

# Utjecaj pakiranja na sadržaj ftalata u pivima

---

**Klakočer, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:888049>

*Rights / Prava:* [Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**

REPOZITORIJ

**PTF**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**dabar**  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Martina Klakočer**

**UTJECAJ PAKIRANJA NA SADRŽAJ FTALATA U PIVIMA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za bioproceno inženjerstvo  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada:** prihvaćena je na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Kristina Mastanjević*

*Utjecaj pakiranja na sadržaj ftalata u pivima*  
*Martina Klakočer, 0113138343*

### Sažetak:

Pivo se pakira u više vrsta ambalaže, staklene boce, aluminijske limenke te PET boce. S obzirom da je zbog jednostavnosti i isplativosti PET ambalaža najzastupljenija, cilj ove preliminarne studije bio je odrediti koncentraciju i vrste ftalata (dimetil ftalat, dietil ftalat, diizobutil ftalat, dibutil ftalat, bis (2-etilheksil) ftalat, di-n-oktil ftalat) u staklenim bocama, PET ambalaži i limenkama. S obzirom na svojstva PET ambalaže koja je napravljena od polimernih materijala, u koju se dodaju razne tvari za stvrdnjavanje, omekšavanje i bojanje, očekuje se da će u pivima koja su pakirana u takvoj ambalaži biti veća koncentracija ftalata, kemikalija povezanih sa mikroplastikom. Ftalati će se u uzorcima određivati pomoću GC-MS metode, a limenke će se podvrgnuti i FTIR tehnologiji (infracrvena spektrofotometrija s Fourierovom transformacijom). Rezultati pokazuju da piva pakirana u PET mogu sadržavati značajne količine ftalata; posebno visoke koncentracije dibutil ftalata pronađene su u svim uzorcima, ali najviša koncentracija detektirana je u uzorku PET boce, međutim, piva u limenkama pokazala su još više razine određenih ftalata, kao što je bis (2-etilheksil) ftalat, te je i time pokazano kako plastika, pa tako i ftalati predstavljaju ozbiljan zdravstveni problem i trebali bi se tretirati kao takvi.

**Ključne riječi:** ftalati, PET ambalaža, pivo, mikroplastika, GC-MS

**Rad sadrži:** 41 stranicu  
9 slika  
5 tablica  
0 priloga  
47 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

|   |               |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Vinko Krstanović</i>          | predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Kristina Mastanjević</i> | član-mentor   |
| 3. dr. sc. <i>Brankica Kartalović, zn.sur</i>     | član          |
| 4. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>           | zamjena člana |

**Datum obrane:** 26. rujna 2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu Sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku.

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Process engineering  
Subdepartment of Bioprocess Engineering  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area** Biotechnical sciences  
**Scientific field** Food technology  
**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its regular session no. X held on 17 July 2023.  
**Mentor:** Kristina Mastanjević, associate prof., PhD  
**The influence of packaging materials on phthalates in beers**  
*Martina Klakočer, 0113138343*

### Summary:

Beer is packaged in several types of containers: glass bottles, aluminum cans, and PET bottles. Given that PET packaging is the most widely used due to its simplicity and cost-effectiveness, the aim of this preliminary study was to determine the concentration and types of phthalates (dimethyl phthalate, diethyl phthalate, diisobutyl phthalate, dibutyl phthalate, bis(2-ethylhexyl) phthalate, di-n-octyl phthalate) in glass bottles, PET packaging, and cans. Considering the properties of PET packaging, which is made from polymer materials to which various substances for hardening, softening, and coloring are added, it is expected that beers packaged in such containers will have higher concentrations of phthalates, and chemicals associated with microplastics. Phthalates in the samples will be determined using the GC-MS method, and cans will also be subjected to FTIR technology (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). The results show that beers packaged in PET may contain significant amounts of phthalates; particularly high concentrations of dibutyl phthalate were found in all samples, with the highest concentration detected in the PET bottle sample. However, beers in cans showed even higher levels of certain phthalates, such as bis(2-ethylhexyl) phthalate, further demonstrating that plastics, including phthalates, represents a serious health issue and should be treated as such.

**Key words:** phthalates, PET packaging, beer, microplastics, GC-MS

**Thesis contains:** 41 pages  
9 figures  
5 tables  
0 supplementary materials  
47 references

**Original in:** Croatian

### Review and defence committee:

- |   |                   |
|---|-------------------|
| 1. <i>Vinko Krstanović</i> , PhD, full prof.            | Chairperson       |
| 2. <i>Kristina Mastanjević</i> , PhD, assoc. prof.      | Member-mentor     |
| 3. <i>Brankica Kartalović</i> , PhD, Research Associate | Member            |
| 4. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assist prof.          | Substitute member |

**Defence date:** September 26, 2024

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; Rector's office, University of Osijek; University Library in Zagreb and in University Library in Osijek.

