

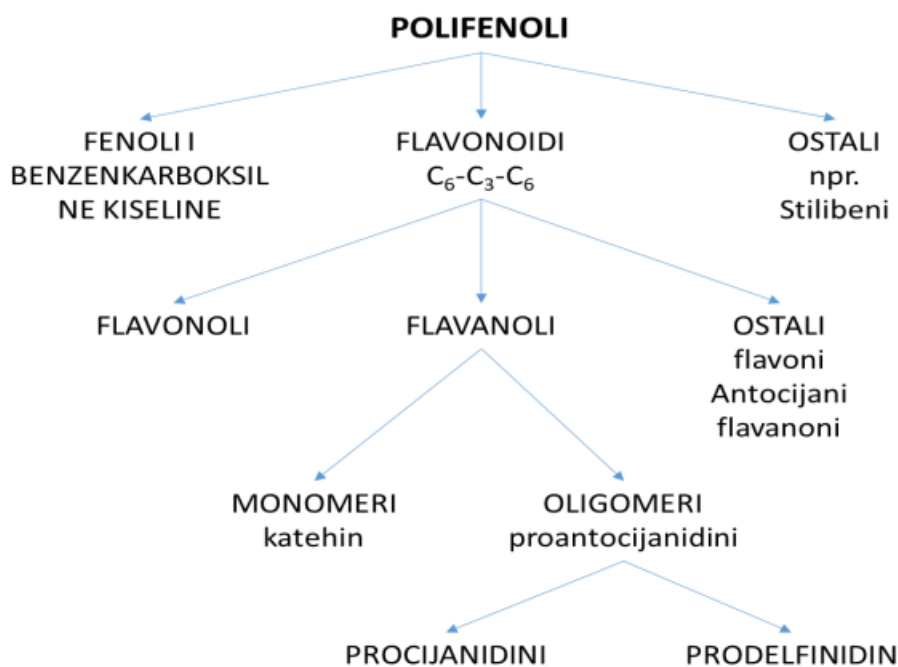
### 2.4.3. Analiza polifenola u pivu

Polifenoli su kemijski složeni spojevi, odnosno spojevi različitih kemijskih struktura od jednostavnijih hidroksicimetnih kiselina, antocijanina (biljni pigmenti) do složenijih tanina i flavonoida. Osnovna karakteristika svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova te su u prirodi prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Kod biljaka djeluju kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, imaju antibiotsko djelovanje, štite od UV zračenja i pridonose pigmentaciji biljaka. U namirnicama pridonose gorčini, ošttrini, boji, aromi, mirisu i oksidativnoj stabilnosti, a i imaju jako važnu ulogu u prevenciji humanih bolesti jer djeluju protuupalno, protualergijski i protukancerogeno (Berend i Grabarić, 2008). Polifenoli mogu imati negativan i pozitivan utjecaj na kvalitetu piva. Negativan jer sudjeluju u stvaranju hladnog taloga i posljedično uzrokuju замуćenje piva, dok s druge strane njihovo antioksidacijsko djelovanje pozitivno utječe na stabilnost okusa piva. Šišarica hmelja sadrži 2 do 5% polifenola u suhoj tvari koji se gotovo u cijelosti nalaze u vretencu i pricvatnim listovima (Kunze, 2010).

Većina polifenola u pivu podrijetlom je iz slada, no ipak oko 30% dolazi iz hmelja, a taj postotak može varirati ovisno o sorti i načinu uzgoja hmelja. Pivo je bogato različitim skupinama polifenola od koji su najznačajniji tanini (posebno u tamnim pivima), fenolne kiseline, flavoni, flavonoli i proantocijanidi. Svi ovi spojevi imaju važnu ulogu u formiranju okusa i arome piva, posebice gorčinu i trpkost. Flavonoidi u pivu (odgovorni za trpkost) poželjni su u koncentracijama između 1 do 20 mg/L, te piva koja imaju nižu pH vrijednost između 4-4,2 imaju izraženiju trpkost koja se povećava ako se pivo nepravilno skladišti.

