Kemijska analiza hlapljivih spojeva craft piva ''Mrka''

Sinovčić, Danica

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:152438

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU

KEMIJSKA ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA CRAFT PIVA "MRKA"

ZAVRŠNI RAD

DANICA SINOVČIĆ

Matični broj: 32

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

KEMIJSKA ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA CRAFT PIVA "MRKA"

ZAVRŠNI RAD

DANICA SINOVČIĆ

Matični broj: 32

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE UNIVERSITY STUDY OF FOOD TEHNOLOGY

CHEMICAL ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS OF CRAFT BEER "MRKA"

BACHELOR THESIS

DANICA SINOVČIĆ

Parent number: 32

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada: je prihvaćena na 32. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko – tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

KEMIJSKA ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA CRAFT PIVA "MRKA"

DANICA SINOVČIĆ, 32

Sažetak:

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva craft piva „Mrka". Tijekom proizvodnje craft piva „Mrka" dodani su začini poput metvice, cimeta, muškatnog oraščića i čokolade radi poboljšanja mirisa i okusa piva. Hlapljivi spojevi izolirani su dvjema različitim metodama: mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) s dva različita vlakna te kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće s organskim otapalom te su analizirani spregnutom tehnikom plinska kromatografija–spektrometrija masa (GC-MS) u cilju usporedbe sličnosti i razlika dobivenih rezultata. SPME metodom identificirano je 37 različitih spojeva dok je kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće identificirano njih 23. Identificirani spojevi mogu se svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, esteri, alkaloidi, terpenski spojevi i ketoni.

Ključne riječi: craft piva, hlapljivi spojevi, GC-MS, HS-SPME, ekstrakcija

Rad sadrži: 34 stranice, 12 slika, 19 literalnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ante Prkić	predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	član
3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član-mentor

Datum obrane: 23. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate study Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology. Session no. 32.

Mentor: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.

CHEMICAL ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS OF CRAFT BEER "MRKA"

DANICA SINOVČIĆ, 32

Abstract:

In this paper, the chemical composition of volatile compounds of craft beer "Mrka" is analyzed. During the production of craft beer "Mrka", spices such as mint, cinnamon, nutmeg and chocolate were added to improve the smell and taste of beer. The volatile compounds were isolated by two different methods: solid phase peak extraction microextraction (HS-SPME) with two different fibers and continuous liquid-liquid extraction with an organic solvent, and were analyzed by the gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) conjugation technique for comparison. similarities and differences in the results obtained. 37 different compounds were identified by the SPME method, while 23 were identified by the continuous liquid-liquid extraction method. The identified compounds can be classified into the following chemical groups: alcohols, esters, alkaloids, terpene compounds and ketones.

Keywords: craft beers, volatile compounds, GC-MS, HS-SPME, extraction

Thesis contains: 34 pages, 12 figures, 19 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ante Prkić, PhD, associate prof.	chairperson
2. Ani Radonić, PhD, associate prof.	member
3. Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.	supervisor

Defence date: September 23rd, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad izrađen je u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od studenog 2019. godine do veljače 2020. godine.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz uzorka craft piva “Mrka”.

U tu svrhu bilo je potrebno:

- Izolirati hlapljive spojeve uzorka craft pive “Mrka” pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, koristeći dva vlakna i to:
    - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm,
    - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm.
    -
- Također izolirati hlapljive spojeve uzorka craft piva ”Mrka” pomoću ekstrakcije tekuće-tekuće s organskim otapalom lakšim od vode.

- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) te usporediti dobivene rezultate.

SAŽETAK

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva craft piva „Mrka“. Tijekom proizvodnje craft piva „Mrka“ dodani su začini poput metvice, cimeta, muškatnog oraščića i čokolade radi poboljšanja mirisa i okusa piva. Hlapljivi spojevi izolirani su dvjema različitim metodama: mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) s dva različita vlakna te kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće s organskim otapalom te su analizirani spregnutom tehnikom plinska kromatografija–spektrometrija masa (GC-MS) u cilju usporedbe dobivenih rezultata. SPME metodom identificirano je 37 različitih spojeva dok je kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće identificirano njih 23. Identificirani spojevi mogu se svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, esteri, alkaloidi, terpenski spojevi i ketoni.

Ključne riječi: craft piva, hlapljivi spojevi, GC-MS, HS-SPME, ekstrakcija

SUMMARY

In this paper, the chemical composition of volatile compounds of craft beer "Mrka" is analyzed. During the production of craft beer "Mrka", spices such as mint, cinnamon and nutmeg as well as chocolate were added to improve the smell and taste of beer. The volatile compounds were isolated by two different methods: headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibers and continuous liquid-liquid extraction with an organic solvent, and analyzed by the gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) in order to compare the obtained results. 37 Different compounds were identified by the HS-SPME method, while 23 were identified by the continuous liquid-liquid extraction method. The identified compounds can be classified into the following chemical groups: alcohols, esters, alkaloids, terpene compounds and ketones.

Key words: craft beers, volatile compounds, GC-MS, HS-SPME, extraction

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 4

2.1. GLAVNI SASTOJCI 4

2.2. PROIZVODNJA CRAFT PIVA 6

2.3. METODE IZOLACIJE HLAPLIVIH SPOJEVA 8

2.3.1. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI 8

2.3.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE 8

2.4. METODE ANALIZE HLAPLJIVIH SPOJEVA 9

2.4.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA 9

2.4.2. SPEKTROMETRIJA MASA 10

2.4.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA 12

3. EKSPERIMENTALNI DIO 13

3.1. OPĆE KARAKTERISTIKE PIVA “MRKA” 13

3.2. APARATURA I KEMIKALIJE 14

3.3. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE 15

3.4. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI 16

3.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA 18

4. REZULTATI 20

4.1. PRIKAZ REZULTATA 20

5. RASPRAVA 29

6. ZAKLJUČAK 32

7. LITERATURA 33

1. UVOD

Pivo je jedno od najpopularnijih alkoholnih pića u svijetu *(1)* dobiveno alkoholnim vrenjem. Za proizvodnju piva dovoljna su četiri osnovna sastojka – voda, slad, hmelj i kvasac.

