

**Mogućnost primjene headspace tehnike plinske kromatografije u analizi sastava arome polutvrdih i tvrdih sireva\***  
**(The Potential Application of Headspace Gas Chromatography in the Analysis of Flavour Composition of Semi-Hard and Hard Cheese)**

Jovica HARDI, dipl. inž., prof. dr. Predrag NOVAKOVIĆ, dipl. inž.,  
Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper

UDK: 637.352/.354+637.3.057:545.844(045) = 862

Prispjelo: 10. 1. 1987.

*Sažetak*

*Metodom headspace tehnike plinske kromatografije analiziran je niz uzoraka sireva tipa trapist, prikupljen na jugoslavenskom tržištu, a načinjena je i usporedba s mađarskim i austrijskim sirevima istog tipa.*

*Nakon komparativne analize kromatograma uočene su znatne razlike u sastavu arome pojedinih uzoraka. Kriteriji su bili ukupna aroma i broj i udio identificiranih lako hlapljivih sastojaka arome pojedinih uzoraka.*

*Summary*

*Headspace gas chromatography was used to analyse several sets of trappist cheese samples available in Yugoslavia. The results of these analyses were compared to the results of equivalent analysis performed with the samples of Hungarian and Austrian cheese of the same type.*

*The comparative analysis of chromatograms revealed considerable variations in the composition of flavour components among the samples based on the criteria of total flavour and the number and the relative quantities of the identified volatile flavour components of the individual samples.*

**Uvod**

Aromi sira, jednom od glavnih mjerila kvalitete u današnjim uvjetima borbe za visoku kvalitetu proizvoda, potrošači i proizvođači te njihove razvojno-istraživačke službe daju veliku važnost.

Iako su na području utvrđivanja kvalitete domaćih sireva naši autori napisali nekoliko značajnih radova (Miletić 1969; Markeš 1973; Sabadoš, Rajšić 1980) do danas ne postoje metode koje bi pouzdano i arbitražno odredile aromu naših sireva.

U svijetu je postignut veliki napredak uvođenjem instrumentalnih analitičkih metoda za određivanje sastava arome mnogih vrsta sireva (Manning, Moore 1979).

\* Rad predstavlja nastavak istraživanja prikazanih radom »Istraživanje sastava arome sireva headspace analizom«, koji je referiran na XXIV Seminaru za mljekarsku industriju u Opatiji 1986. godine.

Među suvremenim tehnikama istaknuto mjesto u analizi arome sireva pripada headspace (HGC) tehnici plinske kromatografije (HGC od engl. Headspace Gas Chromatography). Principima headspace tehnike u svijetu se proučava aroma sireva usporedno s uvođenjem u praksu složenijih instrumentalnih rješenja za rutinske analize.

Headspace tehnika (HGC) sve se češće primjenjuje za određivanje hlapljivih tvari u heterogenim uzorcima kod kojih je nemoguće obaviti uobičajeno injektiranje, kao kod polimera, čvrstih tvari i vrlo viskoznih tekućina. Umjesto dugotrajne i skupe pripreme uzorka, ovdje se plinskom ekstrakcijom obuhvaćaju samo zanimljive hlapljive komponente, dok nehlapljivi dio uzorka ostaje nepromijenjen.

Sistem injektiranja temelji se na činjenici da su tlakovi na početku kolone i u prostoru s uzorkom jednaki. U trenutku injektiranja prekida se dovod plina nosioca, pa plinovita faza uzorka iz bočice, zbog nastalog podtlaka, ulazi u kolonu. Uzorak u bočici, u posebnom dijelu uređaja, zagrijava se neposredno prije analize na programiranu temperaturu, u određenom vremenskom razmaku.

Stariji sistemi zahtijevaju od operatora iskustvo u programiranju mikroprocesora, odnosno točno određivanje radnih uvjeta (temperatura, vrijeme i dr.) prema poznatim svojstvima uzoraka.

Suvremeni HGC sistemi imaju mikroprocesore koji kontroliraju ravnotežni tlak plinovite faze nad uzorkom u bočici i prema njemu biraju dužinu vremena zagrijavanja bočice. Prekratkim zagrijavanjem ne bi se postigla ravnoteža plinovite i tekuće faze, a predugo vrijeme moglo bi uzrokovati termičku degradaciju uzorka.

Posebna pogodnost HGC tehnike je mogućnost višestruke plinske ekstrakcije, MHE (multiple headspace extraction), što je danas najjednostavniji i najtočniji postupak kvantitativnog određivanja hlapljivih sastojaka uzoraka. Uzorak se u bočici termostatira i provodi se uobičajena headspace analiza u toku koje se uklanjanjem dijela plinovite faze remeti ravnoteža raspodjele. Bočica s uzorkom nakon prve analize se otvara kako bi se uklonio ostatak hlapljivih tvari, ponovno se hermetски zatvara i na isti način se nekoliko puta provede HGC analiza. Iz rezultata analiza može se izračunati točna količina istraživane tvari, bez obzira na koeficijent raspodjele između dvije faze.