---



**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

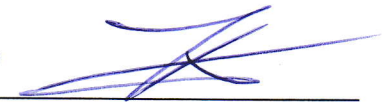
26.9.2024

**TE OCIJENJEN USPJEHOM**

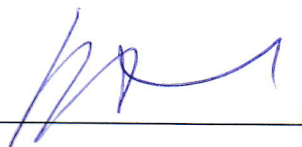
IZVRŠNIM (5)

**Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:**

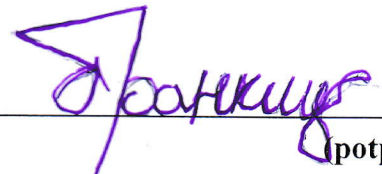
1. prof. dr. sc. Vinko Krstanović - predsjednik

WZ   
(potpis)

2. doc. dr. sc. Kristina Mastanjević - član

  
(potpis)

3. dr. sc. Brankica Kartalović - član

  
(potpis)



## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....  | 3  |
| 2.1. FTALATI.....   | 4  |
| 2.2. PET AMBALAŽA .....   | 5  |
| 2.3. PRISUTNOST FTALATA U ŽIVIM ORGANIZMIMA .....                                   | 6  |
| 2.4. UČINCI NA LJUDSKO ZDRAVLJE .....   | 8  |
| 2.5. MIKROPLASTIKA .....  | 11 |
| 2.5.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR) .....       | 15 |
| 2.5.2. GC/MS metoda određivanja( Plinska kromatografija/masena spektrometrija)..... | 17 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....  | 20 |
| 3.1. ZADATAK.....   | 21 |
| 3.2. MATERIJALI I METODE.....   | 21 |
| 3.2.1. Proizvodnja piva .....   | 21 |
| 3.2.2. Priprema uzoraka za GC-MS analizu.....                                       | 21 |
| 3.2.3. GC–MS analiza.....   | 22 |
| 3.2.4. Priprema uzoraka za FTIR i analiza.....                                      | 24 |
| 3.2.5. Statistička analiza .....  | 24 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....  | 25 |
| 5. ZAKLJUČCI .....  | 32 |
| 6. LITERATURA .....   | 34 |

---



## Popis oznaka, kratica i simbola

| Kratica | Puni naziv   |
|---------|--|
| ACN     | acetonitril  |
| ADHD    | poremećaj pažnje s hiperaktivnošću                       |
| BBP     | benzil butil ftalat                                      |
| BHT     | butilirani hidroksitoluen                                |
| DBP     | dibutil ftalat   |
| DEHA    | bis (2-etilheksil) adipat                                |
| DEHP    | bis (2-etilheksil) ftalat                                |
| DINP    | diizononil ftalat  |
| DOA     | dioctil-adipat   |
| EFSA    | Europska agencija za sigurnost hrane                     |
| FT-IR   | infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom |
| GC-MS   | plinska kromatografija/masena spektrometrija             |
| LOD     | granica detekcije  |
| LOQ     | granica kvantifikacije                                   |
| MCPP    | mono (3-karboksipropil) ftalat                           |
| MEP     | monoetil ftalat  |
| PAEs    | ftalati  |
| PE      | polietilen   |
| PET     | polietilen tereftalat                                    |
| PVA     | polivinil acetat   |
| PVC     | polivinil klorid   |
| T2D     | dijabetes tipa II  |

---

## **1. UVOD**

PET ambalaža zbog svoje cijene i ekonomičnosti sve više nalazi mjesta u pakiranju piva, iako su već poznata njezina štetna djelovanja na okoliš i ljudsko zdravlje. Ftalati, poznati kao plastifikatori, imaju dokazano djelovanje kao endokrini disruptori i najčešće ulaze u ljudski organizam putem hrane, odnosno mogu migrirati iz plastičnih dijelova opreme s kojom hrana dolazi u dodir tijekom prerade te iz ambalaže. Ftalati se također mogu naći u mikoplastici jer mikročestice plastike služe kao vektor za različite kemikalije koje se mogu polako otpuštati u hranu i piće. Europska agencija za sigurnost hrane mikroplastiku je definirala kao "heterogenu mješavinu materijala različitog oblika koji se nazivaju fragmentima, vlaknima, sferoidima, granulama, peletima, pahuljicama ili perlama, u rasponu od 0,1 do 5,0  $\mu\text{m}$ " (EFSA, 2016), a sve više se obraća pozornost na njezin štetan utjecaj i zastupljenost u okolišu. Ovo istraživanje stoga ima za cilj definirati tipove i koncentracije ftalata u tržišno dostupnim pivima koja su pakirana u staklene boce, PET ambalažu i limenke, pomoću GC-MS-a, što uključuje pripremu uzoraka, a uzorci će se analizirati i pomoću FTIR tehnologije. Deset piva u aluminijskim limenkama, šesnaest u PET ambalaži i osamnaest u staklenim bocama kupljeno je u lokalnoj trgovini i podvrgnuto GC-MS analizi kako bi se kvantificirali i kvalificirali ftalati i kemikalije povezane sa mikroplastikom.