Također, flavonoidi su velikim dijelom odgovorni za boju tamnih i crnih piva te mogu pridonositi i gorčini piva, no osnovna gorčina ipak dolazi iz hmelja. Antocijani spadaju u skupinu flavonoida koji u pivu potječu iz ječma. Tanini su esteri aromatskih hidroksikarboksilnih kiselina s viševalentnim alkoholima ili šećerima, a u pivo dospijevaju iz hmelja tijekom proizvodnje. Tanini imaju veliki utjecaj na samu kvalitetu i okus piva te tamna piva sadrže puno veću količinu tanina od svjetlijih što se i vidi tamnijom bojom piva i jačom gorčinom. Što se tiče fenolnih kiselina u pivu se nalaze benzojeva i cimetna kiselina i njihovi derivati koje oksidacijom prelaze u žute pigmente te ne utječu na okus i miris piva, ali su prekursori za hlapive fenolne spojeve. U kontaktu s kisikom fenolne tvari lako oksidiraju, a spojevi pridonose senzorskim svojstvima odnosno okusu (Collin i sur., 2013).

Također, polifenoli imaju utjecaj na stabilnost piva zbog reakcije između proteina i polifenola pri čemu dolazi do koloidne nestabilnosti piva što smanjuje rok trajanja piva, posebice tanini uz proteine i ugljikohidrate doprinose stvaranju mutnoće piva koja se može ukloniti filtracijom ili sedimentacijom. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u različitim uzorcima često se provodi u prehrambenoj industriji, a metoda koja se najčešće primjenjuje je spektrofotometrijska, najviše zbog jednostavnosti provođenja.



**Slika 13.** Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).

Princip rada započinje pripremom ispitivanog uzorka otplinjavanjem kako bi se u pivu oslobodio CO<sub>2</sub> mućkanjem boce. Mutna sladovina ili mlado pivo, tj. ispitivani uzorak sa fermentacije se centrifugira, nema potrebe za prethodnim filtriranjem. Uz glavnu probu mora se paralelno raditi i slijepa proba kako bi se isključio utjecaj kemikalija. U odmjernu tikvicu odpipetira se 10 ml uzorka i doda mu se 8 ml CMC-EDTA-otopine te se dobro promućka. Zatim se odpipetira 0,5 ml Fe-reagensa i opet dobro promućka, te se dodaje 0,5 ml razrijeđene otopine amonijaka i ponovno dobro promućka. Ako se radi o pivu sa fermentacije dodaje se prije amonijaka još 25 ml destilirane vode. Za slijepu probu također odpipetirati 10 ml uzorka u odmjernu tikvicu, te dodati iste kemikalije kao i za glavnu probu osim otopine Fe-reagensa i odmjernu tikvicu treba nadopuniti do oznake s destiliranom vodom.

Nakon 10 minuta stajanja mjeri se ekstinkcija na 600 nm spektrofotometrom. Važna napomena je da se uzorak sa kemikalijama dobro promućka. Zatim se prema dobivenim rezultatima izračuna ukupan sadržaj polifenola prema formuli  $P = A \times 820 \times F$ , gdje je P- ukupni sadržaj polifenola izražen u mg/L, A- absorbancija kod valne duljine 600 nm, te F- faktor razrijeđenja (množi se sa 2 ukoliko je uzorak sa fermentacije). Normalne vrijednosti ukupnih polifenola u pivu su od 150 do 200 mg/L.