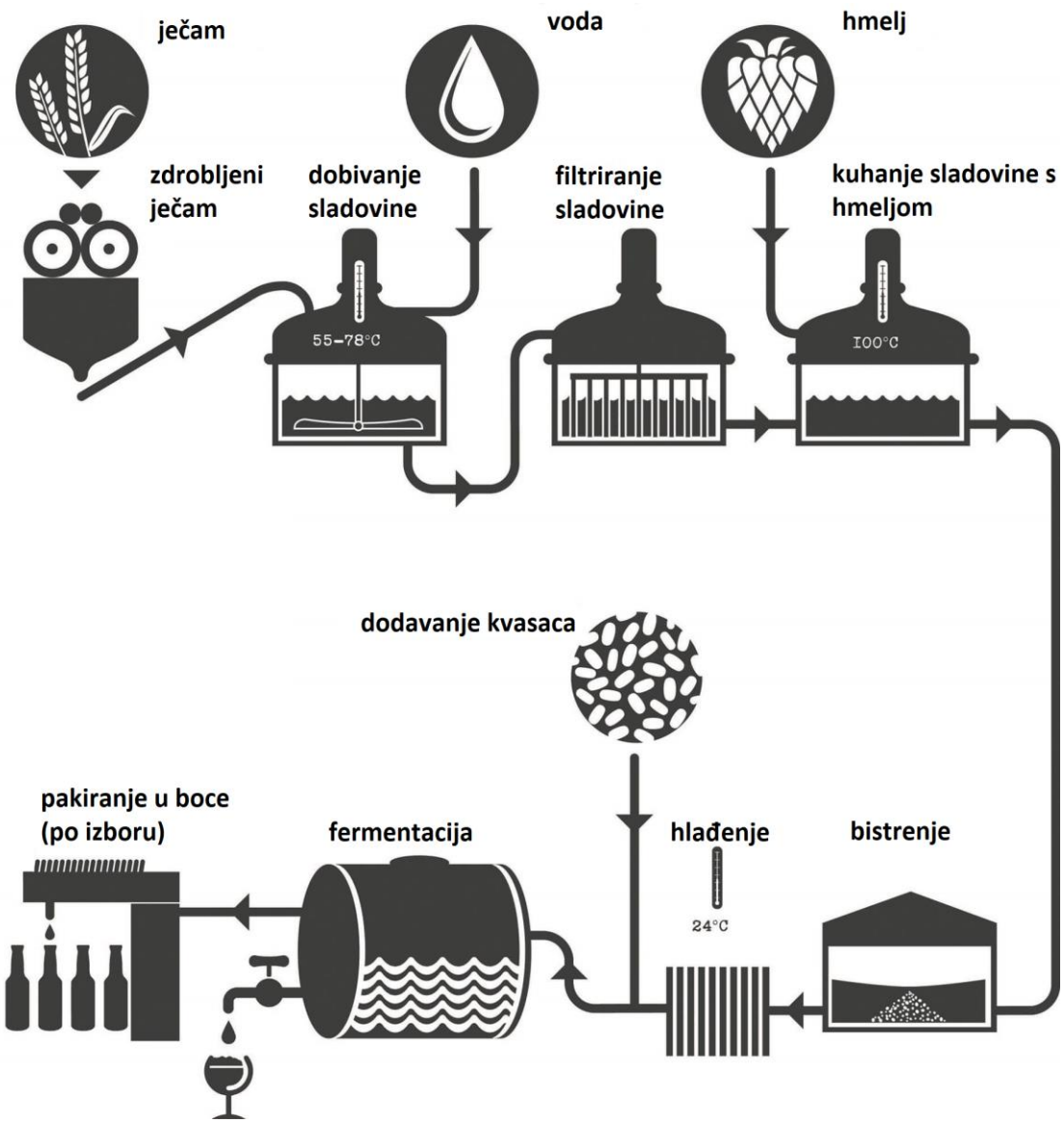
Najpoznatija piva se proizode u pivovarama u velikim količinama i nazivaju se komercijalnim pivima. Međutim, u zadnjih dvadesetak godina potrošači su se sve više zainteresirali za takozvana craft piva kojima je naglasak na kvaliteti. Craft piva se izrađuju u craft pivovarama po izvornim tradicionalnim recepturama u malim količinama stoga ne postoji jedinstvena definicija craft piva. Jedna od glavnih karakteristika craft piva je da su nefiltrirana i nepasterizirana. Prema Američkoj udruzi pivara (ABA) craft pivovara je mala, neovisna i tradicionalna. Riječ mala definira veličinu (godišnja proizvodnja manja od 6 milijuna barela), neovisna definira vlasništvo (manje od 25% u vlasništvu ili pod nadzorom člana alkoholne industrije koji sam po sebi nije zanatski proizvođač piva), a tradicionalna se odnosi na proizvodnju piva u kojoj 50% ili više piva dobiva svoj okus po „tradicionalnim“ ili „inovativnim“ sastojcima i njihovoj fermentaciji. Evo nekoliko pojmova koji se odnose na craft pivo i craft pivovare:

- Craft pivovari su mali pivari.
- Značajka craft piva i craft pivara je inovacija. Craft pivari tumače povijesne stilove jedinstvenim preokretima i razvijaju nove stilove koji nemaju presedan.
- Craft pivo obično se proizvodi s tradicionalnim sastojcima poput sladnog ječma; zanimljivi i ponekad netradicionalni sastojci dodaju se često zbog prepoznatljivosti.
- Zanatske pivare obično su vrlo uključene u svoje zajednice kroz filantropiju, donacije proizvoda, volonterizam i sponzorstvo događaja.
- Craft pivari imaju karakteristične, individualne pristupe povezivanja sa svojim kupcima.

- Craft pivovari održavaju integritet prema svome proizvodu i neovisnost *(2)*.

Razlog zbog kojeg bi se potrošač okrenuo craft pivima, osim kvalitete, je i velika raznolikost okusa. Sve više se u pivo dodaju različite arome voća i biljaka stvarajući jedinstven, novi i zanimljivi proizvod čime se povećava tržište.

Pivo se dobiva alkoholnim vrenjem vodenog ekstrakta slada uz dodatak hmelja. Prvo se kuha slad s vodom kako bi došlo do ekstrakcije i hidrolize šećera. Zatim se taj vodeni ekstrakt kuha zajedno s hmeljom kako bi se pivo konzerviralo i dobila željena gorčina. Time se dobije sladovina koja se hladi i taloži. Nakon taloženja slijedi alkoholno vrenje ili fermentacija koja traje nekoliko dana ovisno o željenoj količini alkohola, vrsti slada, hmelja i kvasaca. Za vrijeme fermentacije kvasci cijepaju jednostavne šećere na alkohol i ugljikov dioksid. Nakon procesa fermentacije pivo se stabilizira i po želji mu se dodaju različite arome, a često se i dodatno propuhuje sa CO_2. Nakon što je postignut željeni okus piva, ono je spremno za punjenje.



Slika 1. Tehnološka shema proizvodnje craft piva *(3)*

https://www.pravda.beer/wp-content/uploads/2015/12/shema-eng-1.jpg

2. OPĆI DIO

2.1. GLAVNI SASTOJCI

Voda je količinski najzastupljeniji sastojak piva. Kakvoća vode utječe na okus i procese proizvodnje, stoga moramo poznavati sastav vode. Osnovni pokazatelji kakvoće vode su fizikalno-kemijski pokazatelji, pokazatelji režima kisika i biološki pokazatelji. Najutjecajniji pokazatelj u proizvodnji piva je kemijski pokazatelj – tvrdoća. Tvrdoća vode ovisi o koncentraciji metalnih kationa. Najzastupljeniji metalni kationi u vodi su kalcij i magnezij, a vrlo malo se javlja željezo, mangan i stroncij (*4)*. Ti kationi utječu na enzimske i kemijske reakcije u proizvodnji na način da reguliraju pH vode.

U svijetu postoji više primjera gdje je upravo voda zaslužni čimbenik određenog okusa pive, poput burtonske regije Burton gdje imamo tvrdu vodu, meku vodu Pilsena ili pak čistu izvorsku vodu Rocky Mtn *(5)*.

Hmelj je cvijeće biljke koje služi kao konzervans u proizvodnji pive, a utječe na gorčinu, aromu i okus pive. Danas imamo mnoge vrste hmelja, a ovisno o svojoj funkciji dijele se na vrste koje utječu na gorčinu i aromu.

Hmelj se dodaje u dvije faze, prva faza koja se naziva „*First wort hopping*“, događa se za vrijeme kuhanja vodenog ekstrakta za dobivanje sladovine, a druga faza „*Dry hopping*“ događa se nakon fermentacije.

U prvoj fazi hmelj se dodaje na početku kuhanja vodenog ekstrakta. Optimalno vrijeme kuhanja hmelja zajedno s vodenim ekstraktom je 60 minuta. Ovdje dodajemo vrste hmelja koje želimo da utječu na gorčinu piva, postižući željenu ravnotežu sa šećerima iz slada. Događa se izomerizacija α kiselina, a s obzirom na visoku temperaturu kuhanja svi aromatični spojevi ishlape i na taj način ne utječu na aromu piva.

Drugo dodavanje se događa oko 30 minuta prije kraja kuhanja vodenog ekstrakta u sladovinu. Ovdje se nastoji postići ravnoteža između izomerizacije α kiselina i isparavanja aromatičnih sastojaka iz hmelja što rezultira specifičnim okusom piva.

Treće dodavanje se događa 15 minuta prije kraja kuhanja ili kada se kuhanje završi u svrhu koncentriranja aromatičnih spojeva u dobivenoj sladovini.

U drugoj fazi hmelj se dodaje nakon završetka fermentacije kako bi se pospješila ekstrakcija hlapljivih spojeva u pivu formirajući željenu aromu *(5)*.

Kvasac pivski kvasac (*Saharomyces cerveisiae*) je gljivica koja se može i ne mora razmnožavati uz prisutnost kisika. Biokemijska razgradnja fermentabilnih šećera na etanol i ugljikov dioksid uz pomoć kvasca bez prisutnosti kisika naziva se alkoholno vrenje ili fermentacija. Reakcijom fermentacije formiraju se i drugi spojevi kao što su ketoni i esteri koji daju voćne note te fenoli koji daju ljute note. Dvije glavne vrste kvasca su ALE kvasci (kvasci gornjeg vrenja) kod kojih se vrenje zbiva na vrhu fermentora pri temperaturi od 12 °C i LAGER kvasci (kvasci donjeg vrenja) kod kojih se fermentacija zbiva pri dnu fermentora na nižim temperaturama od oko 5°C. Isto tako razlikuju se dva oblika u kojima dolazi kvasac, suhi (dehidrirani) i tekući. Danas postoji puno sojeva kvasaca, a svaki soj rezultira drugim okusom. Upravo je izbor kvasca najčešće zaslužan za različite okuse u različitim pivima *(5)*.