### Povijest razvoja headspace tehnike

Headspace analiza otkrivena je u vrijeme kada su se u plinske kromatografe počeli ugrađivati detektori visoke osjetljivosti. Šira primjena ove tehnike u toksikologiji i industriji različitih napitaka počela je nešto kasnije, 1968. godine, kada se pojavio prvi komercijalni uređaj za taj tip analize. Od tog vremena primjena i mogućnosti headspace tehnike u stalnom su razvoju.

Godine 1966. Kemijski odjel Instituta za sudsku medicinu u Beču predložio je tvrtki »Perkin-Elmer« izradu uređaja za headspace analizu. U tom institutu godinama se koristila tehnika ručnog doziranja za određivanje

količine alkohola u krvi, pa su radnici zaključili da bi proizvodnja uređaja s automatskim doziranjem bila analitički i komercijalno opravdana. Uređaj bi se upotrebljavao u prvom redu za određivanje alkohola u krvi, ali odmah su uočne i druge velike mogućnosti te tehnike.

Prototip novog instrumenta završen je 1967. godine, a već slijedeće godine sišao je s montažnih traka prvi serijski primjerak. Kao kod svih dobrih ideja, osnovno rješenje bilo je jednostavno i stoga je zadržano sve do danas. Elektro-pneumatski sistem za injektiranje sastoji se od grijane igle i jednog para magnetskih ventila. Takav uređaj jamči siguran pogon, uz najmanje servisnih intervencija. Vrijedno je spomenuti da prvi uređaj iz godine 1968. još i danas uspješno služi za rutinsko određivanje količine alkohola u krvi na Institutu u Beču.

Nasljednici prvog modela, F-40, bili su F-42 i F-45, pri čemu se u principu rada i osnovnoj koncepciji ništa nije promijenilo. Model F-42, umjesto zastarjelog kromatografa F-20, opremljen je tada najsvremenijim modelom F-22, a kod modela F-45 poboljšane su i kupelj za termostatanje i elektronika, koja potpuno kontrolira automatiku. Danas su u praksu uvedeni suvremeni uređaji, klase modela HS-100 firme »Perkin-Elmer«, u kojima su upotrijebljena prokušana načela, primijenjena u modernim kromatografima Sigma serije.

### Metode istraživanja

Uzorci sira trapista jugoslavenskih proizvođača prikupljeni su na tržištu po kriteriju istog stupnja zrelosti, a zbog usporedbe ispitani su po jedan uzorak trapista porijeklom iz Mađarske i Austrije. Do analize uzorci su čuvani na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ , nakon čega su ostavljeni 24 sata na sobnoj temperaturi, zbog defrostacije i temperiranja.

Analizirano je ukupno 8 uzoraka sira trapista u dvije serije (analiza svakog uzorka ponovljena je dva puta). Tablicom su prikazane srednje vrijednosti analiza obje serije, a zbog velike podudarnosti dviju serija i racionalizacije prostora, prikazani su samo kromatogrami prve serije analiza.

Inozemni sir tipa trapist porijeklom iz Mađarske označen je oznakom (H), a austrijski trapist oznakom (A).

Uzorci za analizu pripremljeni su usitnjavanjem, nakon čega je 1 g uzorka hermetički zatvoren u bočicu za headspace analizu. Analiza sastojaka lako hlapljivog dijela arome sireva obavljena je na plinskom kromatografu Perkin-Elmer tip Sigma-3, opremljenom ECD i  $2 \times$  FID detektorima. Kao inertni plin nosilac upotrijebljen je dušik, a za detekciju na FID detektoru upotrijebljeni su vodik i zrak.

Za kromatografsko razdvajanje upotrijebljena je kolona slijedećih svojstava:

15 % CARBOWAX 20 M (on Chromosorb WAW) DMSC 80/100 mesh, staklena, duljine 1,8 m, promjera 2 mm.