#### **2.4.4. Analiza izooktana**

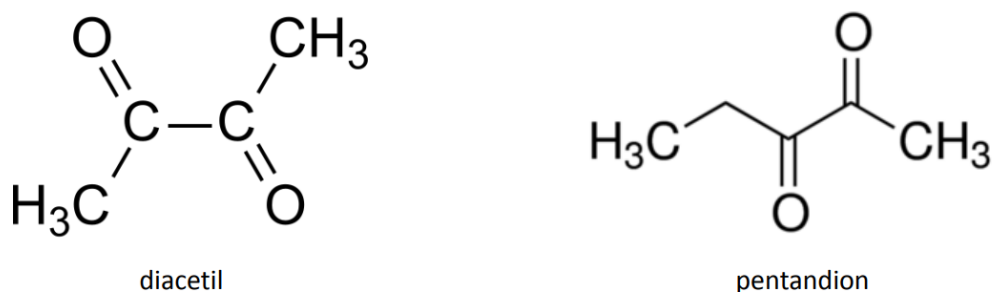
Izooktan je zasićeni ugljikovodik koji služi za određivanje oktanskog broja, tj. kao što je gore navedeno da je metoda koja se svakodnevno koristi pri određivanju gorkih tvari u pivu, uglavnom izo-  $\alpha$ -kiselina. Primjenjuje se za sve tipove izbistrene sladovine i sve tipove filtriranih piva, te je bitno napomenuti kako se jednom iskorišten izooktan može regenerirati te tako ponovno upotrebljavati. Postupak se radi u digestoru nakon što se sakupilo otprilike 2 litre iskorištenog izooktana, te se doda oko 20 g aktivnog ugljena. Izooktan s aktivnim ugljenom miješa se na mehaničkoj mućkalici u vertikalnom položaju otprilike 90 minuta. Nakon miješanja, smjesa se profiltrira kroz naborani filter papir, pritom se koristi sloj od barem tri filter papira položena jedan na drugoga kako bi se izbjeglo moguće probijanje aktivnog ugljena kroz filter papir. Uspješnost regeneracije filtriranog izooktana provjerava se na spektrofotometru provjerom njene absorbancije na 275 nm u 10 mm kvarcnim kivetama sa destiliranom vodom kao slijepom probom. Regenerirani izooktan morao bi imati absorbanciju manju od 0,010, ukoliko su vrijednosti veće potrebno je ponoviti postupak regeneracije.

## **2.5. KROMATOGRFSKE ANALIZE U PIVARSKOJ INDUSTRIJI**

### **2.5.1. Određivanje diacetila i pentandiona u pivu**

Komponente diacetil (2,3-butandion) i 2,3-pentandion su produkti koji se pojavljuju na početku fermentacije, a njihovi prekursori su  $\alpha$ -acetolaktat i  $\alpha$ -acetohidroksibutirat. Najveća konverzija u vicinalne diketone (diacetil i 2,3-pentandion) je tijekom prva četiri dana fermentacije, nakon čega dolazi do stvaranja drugih komponenti čime dolazi do smanjenja koncentracija diacetila i 2,3-pentandiona tijekom fermentacije i odležavanja. Važno je postići niske koncentracije ovih komponenti u konačnom proizvodu jer navedene komponente mogu biti glavni uzročnici off-flavora, a nekoliko razloga (npr. temperatura fermentacije, aeracija) mogu biti uzrok visoke koncentracije tih komponenti.

Iznad praga osjetljivosti pivu daju nečist, slatkast do odbojan okus na aromu maslaca. Stoga je tijekom same proizvodnje piva važno održavati optimalne vrijednosti kako bi se spriječili neugodni okusi, a i mirisi uzrokovani posebice diacetilom. Raspad vicinalnih diketona događa se paralelno sa ostalim reakcijama tijekom zrenja piva pa se zato smatra kao osnovni kriterij (indikator) za stupanj dozrelosti piva (Bamforth i sur., 2008).