Slad je sirovina koja se dobiva procesom sladovanja. Sladovanje je proces u kojemu se žitarica natapa i suši kako bi se pospješilo klijanje biljke iz sjemena. Klijanjem sjemena aktiviraju se enzimi koji pretvaraju škrob i proteine u aminokiseline i šećere *(5)*. Osušena slad koristi se za dobivanje piva na način da se kuha s vodom kako bi se pospješila ekstrakcija šećera i dobio vodeni ekstrakt. Žitarice koje se koriste u procesu sladovanja su najčešće ječam, a zatim pšenica, ali može se koristiti i kukuruz, riža, raž ili proso.

Hlapljivi spojevi u pivi su organski spojevi koji pri standardnim uvjetima imaju visoki tlak para kao rezultat niske točke vrelišta, zbog čega lako dolazi do njihovog isparavanja ili sublimacije *(6)*.

Tijekom alkoholnog vrenja kvasci stvaraju poželjne i nepoželjne spojeve. Nepoželjni spojevi poput aldehida i vicilnih ketona daju neugodan okus i miris, ali iste te kvaščeve stanice imaju sposobnost redukcije tih spojeva, ponovno ih asimiliraju i reduciraju u butan-2,3-diol i pentan-2,3-diol čiji je prag osjetljivosti visok pa vrlo malo utječu na okus. Što se tiče poželjnih spojeva, upravo svi oni zajedno sa spojevima iz hmelja i slada stvaraju potpuni okus i aromu piva. Viši alkoholi predstavljaju najveći dio

hlapivih komponenata u pivu, čak preko 90%, a to su spojevi poput izobutanola, 2-metilbutanola, propanola, izoamil-alkohola, feniletanola i tirozola. Najvažniji organski spojevi za formiranje arome su esteri. Nastaju prilikom fermentacije i ima ih više od 100. Dva su glavna faktora koja utječu na sintezu estera, temperatura i kisik. Veća temperatura rezultira većom sintezom estera. Povećanje kisika potiče sintezu nezasićenih masnih kiselina što smanjuje aktivnost alkohol acil transferaze koja sada mora sudjelovati u reakcijama sinteze nezasićenih masnih kiselina, a ne u sintezi estera. Najvažniji esteri su etil-acetat, izomil-acetat, izobutil-acetat, etil-kaprilat i etil-kaproat. Polifenoli su spojevi koji su odgovorni za antioksidativni učinak piva. Ovise o kvaliteti sirovine i vođenju tehnološkog procesa. U pivu je identificirano oko četrdeset sedam spojeva. Utječu na boju, okus, bistrinu, stabilnost pjene. Zbog svojih antioksidativnih svojstava mogu zaštiti pivo od oksidativne degradacije, no mogu utjecati i negativno na koloidnu stabilnost. Oko 70-80 % ih dolazi iz slada, a 20-30 % iz hmelja. Iz ječma odnosno slada dolaze fenolne kiseline (derivati benzojeve i cimetne), flavanoidi, proantocijanidini, tanini, amino fenolni spojevi. Fenoli iz hmelja su reaktivniji. Tu spadaju fenoli i polifenoli poput galne, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske i *p*-kumarinske kiseline *(7)*.

2.2. PROIZVODNJA CRAFT PIVA

Proces proizvodnje craft piva sastoji se od dobivanja sladovine i proizvodnje piva iz sladovine.

Proizvodnja sladovine započinje pripremom ječma koji se sastoji od čišćenja, sortiranja, močenja, klijanja, sušenja i poliranja, a sve u svrhu dobivanja slada. Proizvodnju sladovine najlakše možemo objasniti u četiri osnovna koraka:

1. Drobljenje slada - kako bismo pospješili ekstrakciju škroba

2. Ukomljavanje ili ekstrakcija slada – koja se sastoji od:

- klajsterizacije – gdje zagrijavamo kominu toplom vodom kako bi škrobna zrnca nabubrila i pukla stvarajući škrobno ljepilo

- utoćavanja – za vrijeme kojeg se otapa škrobno ljepilo
- šećerenja – koje predstavlja razgradnju (hidrolizu) otopljenog škrobnog ljepila

3. Kuhanje sladovine s hmeljom – kako bismo konzervirali sladovinu i dobili željenu gorčinu iz hmelja

4. Hlađenje i bistrenje sladovine – hlađenje koje se najčešće provodi pomoću izmjenjivača topline kako bi sladovina bila spremna za vrenje (fermentaciju).

Nakon što smo dobili sladovinu krećemo na proces proizvodnje piva koji se u craft pivu razlikuje od komercijalnog po tome što nema koraka pasterizacije i filtracije nakon fermentacije.

Tehnologija dobivanja piva se sastoji od:

1. Alkoholnog vrenja ili fermentacije – biokemijski proces u kojemu pri anaerobnim uvjetima uz pomoć djelovanja kvasaca iz šećera primarno dobivamo alkohol i ugljikov dioksid, a sekundarno ostale spojeve koji formiraju okus i aromu piva. Ovaj proces traje nekoliko dana pa sve do 2 tjedna.

2. Bistrenje i pretakanje piva – pretakanje piva u drugi fermentor u svrhu hlađenja i stabilizacije.

3. Punjenje – kao završni proces cijelokupne proizvodnje, gdje gotov proizvod punimo u za to namijenjenu ambalažu *(5)*.

2.3. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

2.3.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi je metoda koja se koristi zbog svoje jednostavnosti i brzine bez korištenja otapala, a izuzetno je uspješna za izolaciju hlapljivih spojeva. Otkrio ju je Janusz Pawliszyn 1989. godine. Vrlo je djelotvorna metoda, a najčešće se koristi zajedno s postojećim analitičkim tehnikama poput spregnute tehnike GC-MS. Ima jednostavnu aparaturu koja izgleda kao modificirana šprica, a sastoji od nosača, igle i SPME vlakna. SPME vlakno je tanko vlakno koje je obavijeno tankim polimernim filmom. Služi za apsorpciju i koncentraciju hlapljivih spojeva. Imamo dvije vrste SPME vlakana o kojima ovisi/utječe selektivnost ekstrakcije. Polarna vlakna koja koristimo za polarne spojeve i nepolarna vlakna koja koristimo za nepolarne spojeve. Kod SPME svi koraci uobičajene tekuće-tekuće ekstrakcije su integrirani u jedan korak, što znatno pojednostavljuje postupak izolacije. Prije upotrebe vlakno je potrebno kondicionirati na način da se izloži visokoj temperaturi 0,5-4 h *(8)*.

2.3.2. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE

Kod ovog tipa ekstrakcije postoje dvije tekuće faze, i to otopina koja sadrži tvar koju se želi izolirati i otapalo koje je također u tekućem stanju. Kako bi došlo do ekstrakcije željene komponente jedna faza se mora raspršiti u drugoj pa se ovaj tip ekstrakcija najčešće primjenjuje kad je nemoguće koristiti postupak destilacije, npr. za azeotropne smjese ili kod termolabilnih sastojaka *(9)*.

2.4. METODE ANALIZE HLAPLJIVIH SPOJEVA

2.4.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

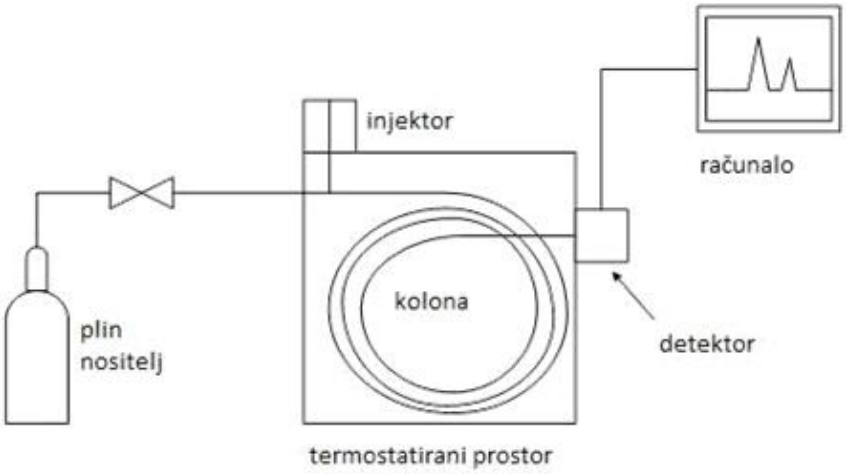
Plinska kromatografija (GC) je najčešće korištena tehnika odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva. Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone koja se nalazi u termostatiranom prostoru, detektora i računala. Uzorak u injektoru brzo i potpuno ispari. Inertni plin prenese pare uzorka od injekcijskog bloka preko kolone na kojoj se vrši odjeljivanje sastojaka smjese do detektora.