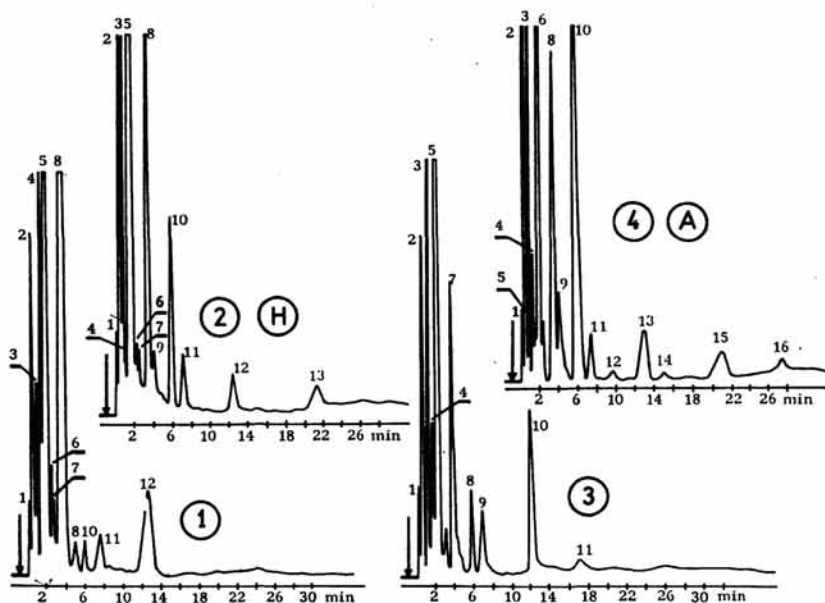
## Uvjeti headspace analize:

|  |           |
|--|-----------|
| — temperatura injektora i detektora          | 150 °C    |
| — temperatura kolone na početku rada         | 70 °C     |
| — temperatura kolone na svršetku rada        | 70 °C     |
| — protok plina nosioca (N <sub>2</sub> )     | 10 ml/min |
| — brzina papira na pisaču                    | 5 mm/min  |
| — količina uzorka za analizu                 | 1,0000 g  |
| — područje slabljenja signala (osjetljivost) | 4 × 1     |
| — vrijeme tlačenja uzorka dušikom            | 4 min     |
| — temperatura zagrijavanja uzorka            | 70 °C     |

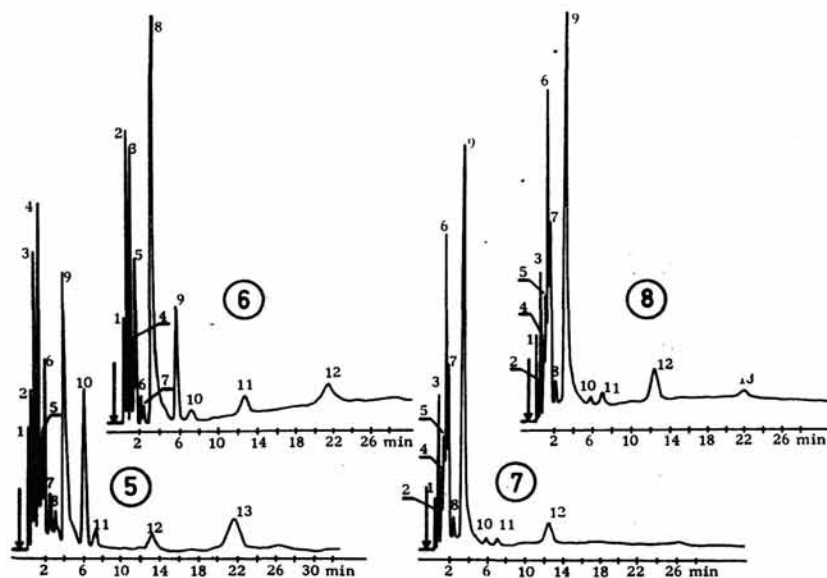
## Rezultati i rasprava

Djelomična identifikacija sastojaka arome obavljena je potvrdnim analizama (analizom čistih sastojaka i usporedbom retencionih vremena) koje su omogućile kvalitativnu identifikaciju 7 sastojaka. Poteškoće u nabavi čistih sastojaka (kemikalije vrlo visoke čistoće) onemogućile su cjelokupnu identifikaciju sadržaja lako hlapljive arome sireva.

Za uspješno kvantitativno određivanje sastojaka headspace tehnikom bilo bi neophodno primijeniti metodu tzv. unutrašnjeg standarda. Kod postupka primijenjenog u ovom istraživanju, može se samo uvjetno govoriti o kvantitativnom određivanju, prikazanom preko relativnih udjela sastojaka u ukupnoj aromi.



Slika 1. Kromatogrami arome sira trapista  
Figure 1. Chromatograms of Trappist Cheese Flavours



Slika 2. Kromatogrami arome sira trapista  
Figure 2. Chromatograms of Trappist Cheese Flavours

Tablica 1. Sadržaj ukupne arome u uzorcima trapista  
Table 1. Total Flavour Content in 8 Trappist Cheese Samples

| Uzorak trapista<br>Trappist Cheese<br>Sample<br>(Br/N <sub>2</sub> ) | Ukupna aroma<br>(površina pikova)<br>Total Flavour<br>(Areas of Peaks)<br>(mm <sup>2</sup> ) | Identificirani sastojak<br>(redni broj pika)<br>Identified Component<br>(No of Peak) |
|--|--|--|
| H 1  | 1.672,5  | 4,5,6,7,8,12   |
| H 2  | 3.233,6  | 4,5,6,7,8,12   |
| H 3  | 1.686,4  | 4,5,6,7,10   |
| A 4  | 3.563,8  | 5,6,7,8,13,14  |
| A 5  | 1.635,7  | 5,6,7,8,9,12   |
| A 6  | 2.257,2  | 4,5,6,7,8,11   |
| A 7  | 1.956,8  | 5,6,7,8,9,12   |
| A 8  | 2.112,6  | 5,6,7,8,9,12   |