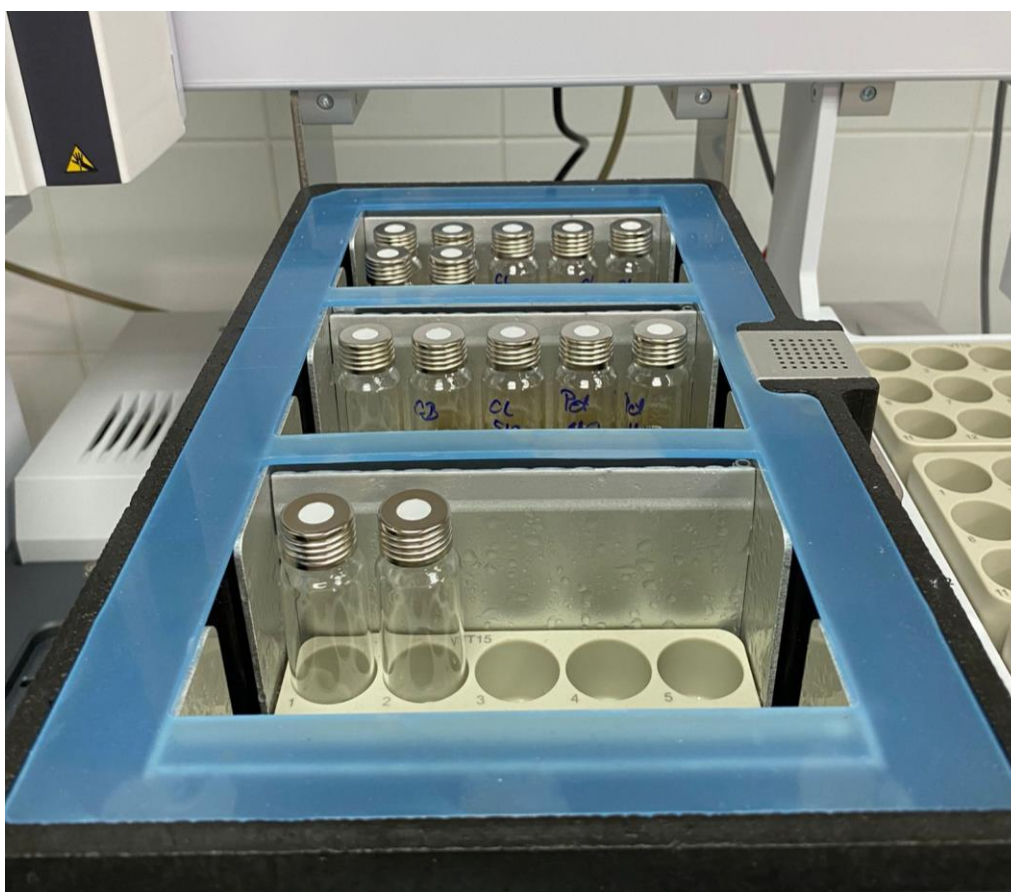
**Slika 14.** Spojevi arome mladog piva (Kunze, 2010).

Određivanje diacetila i 2,3 pentandiona plinskom kromatografijom provodi se za sva piva u kojima je koncentracija alkohola 5%, sa točnošću 0,5 %. Ukoliko pivo odstupa od navedenog volumnog udjela alkohola potrebno je uzorak prilagoditi sa dodatkom 99% etanola u slučaju nižeg postotka alkohola, i dodatkom destilirane vode u slučaju višeg. Nakon postizanja ravnoteže uzorka piva pri unaprijed određenoj temperaturi, dio plinovite faze se autosamplerom injektira u plinski kromatograf. Razdvajanje komponenata postiže se na kapilarnoj koloni, a za detekciju se koristi detektor apsorpcije elektrona (engl. Electron Capture Detector, ECD).

Kod uzorkovanja uzoraka piva u procesu proizvodnje ili piva napunjenog u ambalažu, poželjno je da headspace (prazan prostor iznad uzorka) bude što manji. Kako bi postigli što manji headspace tijekom uzorkovanja pivo se zapjeni, te će na taj način uzorak pretežno sadržavati CO<sub>2</sub> u headspace-u. Za dobivanje pouzdanih rezultata mjerenja bitna je sama priprema uzorka. Kada se radi o uzorku piva iz procesa proizvodnje, tj. fermentacije kvasac se mora ukloniti što je prije moguće nakon uzorkovanja centrifugiranjem. Uzorci koji su na sobnoj temperaturi moraju se prije analize ohladiti barem 3 sata u frižideru (2-6°C) ili staviti u led na 20 minuta kako bi se spriječilo prekomjerno pjenjenje uzorka.