Uzorci za plinsko-kromatografsku analizu moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Mobilna faza je inertni plin (He, Ar, N2) koji ne utječe na proces odjeljivanja sastojaka smjese. Stacionarna faza je najčešće tekućina nanesena na neki kruti adsorbens (punjene kolone) ili vezana za stijenke kapilara (kapilarne kolone).

Sastojci smjese, koji su odjeljeni na kromatografskoj koloni i izneseni plinom nositeljem, moraju se na neki način registrirati odnosno detektirati. Neki od najvažnijih vrsta GC detektora su:

- plamenoionizacjski detektor (engl. „Flame Ionization Detevtor“, FID)- jedan od najčešće korištenih GC-detektora čiji je najveći nedostatak činjenica da razara uzorak
- detektor toplinske vodljivosti (engl. „Thermal Conductivity Detector“, TCD)
- plamenofotometrijski detektor (engl. „Flame Phozometric Detector“, FPD)
- fotoizonizacijski detektor (engl. „Photo-ionization Detector“, PID)
- detektor apsorpcije elektrona (engl. „Electron Capture Detector, ECD)

Pravilan izbor detektora od posebne je važnosti i za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Najveći broj podataka potrebnih za indentfikaciju i određivanje strukture složenih organskih molekula pruža spektrometrija masa *(10).*



Slika 2. Plinski kromatograf *(11)*

2.4.2. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa je metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi. Postupak se primjenjuje za određivanje relativnih molekulskih masa, a preko njih i molekulskih formula. Spektrometrija masa uključuje dva važna postupka, prvi je ionizacija uzorka, a drugi razdvajanje i određivanje iona.

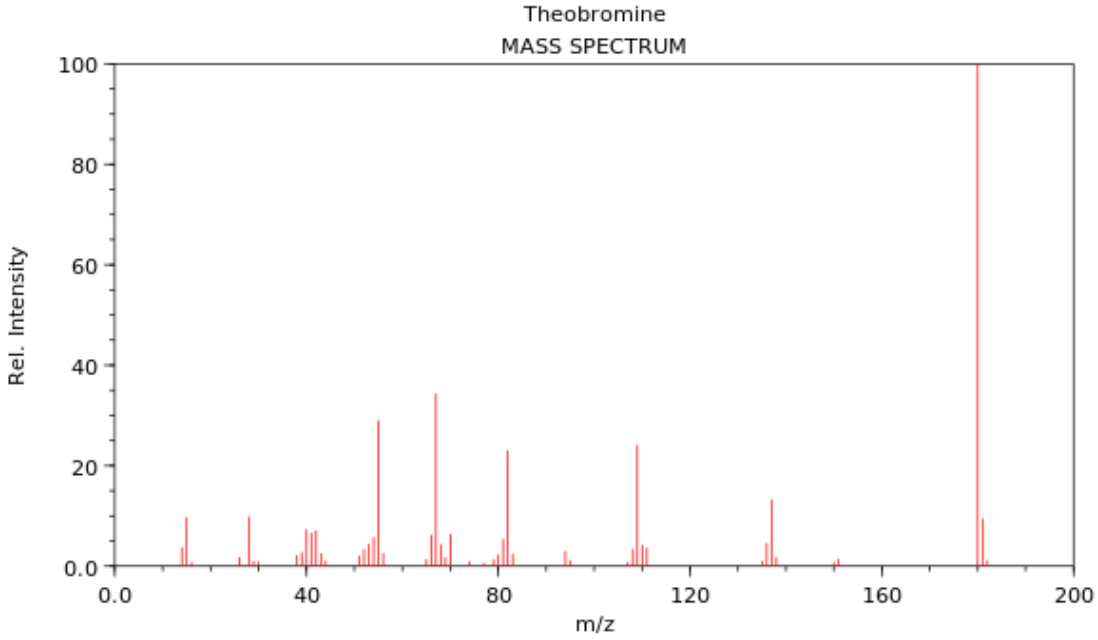
Spektrometar masa se sastoji od komore za bombardiranje, u koju se unosi mala količina uzorka u plinovitom stanju. Unutrašnjost spetrometra masa je pod vakuumom, što omogućava ionima prelazak puta od izvora do senzora bez sudara s drugim molekulama. Kod elektronske ionizacije (EI) uzorak se bombardira elektronima visoke energije pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivni M+ koji se fragmentira:

$$M + e^- \text{ --- } M^+ + 2e^-$$

$$M^+ \rightarrow M_1^+ + M_2^+ + M_3^+ + ...$$

Tako nastaju različiti fragmenti, a analizom se može zaključiti kakva je struktura dotičnog spoja i kolika mu je molekulska masa. Dobiveni ioni se razvrstavaju u

analizatoru prema intezitetu i veličini m/z. Ioni se na osjetljivom dijelu analizatora registriraju kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala i tako se dobiva spektar masa koji se obično prikazuje kao linijski dijagram s odnosom relativnog inteziteta i omjera mase i naboja fragmenata (*m/z*) (slika 3).



Slika 3. Maseni spektar teobromina *(12)*

https://webbook.nist.gov/chemistry

Način fragmentiranja u spektrometrima masa organskih spojeva u bliskoj je vezi s kidanjem veza u njihovim kemijskim reakcijama. Tumačenje samog fragmentiranja važno je za dokazivanje spoja *(10)*.

2.4.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA

Vezani sustav plinska kromatrografija – spektrometrija masa (GC-MS) omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine uzorka.

Kod ove tehnike spektrometar masa djeluje kao vrlo osjetljiv detektor za plinsku kromatografiju i može djelovati kao opći (kada detektira sve fragmente m/z u zadanom intervalu) ili vrlo selektivni detektor (kada detektira samo određene fragmente m/z koji su karakteristični za pojedinu strukturu).

Plinska kromatografija je uspješna metoda za separaciju i kvantifikaciju, ali i nepouzdana za kvalitativno određivanje gdje je spektrometrija masa gotovo savršena *(13)*.

Kombinacijom ovih dviju metoda može se postići visoka osjetljivost (do 10^{-15}g) te se mogu analizirati smjese s velikim brojem komponenata relativno velikom brinom.

Komponente smjese se odjeljuju u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa, a zatim odijeljene komponente odlaze plinom nositeljem u detektor (spektrormetar masa).

Dobiveni spektar masa se uspoređuje s računalnom bazom spektra masa te se određuje postotak slaganja na osnovi čega se može identificirati spoj. Još jedan važan podatak za identifikaciju spoja je vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni. Dakle, za svaki odijeljeni spoj spregnuta tehnika GC-MS daje dva važna podatka za identifikaciju spoja: vrijeme zadržavanja spoja na koloni i spektar masa *(11)*.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. OPĆE KARAKTERISTIKE PIVA “MRKA”

Pivo Mrka je robusno i aromatično pivo koje sadrži 7 % alkohola. Glavni sastojci koji pridonose njegovom okusu i aromi su listovi biljke metvice koja se držala u alkoholu (vodka) 3-5 dana kako bi se dezinficirala, tamna čokolada s 99 % udjela kakaa iz Dominikanske Republike hrvatskog proizvođača Nadalina, muškatni oraščić i cimet. Za izolaciju hlapljivih spojeva korišten je uzorak craft piva “Mrka” iz splitske craft pivovare **Tap B (slika 4).**



Slika 4. Craft piva “Mrka”