Tablica 2. Legenda identificiranih sastojaka  
Table 2. Legend of Identified Components

| Identificirani sastojak<br>Identified Component | Uzorak / Sample |    |    |    |    |    |    |    |
|---|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|
|   | 1               | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  |
| Acetaldehid                                     | 4               | 4  | 4  | 5  | 5  | 4  | 5  | 5  |
| Etanol  | 5               | 5  | 5  | 6  | 6  | 5  | 6  | 6  |
| Butanon   | 6               | 6  | 6  | 7  | 7  | 6  | 7  | 7  |
| 1-propanol                                      | 7               | 7  | —  | —  | 8  | 7  | 8  | 8  |
| Diacetil  | 8               | 8  | 7  | 8  | 9  | 8  | 9  | 9  |
| Metilkaproat                                    | 12              | 12 | 10 | 13 | 12 | 11 | 12 | 12 |
| 2-heptanon                                      | —               | —  | —  | 14 | —  | —  | —  | —  |



Usporedbom kromatograma i količina i udjela identificiranih sastojaka lako hlapljivog dijela arome pojedinih uzoraka, mogu se uočiti znatne razlike u sastavu arome od uzorka do uzorka.

Očite su kvalitativne (broj pikova) i kvantitativne (na bazi površina pojedinih pikova i relativnih udjela u ukupnoj aromi) razlike sastava lako hlapljivog dijela arome svih uzoraka sireva.

S obzirom da se radi o sastojcima koji znatno utječu na organoleptička svojstva, odnosno aromu sira (Fenaroli's... 1975), mogu se očekivati znatne razlike organoleptičkih svojstava od uzorka do uzorka trapista.

Iz tablica se vidi da se sirevi jugoslavenskih proizvođača, međusobno uspoređeni bitno razlikuju po sastavu lako hlapljivih sastojaka arome. Utvrđeno je u odnosu na inozemne sireve znatno zaostajanje u količini ukupne arome, i uočena su velika odstupanja u omjeru sastojaka etanol/diacetil te ostalih sastojaka iz sastava arome.

Pokusima je potvrđena pogodnost headspace tehnike u brzjoj analizi sastava arome sireva. Posebna pogodnost tehnike je automatsko injektiranje uzoraka u kolonu te upravljanje i kontrola toka analize programabilnim mikroprocesorom. Veliku pogodnost pri radu predstavljalo je unošenje uzorka nakon vaganja izravno u uređaj bez ikakve prethodne obrade (ekstrakcija, destilacija i sl.), pri čemu su se dobivali vrlo reproducibilni rezultati.

### Zaključak

Rezultati rada potvrđuju da se headspace tehnika plinske kromatografije može s pouzdanošću primijeniti za kvalitativnu i kvantitativnu karakterizaciju arome svih vrsta polutvrdih i tvrdih sireva (primjenjujući metode čistih komponenata i unutrašnjeg standarda), te da uz odabrane preliminarnе senzorske testove može zauzeti važno mjesto među arbitražnim metodama za ocjenjivanje aromatičnosti sireva.

Metoda pruža velike mogućnosti u praćenju stupnja zrelosti sireva, verifikaciji kvalitete primijenjenih sirarskih kultura, određivanju kvalitete sirovina za proizvodnju topljenih sireva, klasifikaciji sireva prilikom svrstavanja u određene kvalitetne grupe, osiguravanju određene razine kvalitete izvornih programa i drugdje u mljekarskoj i prehrambenoj industriji.

### Literatura

- Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients. Volume II. C.R.C. Press. Inc., Cleveland, 746—796, 1975.
- MANNING, D. J., MOORE C. (1979): Headspace Analyses of Hard Cheeses. *Journal of Dairy Research* 46 (3), 539—545.
- MARKEŠ, M. (1973): O porijeklu, proizvodnji i klasifikaciji sireva koji se proizvode u Jugoslaviji. *Mljekarstvo* 23 (10), 228—233.
- MILETIĆ, S. (1965): Karakteristike kvalitete našeg sira trapista. *Mljekarstvo* 19 (3), 59—65.
- SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1980): Trapist II — organoleptička kvaliteta *Mljekarstvo* 30 (11), 323—330.
- Informacije Perkin—Elmer. Zagreb, 1/1984.