## **2. TEORIJSKI DIO**

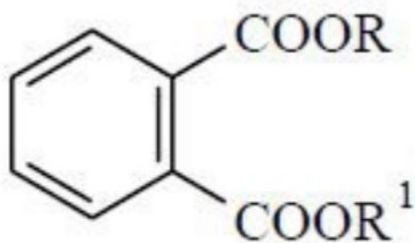
## 2.1. FTALATI

Ftalati, ili skraćeno PAEs, su esteri ftalne kiseline koji imaju mnoge industrijske primjene, ali je njihova najpoznatija uloga kao plastifikatora u industriji polimera. Ovi sintetski spojevi, od svoje prve upotrebe 1920-ih godina, postali su najčešće korišteni plastifikatori za poboljšanje mekoće, fleksibilnosti i rastezljivosti raznih plastičnih proizvoda (Horák i Olšovská, 2020). Uglavnom se dodaju različitim plastičnim materijalima, kao što su polivinil klorid, poznatiji i kao PVC, polietilen tereftalat (PET), polivinil acetat (PVA) i polietilen (PE). Ftalati se obično dodaju mnogim proizvodima za opću upotrebu, kao što su igračke, a upravo najveći doprinos unosu kod djece su imale plastične igračke, pa je uporaba ftalata u njihovoj izradi zabranjena u EU od 1999. godine; zatim proizvodi za osobnu njegu i kućanstvo, automobilska kozmetika, otapala, ljepila, pesticidi, ambalaža za hranu, medicinski uređaji, elektronika, cijevi i građevinski materijali (Schettler, 2006).

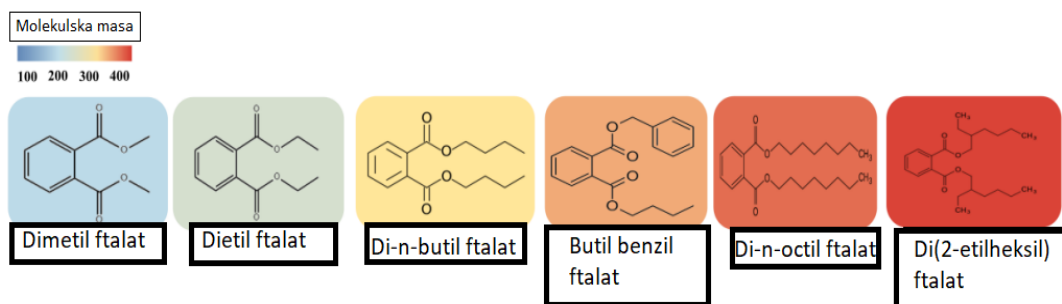
Za očuvanje boje i mirisa različitih proizvoda, dodaju se ftalati niže molekularne mase kao otapala (dietil ftalat i dibutil ftalat), dok oni više molekularne mase (bis (1-etilheksil) ftalat), dodaju se za omekšavanje PVC proizvoda (Horák i Olšovská, 2020). Budući da su ftalati podložni bio-, foto- i anaerobnoj razgradnji, nisu otporni na uvjete okoliša. S obzirom na duljinu njihovih alkilnih skupina, ftalati pokazuju različitu topljivost u vodi, što znači da ftalati s dugim alkilnim ili aromatskim dijelovima u bočnim lancima imaju manju topljivost u vodi, dok duži lanci uzrokuju izraženu lipofilnost, pa mnoge masne namirnice, kao što su riba, meso, mliječni proizvodi i biljna ulja, mogu biti bogate tim spojevima (Jurica i sur., 2013). Najefikasniji način na koji ftalati ulaze u ljudski organizam je putem hrane ili pića. Ftalati su skloni migraciji u hranu iz plastificiranih PVC materijala (brtve poklopaca za staklenke, folije i papiri za pakiranje hrane te kartonska ambalaža), ali i iz laminata aluminijske folije i papira. Hrana i piće postaju kontaminirani tijekom proizvodnih operacija i transporta, ali i uporabom PVC rukavica pri rukovanju hranom.