3.2. APARATURA I KEMIKALIJE

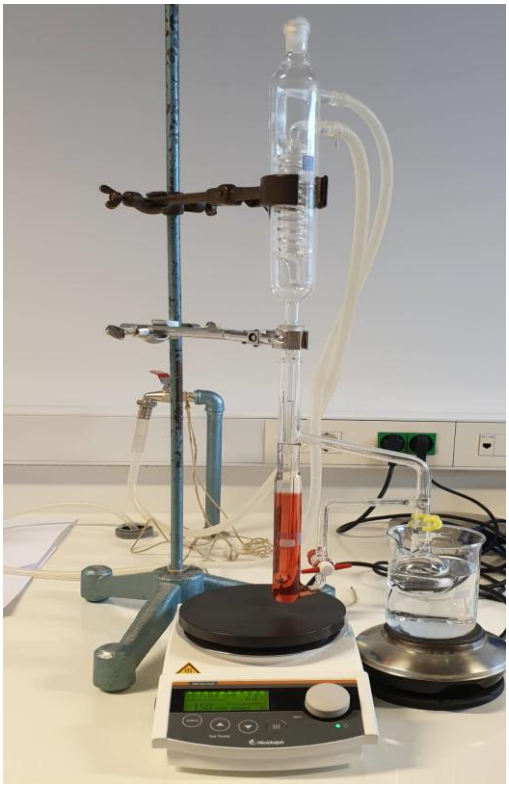
2.2.1. APARATURA

- Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi
- Plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD) i sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD)
- Magnetske miješalice (Heidolph MR Her-Standard (100-1400 o/min) s termostatom Heidolph EKT 3001, Njemačka)
- Kontinurani ekstraktor za tekuću-tekuću ekstrakciju za otapalo lakše od vode
- Aparatura za frakcijsku destilaciju s Vigreuxovom kolonom
- Spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS); plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7820A, u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977E
- Kolona HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; J&W, SAD)

2.2.2. KEMIKALIJE

- dietil-eter (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska), dietil-eter je pročišćen destilacijom netom prije upotrebe da bi se uklonio stabilizator (*2,6-diterc-butil-4-metilfenol*),
- NaCl (Fluka Chemie, p.a., Buchs, Švicarska).

3.3. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE



Slika 5. Kontinuirani ekstraktor za ekstrakciju tekuće-tekuće za otapala lakša od vode

Na aparaturi se tekući uzorak (craft pivo) ulije u spremnik ekstraktora. Prilikom ulijevanja tekućeg uzorka (do razine cca 2 cm ispod sužene staklene cijevi) aparatura se lagano nagne kako ne bi došlo do prelijevanja uzorka preko bočne cijevi. U spremnik s uzorkom se stavi magnetić za miješanje. Zatim se u ekstraktor pažljivo uroni adapter za difuziju otapala lakšeg od vode. U okruglu tikvicu se doda otapalo (1/3 volumena tikvice) za ekstrakciju. Za ovu ekstrakciju se koristio dietil-eter. Aparatura se učvrsti na stalak tako da se spremnik s uzorkom postavi na magnetsku miješalicu (bez zagrijavanja), a okrugla tikvica s otapalom u (još uvijek hladnu) vodenu kupelj ili grijaći blok s preciznom kontrolom temperature. Preko lijevka se kroz adapter za difuziju pažljivo doda otapalo. Otapalo se na opisani način dodaje u prostor iznad uzorka dok se mali dio otapala ne prelije bočnom cijevi u okruglu tikvicu. Prebrzo dodavanje otapala može uzrokovati prelijevanje dijela vodene faze (preko bočne cijevi) u tikvicu za sakupljanje ekstrakta. Bočna cijev se može izolirati aluminijskom folijom.

Na ekstraktor se postavi vodeno hladilo. Upali se magnetska miješalica. Okrugla tikvica s otapalom se zagrijava malo iznad temperature vrenja otapala. Otapalo iznad uzorka se združi s ekstraktom u tikvici i koncentrira frakcijskom destilacijom koristeći Vigreuxovu kolonu.

3.4. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

5 mL uzorka craft pive i 2 g NaCl se stavi u staklenu posudu od 20 mL. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 ^{o}C), a sadržaj u njoj se miješa upotrebom magnetske miješalice. Na Slici 5. prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 ^{o}C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa, dok je sivo vlakno kondicionirano na isti način 60 min na 270 ^{o}C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzorka *(14)*.



Slika 6. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) *(14)*

Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je najpogodnije vlakno za ekstrakciju vršnih para uzorka craft piva “Mrka” s obzirom na ukupni broj identificiranih spojeva u vršnim parama:

- za craft pivo korišteno je sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Slika 7.) i,
- plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (Slika 7).



Slika 7. Vlakna s ovojnicama DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno) *(14)*

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno se izvlači te se provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min uz konstantnu brzinu miješanja otopine uzorka piva (1000 o/min). Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 ^{o}C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu *(15)*.

3.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf model 7820A, u kombinaciji s masenim detektorom, model 5977E, spojenim na računalo (Slika 8).

Separacija komponenti provedena je na kapilarnoj koloni:

- HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 µm).



Slika 8. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Korišteni uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 ^{o}C, zatim porast temperature od 70 ^{o}C do 200 ^{o}C za 3 ^{o}C min^{-1},
- „solvent delay“: 3 min (vrijeme u kojem izlazi otapalo, a „solvent delay“ se koristio samo u slučaju kada su analizirani ekstrakti s otapalom),
- temperatura injektora: 250 ^{o}C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- količina injektiranog uzorka: 1 µL,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin^{-1}.

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 280 ^{o}C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcim
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima *(16)*

Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS-SPME i šprice za ekstrakte s otapalom (injektirani volumen ekstrakata je 1 µL).

4. REZULTATI

4.1. PRIKAZ REZULTATA

Hlapljivi spojevi craft piva "Mrka" određeni su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa GC-MS na koloni HP-5MS. Dobiveni rezultati ispitivanja prikazani su u tablicama i u obliku kromatograma.

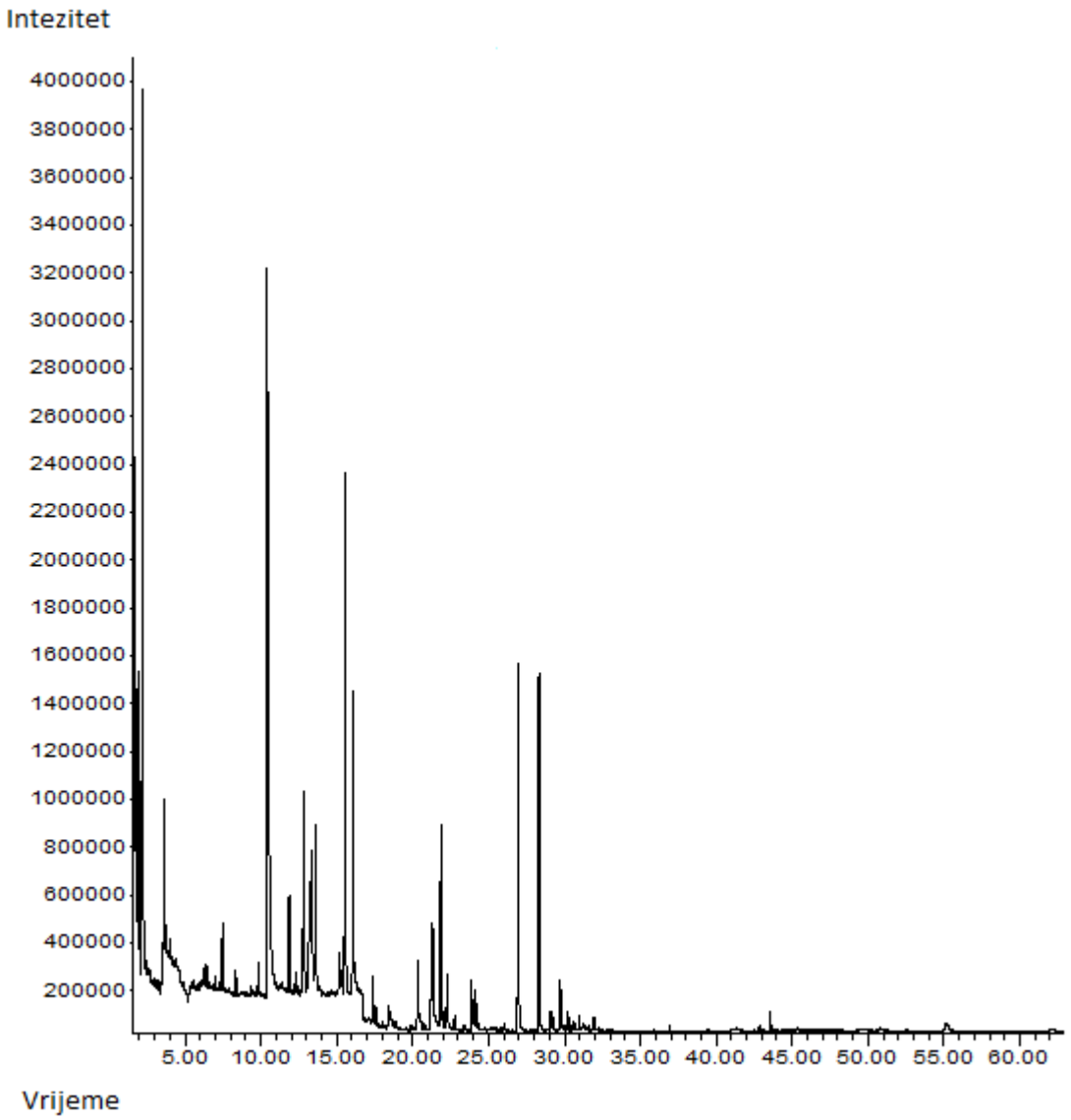
Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva craft piva "Mrka" izoliranog pomoću sivog vlakna