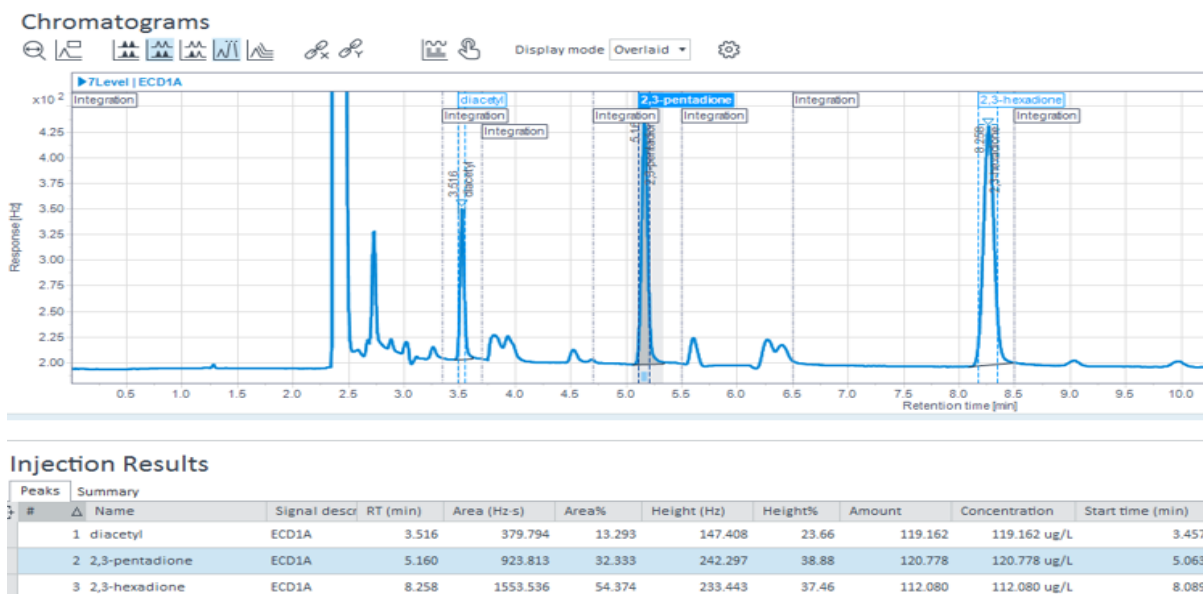
Jednom tjedno se priprema radna otopina internog standarda u odmjernej tikvici gdje se dodaje matrix otopina (otopina etanola u vodi) i stock otopina (etanol, 1-butanol, 4-heptanon, 2,3-

heksandion), te joj je rok upotrebe 7 dana. Analiza gotovog proizvoda započinje razrjeđenjem ukoliko je količina alkohola u gotovom proizvodu veća od 5,6%. U čistu suhu odmjernu posudu dodaje se 2 ml radne otopine internog standarda te se doda 250 ml hladnog uzorka piva, te se posuda promiješa i stavi u frižider na 5 minuta. Nakon toga uzima se 10 ml pripremljenog uzorka i odpipetira se u vialu koja se odmah zatvori čepom kako bi spriječili hlapljenje komponenta uzorka. Ako se radi o uzorku piva sa fermentacije, uzorak je potrebno centrifugirati kako bi se uklonio kvasac, te se za daljnju analizu uzima 10 ml supernatanta. Potom se uzorci stavljaju na plinski kromatograf.



**Slika 15.** Viale s uzorcima piva u plinskom kromatografu (autor Kristina Bedeniković).

Tri glavna koraka uključuju razdvajanje komponenata smjese injektiranjem uzorka, separacijom uzoraka na komponente (kapilarna kolona u pećnici) i detekcija komponenata u smjesi (detektor FID i ECD). Na slici 16. prikazan je kromatogram dobiven metodom određivanja diacetila i 2,3 pentandiona na plinskom kromatografu.



**Slika 16.** Primjer kromatograma dobivenog određivanjem diacetila i 2,3 pentandiona na plinskom kromatografu (autor Kristina Bedeniković).