Budući da su ftalati sadržani u tiskarskim tintama i ljepilima na omotima hrane, odavde također migriraju u hranu (Cao, 2010). Nedavna istraživanja pokazuju kako se ftalati mogu naći i u alkoholnim pićima kao što su vino, pivo, konjak i rakija (Jurica, 2016). Naime, etanol može poticati migraciju PAEs-a djelujući kao otapalo za ekstrakciju PAEs-a. Plastični aditivi mogu doći u kontakt s vinom tijekom svih faza proizvodnje vina: transport voća, drobljenje i skladištenje uključujući različite vrste opreme i materijala poput pumpi, crijeva, sredstava za bistrenje i filtracije kod pakiranja (Plank i sur., 2018).

**Slika 1** u nastavku prikazuje općenitu formulu ftalata, dok **Slika 2** prikazuje šest najčešćih zagađivača od kojih su se neki našli i u ovom istraživanju.



**Slika 1** Općenita formula ftalata (Horák i Olšovská, 2020)



**Slika 2** Šest ftalata koji su primarni zagađivači (prema Huang i sur., 2021)

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) utvrdila je prihvatljive dnevne unose za ljude za nekoliko ftalata, uključujući bis (2-etilheksil) ftalat (DEHP), dibutil ftalat (DBP), benzil butil ftalat (BBP) i bis (2-etilheksil) adipat (DEHA). Međutim, od 2011. godine Europska unija nije propisala maksimalnu količinu ftalata u hrani i piću, već samo regulira migraciju nekih ftalata iz materijala koji dolaze u kontakt s hranom u hranu. To su male količine, s maksimalnim granicama ostataka od 1,5 mg/kg za DEHP, 0,3 mg/kg za DBP, 30 mg/kg za BBP i 18 mg/kg za DEHA (European Commission (EC). Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011).

## 2.2. PET AMBALAŽA

PET ambalaža stječe popularnost u Europi, čak i u zemljama koje su odbijale uvesti ovaj tip ambalaže, poput Češke i Slovačke. Razlozi njihove popularnosti uključuju pogodnost za transport, manju težinu u usporedbi sa staklenim bocama, dobra barijerna svojstva protiv permeacije plinova te niže troškove (Gagula i sur., 2020). Prema izvješću Pira International Ltd. (Page i sur.) u 2015. godini u središnjoj i istočnoj Europi upotrijebljeno je oko pet milijardi PET boca na tržištu piva, u usporedbi sa zapadnom Europom, gdje je taj broj bio manji od jedne

milijarde boca godišnje. Kvaliteta piva u PET bocama narušava se mnogo brže (3-4 mjeseca) nego u aluminijskim limenkama ili staklenim bocama, ali najveći problem kod korištenja PET boca je prisutnost mikroplastičnog materijala (kemikalije povezane s mikroplastikom ili mikro- i nanočestice). Budući da je mikroplastika označena kao materijal štetan za zdravlje, sve veći broj studija fokusira se na utvrđivanje utjecaja koji bi mogla imati na ljudsko i životinjsko zdravlje te mogućnosti smanjenja i minimizacije takvih čestica i kemikalija u hrani i okolišu (Rist i sur., 2018; Wright i Kelly, 2017; Habschied i sur., 2022). Zbog premaza limenki koji sadrže plastiku, pivo u aluminijskim limenkama također može sadržavati ftalate (Nurlatifah i Nakata, 2021).

U Hrvatskoj se oko 20% piva pakira u PET boce, 68% u staklene boce, 7% u limenke, a ostatak u bačve (Bičak, 2022). To pokazuje da PET boce zauzimaju značajan dio tržišta. Jasno je da je takvo pivo popularno među potrošačima. Iz tog razloga, cilj ovog preliminarnog istraživanja bio je provesti pregled kemikalija povezanih s mikroplastikom, kao što su ftalati, koji se mogu naći u komercijalno dostupnim pivima pakiranim u PET boce.