Red. Broj	**RI***	**Spoj**	**Udio (%)**
1.	<900	etil-acetat	0,73
2.	<900	2-metilpropan-1-ol	2,28
3.	<900	3-metilbutan-1-ol	11,95
4.	<900	izoamil-acetat	1,20
5.	1039	1,8-cineol	0,72
6.	1065	*γ*-terpinen	0,62
7.	1103	linalol	0,37
8.	1116	2-feniletanol	21,66
9.	1160	*p*-menton	1,20
10.	1178	4-terpineol	2,75
11.	1180	oktanska kiselina[a]	5,45
12.	1181	mentol	2,76

13.	1240	(*Z*)-heks-3-enil-pentanoat	1,11
14.	1249	karvon	7,90
15.	1255	2-feniletil-acetat	4,58
16.	1290	safrol	0,81
17.	1312	cinamil-alkohol	0,17
18.	1362	eugenol	1,19
19.	1370	dekanska kiselina[a]	2,96
20.	1397	etil-dekanoat	2,57
21.	1406	metil-eugenol	0,91
22.	1422	*trans*-β-kariofilen	0,21
23.	1448	cinamil-acetat	0,78
24.	1457	α-humulen	0,54
25.	1522	miristicin	5,89
26.	1558	elemicin	5,45
27.	1580	spatulenol	0,27
28.	1593	etil-dodekanoat	0,62
29.	1992	etil-heksadekanoat	0,30
ukupno identificirano			***88,01%***

*-retencijski indeks na HP-5MS koloni,

a-identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja.



Slika 9. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva craft piva "Mrka" izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) (sivo vlakno).

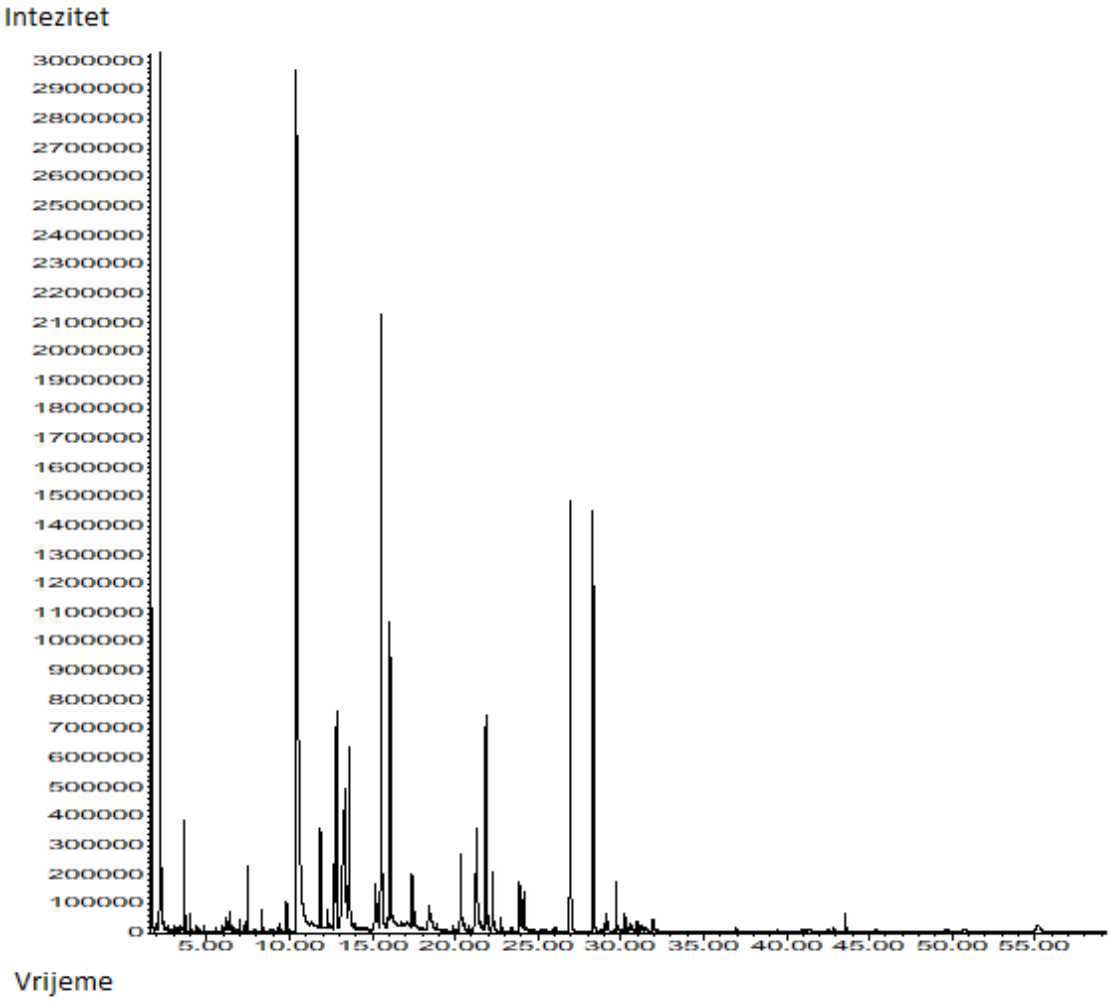
Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva craft piva "Mrka" izoliranog pomoću plavog vlakna

Red. Broj	**RI***	**Spoj**	**Udio (%)**
1.	<900	etil-acetat	1,45
2.	<900	2-metilpropan-1-ol	2,38
3.	<900	3-metilbutan-1-ol	4,55
4.	<900	2-metilbutan-1-ol	4,76
5.	<900	izoamil-acetat	3,69
6.	<900	2-metilbutil-acetat	0,43
7.	994	*β*-mircen	0,39
8.	998	etil-heksanoat	0,79
9.	1021	*α*-terpinen	0,41
10.	1035	limonen	0,55
11.	1039	1,8-cineol	2,60
12.	1065	*γ*-terpinen	0,97
13.	1103	linalol	1,09
14.	1116	2-feniletanol	5,48
15.	1160	*p*-menton	5,29
16.	1178	4-terpineol	4,15
17.	1180	oktanska kiselina[a]	2,24

18.	1181	mentol	3,05
19.	1196	etil-oktanoat	11,24
20.	1245	etil-benzoat	4,36
21.	1249	karvon	1,68
22.	1290	safrol	1,02
23.	1362	eugenol	0,40
24.	1370	dekanska kiselina[a]	0,94
25.	1397	etil-dekanoat	15,27
26.	1406	metil-eugenol	0,66
27.	1422	*trans*-β-kariofilen	1,12
28.	1448	cinamil-acetat	1,37
29.	1457	α-humulen	2,53
30.	1522	miristicin	4,31
31.	1558	elemicin	0,96
32.	1584	kariofilen-oksid	0,43
33.	1593	etil-dodekanoat	1,89
34.	1992	etil-heksadekanoat	0,38
ukupno identificirano			***92,83%***

*-retencijski indeks na HP-5MS koloni,

a-identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja.



Slika 10. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva craft piva "Mrka" izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) (plavo vlakno).