### 2.5.2. Određivanje ostalih komponenata u pivu

Esteri i viši alkoholi su komponente koje zajedno sa acetaldehidom i dimetil sulfidom (DMS) značajno doprinose okusu i aromi piva. Esteri, viši alkoholi i DMS nastaju tijekom fermentacije, dok acetaldehid nastaje kao produkt alkoholne fermentacije u značajnoj količini tijekom primarne fermentacije, tj. on se iz stanice kvasca izlučuje u mlado pivo tijekom prva tri dana fermentacije, te je zaslužan za aromu mladog ili zelenog piva koja asocira na svježe i voćne note, a u većim koncentracijama može uzrokovati nepoželjnu aromu sličnu zelenoj jabuci. U daljnjem tijeku fermentacije razgrađuje se, a time se uklanja i aroma mladog piva. Acetaldehid je prisutan u najvećoj koncentraciji, te je bitan prekursor sinteze alkohola. Ukoliko na kraju fermentacije nema dovoljnog broja stanica kvasca nema ni pravilne redukcije acetaldehida u etanol jer kvasac na kraju fermentacije i tokom sazrijevanja apsorbira acetaldehid, te ga reducira u etanol. Viši alkoholi su skupina alkohola koji imaju duže ugljikove lance od jednostavnog etanola te su oni spojevi gotove, odnosno krajnje arome piva (Bamforth i sur., 2008).

Viši alkoholi se mogu formirati na nekoliko načina u kojima kvasac deaminacijom, dekarboksilacijom i redukcijom pretvara aminokiseline prisutne u sladovini u više alkohole, te također mogu nastati uz hidroksi- ili keto-kiseline kao posrednike i mogu se sintetizirati i iz



šećera preko acetata. Tijekom primarne fermentacije stvori se oko 80% viših alkohola, dok u fazi odležavanja dolazi do samo malog povećavanja njihove koncentracije. Ono što je bitno kod viših alkohola jest kontroliranje uvjeta tijekom fermentacije jer se ne mogu ukloniti uz pomoć normalnih tehnoloških mjera pa stoga njihova koncentracija u gotovom pivu mora biti umjerene količine kako bi pozitivno doprinijeli punoći piva, dok prekomjerne količine mogu izrazito negativno utjecati na kvalitetu, posebice na aromu i mogu uzrokovati oštar i neugodan miris gotovog proizvoda. Jedan od najvažnijih spojeva za aromu piva u grupi viših alkohola je izoamil koji utječe na pitkost piva, te povećanjem koncentracije izoamila pivo postaje sve manje pitko (Kunze, 2010).

Esteri su jedni od najvažnijih aromatskih spojeva u pivu i u najvećoj mjeri doprinose njegovoj ukupnoj aromi. Nastaju kao rezultat metabolizma kvasca, odnosno stvaraju se esterifikacijom masnih kiselina sa alkoholima tijekom fermentacije. Općenito, svi esteri podsvjesno utječu na aromu piva, te je njihovo stvaranje kompleksan proces kojeg je moguće kontrolirati uz pomoć brojnih parametara (temperatura, aeracija, količina kvasca pri inokulaciji, koncentracija ekstrakta, soj kvasca itd.) jer na njega utječu skoro svi tehnološki faktori. Otprilike oko 100 različitih estera je identificirano u pivu, a oni obično pridonose cvjetnim ili voćnim aromama. Umjerene količine estera mogu obogatiti samu aromu piva, ali prekomjerne količine mogu rezultirati pretjeranom voćnom aromom koju će većina potrošača smatrati nepoželjnom. Dva najvažnija estera koja aktivno sudjeluju u aromi piva su etil-acetat čija je dopuštena koncentracija oko 15 mg/L, a daje aromu po otapalu, dok je kod drugog najvažnijeg estera izoamil-acetata dopuštena koncentracija od 1,0-1,9 mg/L, te daje aromu na bananu. Dimetil sulfid (DMS) je sumporna komponenta koja se smatra off-flavourom (okus po kuhanom povrću ili kuhanom kukuruzu) u pivu kod velikih koncentracija. DMS u pivo dolazi iz slada, tj. tijekom procesa kuhanja sladovine u varionici dolazi do raspada prekursora dimetil sulfida i stvaranja slobodnog dimetil sulfida. Tijekom fermentacije piva kvasac reducira dimetil sulfooksid (DMSO) koji se u protivnom može pretvoriti u DMS u gotovom proizvodu, a najviše DMS-a se izbacuje tijekom tople fermentacije te sa produljenjem vremena dozrijevanja. Razina DMS-a u pivu se također može povećati kontaminacijom bakterijama koje su štetne za kvalitetu piva (*Lactobacillus*, *Pediococcus*).