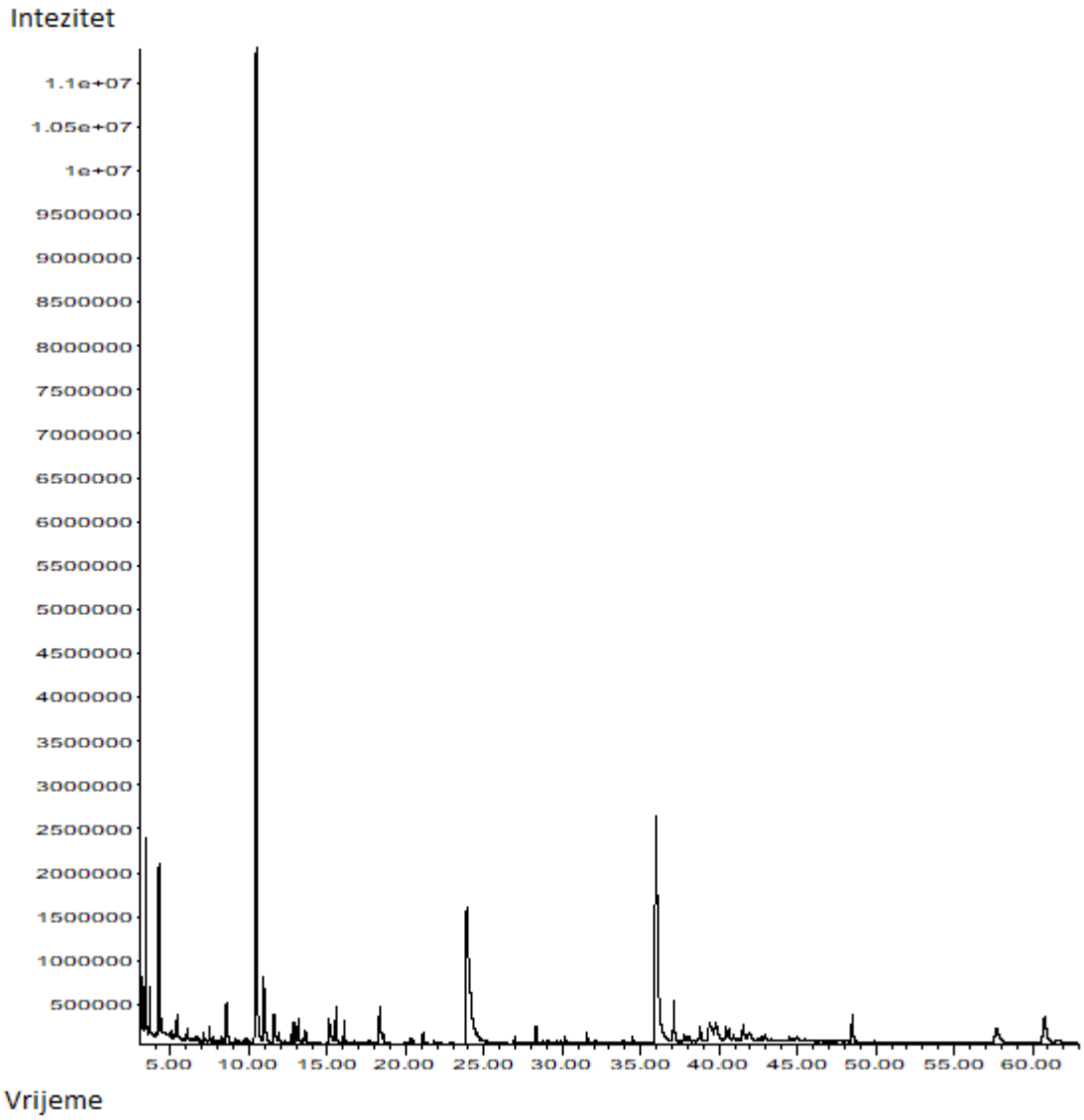
Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva craft piva "Mrka" izoliranog pomoću ekstrkcije tekuće-tekuće

Red. Broj	**RI***	**Spoj**	**Udio (%)**
1.	<900	pentanska kiselina[a]	1,17
2.	<900	4-hidroksi-2-furanmetanol	3,35
3.	<900	izoamil-acetat	0,63
4.	<900	2-metilbutil-acetat	2,66
5.	988	heksanska kiselina[a]	0,35
6.	1039	1,8-cineol	0,33
7.	1068	oktanol	1,77
8.	1116	2-feniletanol	32,68
9.	1160	*p*-menton	0,76
10.	1178	4-terpineol	0,49
11.	1180	oktanska kiselina[a]	0,98
12.	1181	mentol	0,46
13.	1237	3-fenilpropan-1-ol	1,44
14.	1248	karvon	0,92
15.	1260	geraniol	0,53
16.	1302	timol	15,59
17.	1312	cinamil-alkohol	1,54

18.	1370	dekanska kiselina[a]	0,40
19.	1429	2-(4-hidroksifenil) etanol	0,33
20.	1558	1,2,3-trimetoksi-5-(prop-2-enil) benzene	0,35
21.	1750	1-*H*-indol-3-etanol	17,65
22.	1842	kofein	1,72
23.	1879	teobromin	0,61
ukupno identificirano			***86,36%***

*-retencijski indeks na HP-5MS koloni,

a-identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja.



Slika 11. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva craft piva "Mrka" izoliranih pomoću ekstrakcije tekuće-tekuće.

5. RASPRAVA

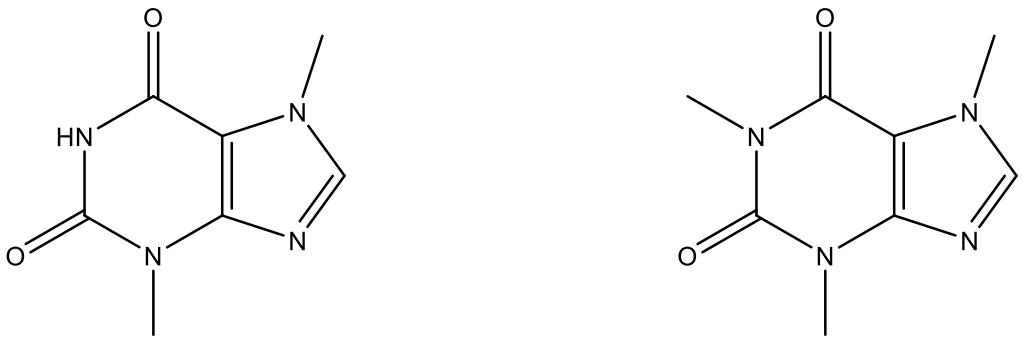
Cilj ovog rada je bio istražiti hlapljive spojeve craft piva "Mrka". Hlapljivi spojevi craft piva izolirani su pomoću dvije tehnike: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi s dva različita vlakna i kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće s otapalom lakšim od vode. Svi dobiveni uzorci hlapljivih spojeva, analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analize su prikazani u obliku tablica i kromatograma.

Profil hlapljivih spojeva craft piva, odnosno kemijski sastav i sadržaj (udio) izoliranih spojeva pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi sa sivim vlaknom (DVB/CAR/PDMS) prikazan je u tablici 1. U uzorku je identificirano 29 spojeva koji čine 88,01 % od ukupnog uzorka. U uzorku dominira 2-feniletanol (21,66 %), a kvantitativno značajni sastojci su i drugi poput 3-metilbutan-1-ola (11,95 %), karvona (7,90 %), miristicina (5,89 %) i elemicina (5,45 %). Svi ostali spojevi u ekstraktu prisutni su u manjim količinama. Spojevi kao što su 2-feniletanol (21,66 %), etil-acetat (0,73 %), izoamil-acetat (1,20 %), linalol (0,37 %), *α*-humulen (0,54 %), etil-dekanoat (2,57 %), etil-dodekanoat (0,62 %) su karakteristični za sva piva *(17)*. Zbog dodatka mente, cimeta, čokolade i muškatnog oraščića u ovom pivu su pronađeni spojevi karakteristični za te dodatke. Karvon (7,90 %), mentol (2,76 %), *p*-menton (1,20 %), linalol (0,37 %) se pretpostavlja da potječu iz mente. 1,8-Cineol (0,72 %), cinamil-acetat (0,78 %), cinamil-alkohol (0,17 %), safrol (0,81 %) i 4-terpineol (2,75 %) se pretpostavlja da potječu od dodanog cimeta. Miristicin (5,89 %) i elemicin (5,45 %) se predpostavlja da potječu od muškatnog oraščića, dok se za eugenol (1,19 %), metil-eugenol (0,91 %) smatra da potječu i od muškatnog oraščića i od cimeta *(18).*

U tablici 2 prikazani su rezultati dobiveni pomoću plavoga vlakna (PDMS/DVB). U uzorku su identificirana 34 spoja koja čine 92,83 % od ukupnog uzorka. Ovdje dominira etil-dekanoat (15,27 %), a kvantitativno značajniji sastojci su etil-oktanoat (11,24 %), 2-feniletanol (5,48 %) koji su nađeni i u drugim vrstama piva, kao i u drugim alkoholnim pićima. *p*-Meton (5,29 %) se smatra da potječe od mente, a ostali spojevi u ekstraktu prisutni su u manjim količinama. U ovoj analizi također je pronađen 3-metilbutan-1-ol (4,55 %), 2-metilbutan-1-ol (4,76 %), izoamil-acetat (3,69 %), *α*-humulen (2,53 %) koji su karakteristični sastojci piva. U ovom uzorku kao i u predhodnom pronađeni su spojevi za koje se predpostavlja da potječu od dodatka mente, cimeta, čokolade i

muškatnog oraščića, tako imamo karvon (1,68 %), linalol (1,19 %), mentol (3,05 %) za koje se predpostavlja da potječu do mente. 4-terpineol (4,15 %), safrol (1,02 %), cinamil-acetat (1,37 %), *α*-terpinen (0,44 %), 1,8-cineol (2,60 %), *γ*-terpinen (0,97 %) su spojevi za koje se pretpostavlja da potječu od cimeta, također i ovdje su pronadeni eugenol (0,40 %) i metil-eugenol (0,66 %) za koje se pretpostavlja da potječu i od cimeta i od muškatnog oraščića. Spoj koji nije pronađen u analizi sa sivim vlaknom a s plavim je *β*-mircen (0,39 %) za koji se pretpostavlja da potječe od hmelja *(18).*

U tablici 3 su rezultati dobiveni kontinuranom ekstrakcijom tekuće-tekuće s organskim otapalom lakšim od vode. U uzorku su identificirana 23 spoja koja čine 86,36% od ukupnog uzorka. Najdominantniji spoj je 2-feniletanol (32,68 %), a kvantitativno značajniji spojevi su timol (15,59 %) i 1-*H*-indol-3-etanol (17,65 %). Svi ostali spojevi u ekstraktu prisutni su u manjim količinama. Spojevi pronađeni u uzorku za koje se pretpostavlja da potječu od cimeta su 1,8-cineol (0,33 %), 4-terpineol (0,49 %), geraniol (0,53 %) i cinamil-alkohol (1,54 %), spojevi za koje se pretpostavlja da potječu od mente su timol (15,59 %), *p*-menton (0,78 %), mentol (0,46 %) i karvon (0,92 %) i spojevi za koje se pretpostavlja da potječu od čokolade su kofein (1,72 %) i teobromin (0,61 %).



Slika 12. Strukturne formule teobromina i kofeina

Iz navedenih analiza može se zaključiti da su najzastupljenije skupine spojeva alkoholi, esteri, alkaloidi, terpenski spojevi i ketoni.

Od alkohola najzastupljeniji su: 2-feniletanol (5,48-32,68 %), 3-metilbutan-1-ol (4,55-11,95 %), i cinamil-alkohol (0,17-1,54 %) koji značajno utječu na aromu i okus, od

estera najzastupljeniji su etil-dekanoat (2,57-15,27 %) i izoamil-acetat (0,63-3,69 %) *(17)*.

Od akaloida imamo teobromin (0,61 %) i kofein (1,72 %) koji su pronađeni samo u uzorku koji je izoliran pomoću kontinurane ekstrakcija tekuće-tekuće s organskim otapalom lakšim od vode. Miristicin (4,32-5,89 %) i elemicin (0,96-5,45 %) su izolirani samo pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi i to s oba vlakna.

Od terpenskih spojeva najzastupljeniji su monoterpenski alkoholi: geraniol (0,53 %), linalol (0,37-1,09 %), mentol (0,46-3,05 %) i 4-terpineol (0,49-4,15 %), zatim fenilpropenski spoj eugenol (0,40-1,19 %) i monoterpenski spoj timol (15,59 %), seskviterpen α-humulen (0,54-2,53 %), monoterpen *β*-mircen (0.39 %) i monoterpenski ciklički eter 1,8-cineol (0,33-2,60 %). Od važnijih spojeva za aromu craft piva "Mrka" su i ketoni: karvon (0,92-7,90 % i *p*-menton (0,76-5,29) *(19)*.

6. ZAKLJUČAK

Razmatrajući dobivene rezultate analize ovog završnoga rada može se zaključiti sljedeće:

- Kvalitativna i kvantitativna analiza craft piva "Mrka" izvršena je vezanim sustavom GC-MS.
- Nisu zapažene velike razlike u kemijskom sastavu hlapljivih spojeva izoliranih pomoću dvije različite tehnike.
- Iz navedenih spojeva može se zaključiti da su najzastupljenije skupine spojeva alkoholi, esteri, alkaloidi, terpenski spojevi i ketoni.
- Spojevi etil-oktanoat i *β*-mircen pronađeni su samo korištenjem plavog vlakna.
- Spoj *β*-mircen je jedini spoj za koji se predpostavlja da potječe od hmelja.
- Spojevi teobromin, kofein i geraniol su pronađeni samo analizom uzorka izoliranog pomoću kontinuirane ekstrakcije tekuće-tekuće s organskim otapalom lakšim od vode.
- Spojevi pronađeni korištenjem plavog i sivog vlakna su eugenol, metil-eugenol, miristicin, elemicin, safrol, linalol i 3-metilbutan-1-ol,
- Spojevi pronađeni u svim analizama su izoamil-acetat, 2-feniletanol, 4-terpineol, *p*-menton, karvon, 1,8-cineol, mentol i cinamil-alkohol, a potječu od začina koji su dodani u craft pivo "Mrka".

7. LITERATURA

1. https://time.com/5407072/why-beer-is-most-popular-drink-world/

2. https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/craft-brewer-definition/

3. https://www.pravda.beer/wp-content/uploads/2015/12/shema-eng-1.jpg (preuzeto 07.09.2020)

4. Trgo M. Tehnologija vode. Nerecenzirani nastavni materijal. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2019.

5. Palmer J. How to Brew. Brewers Publications. 2006.

6. Šantolić, M. Katalitička oksidacija toluena na miješanim metalnim oksidima. Završni rad. Fakultet Kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. 2013.

7. Gagula G. Modeliranje promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijek. Osijek. 2017.

8. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley VCH. New York. USA. 1997; 185.

9. Vidović B. Metode izdvajanja metalnih iona iz vodenih otopina. Završni rad. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku. Osijek. 2017; 3.

10. Kasum A. Profil hlapljivih spojeva monoflornog meda drače (Paliurus spina-christi) Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2007; 4-18.

11. Čikes M. Profil hlapljivih spojeva začina origana prije i nakon zagrijavanja. Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2018; 9-11.

12. https://webbook.nist.gov/chemistry

13. El-Sayed AM. The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals (2020). http://www.pherobase.com (preuzeto 28.08.2020.).

14. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Osijek. 2014; 34-5.

15. Nemec Z. Profil hlapljivih spojeva curry (mješavine) začina. Veleučiliste “Marko Marulić” u Kninu, Odjel za Prehrambenu tehnologiju. Knin. 2017; 22.

16. Marinela Nutrizio, Jasenka Gajdoš Kljusurić, Zvonimir Marijanović, Igor Dubrović, Marko Viskić, Elena Mikolaj, Farid Chemat and Anet Režek Jambrak, The Potential of High Voltage Discharges for Green Solvent Extraction of Bioactive Compounds and Aromas from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)—Computational Simulation and Experimental Methods, (2020), *Molecules* **25** (16), 3711-3743. DOI:10.3390/molecules25163711.

17. M. Dresel, T. Praet, F. Van Opstale, A. Van Holle, D. Naudts, D. De Keukelerie, L. De Cooman and G. Aerts. Comparison of the Analytical Profiles of Volatiles in Single-Hopped Worts and Beers as a Function of the Hop Variety, BrewingScience. (2015); 10-12. ISSN: 1866-5195

18. http://docplayer.rs/187584204-Osnove-kemije-prirodnih-organskih-spojeva.html

19. Štefanac D. Kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnih ulja. Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu i Medicinski fakultet. Split. 2017/2018; 29-37.