Sam način, priprema i čuvanje uzorka je identična kao i kod određivanja diacetila i 2,3 pentandiona, dok se razdvajanje ostalih gore navedenih komponenata postiže na polarnoj koloni, a za detekciju se koristi plamenoionizacijski detektor (engl. Flame Ionization Detector,

FID). Na slici 17. prikazan je tipični kromatogram i pripadajući rezultati dobiveni određivanjem ostalih komponenti arome piva plinskom kromatografijom.



**Slika 17.** Primjer kromatograma i pripadajućih rezultata kod određivanja ostalih komponenti arome piva na plinskom kromatografu (autor Kristina Bedeniković).

### 3. ZAKLJUČAK

Konstantno praćenje i nadzor kvalitete proizvoda je izuzetno bitno kako bi osigurali da proizvod na tržištu uvijek bude jednake i visoke kvalitete. Svaki od navedenih parametara koji se određuje ovim fizikalno-kemijskim analizama ima svoju specifikaciju, tj. granične vrijednosti koje nam ukazuju na kvalitetni i održiv proizvodni proces ukoliko su ti parametri zadovoljeni. U slučaju odstupanja od navedenih vrijednosti kontrola kvalitete je zadužena za blokiranje proizvoda, odnosno ne dozvoljava njegov izlazak na tržište bez dodatnih analiza i akcija potrebnih da se spriječe takvi mogući problemi u daljnjoj proizvodnji. Sa takvim načinom rada osiguravamo zadovoljstvo i sigurnost potrošača, te smanjujemo rizik od mogućih reklamacija na proizvod.

Spektrometrijske i kromatografske metode su jedne od bitnijih metoda određivanja tvari u većini industrija, pa tako i u proizvodnji piva. Kvalitetna edukacija radnika i redovito održavanje i kalibracija uređaja osiguravaju nam konstantu u točnosti analiziranja uzoraka te s time i stabilnu kvalitetu proizvoda. Kromatografija je pronašla primjenu u kemiji, farmaciji, biologiji i biomedicini, te se kromatografskim metodama mogu izdvojiti jako male količine tvari i koje nam mogu dati pravovremenu informaciju o sastavu neke namirnice ili materijala (okusne i mirisne komponente, masne kiseline, aminokiseline, određivanje autentičnosti hrane, opasne komponente itd.). Spektrometrijske metode analiziranja su pronašle primjenu u forenzici, biokemiji, farmaciji, prehrambenoj industriji, te su postale jedna od obavezno korištenih metoda analiziranja i dokazivanja pojedinih tvari.

## 5. LITERATURA

1. Kirch-Leto, A. (2021): Određivanje kvalitete hrane, Završni rad, Odjel za kemiju Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek.
2. Bamfort, C.W., Russel, G., Stewart, A. (2008): Beer: A Quality Perspective - A Volume of the Handbook of Alcoholic Beverages Series (Russell, G., Bamforth, C.W., Stewart, A., ured.), Elsevier, Amsterdam
3. Berend, S., Grabarić Z. (2008): Određivanja polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
4. Collin, S., Jerkovic, V., Brohan, M., Callemien, D. (2013): Polyphenols and Beer Quality, Springer
5. Hrvatska enciklopedija (2021),  
<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=71130>, (15.08.2023.)
6. Jerković, I., Radonić, A. (2009): Praktikum iz organske kemije (za preddiplomski studij kemije i kemijske tehnologije), Split.
7. Kunze, W. (2010): Tehnology brewing and malting, VLB Berlin, Germany.
8. McNair, H.M., Miller, J.M. (1997): Basic Gas Chromatography, Techniques in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc.
9. Meyer, R. V. (2013): Practical High-Performance Liquid Chromatograph, John Wiley and Sons, Ltd., United Kingdom.
10. Tomljanović, M. (2000): Instrumentalne kemijske metode I dio, Hijatus, Zenica. ISBN 9958 – 716 – 03 – 8.
11. The Red Lion (2019): Beer colour standards,  
<https://redlionkegworth.co.uk/2019/11/beer-standard-reference-method-and-european>  
(20.09.2023.)