### 2.3. PRISUTNOST FTALATA U ŽIVIM ORGANIZMIMA

Ling Huang i sur. u svom istraživanju otkrivaju prisutnost ftalata u različitim dijelovima 60 biljnih vrsta i raznih algi (**Slika 3**). Korištenjem GC/MS metode, ftalati su identificirani u organskim ekstraktima određenih biljaka, s udjelima koji se kreću od 1,0% do 32%. Važno je napomenuti da neki detektirani PAEs nisu uobičajeni u industriji, što sugerira da bi mogli biti rezultat biosinteze, a ne kontaminacije tla ili zraka. Većina PAEs otkrivena je u esencijalnim uljima biljnog podrijetla, koja se mogu sintetizirati u svim dijelovima biljke (cvjetovi, pupoljci, sjemenke, lišće, grančice, kora, biljke, drvo, plodovi i korijenje). Ova ulja mogu se ekstrahirati koristeći tradicionalnu hidrodestilaciju, destilaciju organskim otapalima, hidrodestilaciju parom, ekstrakciju čvrste faze (HS-SPME) i superkričnu ekstrakciju tekućim CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-SFE). Esencijalna ulja imaju ključnu ulogu u mnogim fiziološkim i biokemijskim reakcijama, te se široko koriste u farmaceutskoj, sanitarnoj, kozmetičkoj, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji. Prijavljeno je da 26 biljaka sadrži PAEs, pri čemu je di-n-butil ftalat najzastupljeniji, pronađen u osamnaest vrsta, s udjelima od 1,5% do 87,2%.

Vrste bogate di-n-butil ftalatom uključuju:

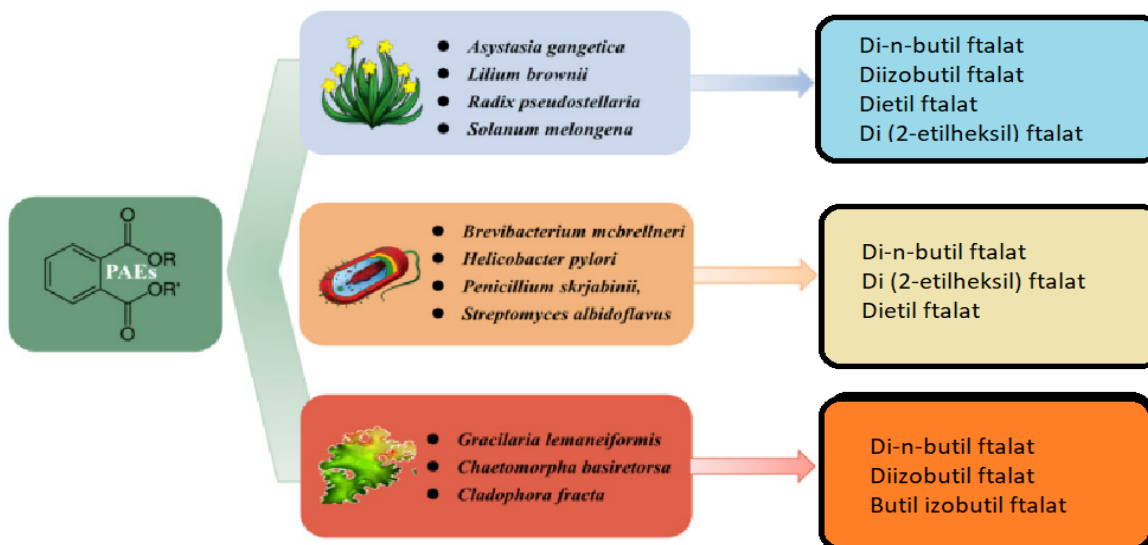
- *Radix pseudostellaria* (87,2%),
- *Clerodendrum inerme* (59,3%),
- *Pyrola rotundifolia* (40,5%),
- *Osmanthus fragrans* (15,1%) te
- *Alocasia macrorrhiza* (14,4%).

Di-n-butil ftalat i diizobutil ftalat najčešće su identificirani PAEs u lučevinama korijena biljaka kao što su *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Zea mays*, *Solanum melongena*, itd. Cheng i Xu (2012) prikupili su lučevine korijena *Lilium brownii*, koje su otkrile da su ftalatni esteri poput diizooktil ftalata (52,1%) i di(2-etilheksil) ftalata (41,0%) dominantni. Zhou i sur. (2010) proučavali su lučevine korijena cijepljenih patlidžana metodom namakanja korijena, što je dovelo do identifikacije di-n-butil ftalata (13,6%), diizobutil ftalata (1,9%) i diizononil ftalata (0,8%). GC-MS analiza pokazala je da je u metanolskom ekstraktu izlučevina korijena *Allium fistulosum* bilo jedanaest organskih spojeva, uključujući derivate ftalatnog estera, kao što su diizooktil ftalat (52,1%) i di(2-etilheksil) ftalat (41,0%).

Iako je GC/MS postupak učinkovit u detekciji PAEs-a, ima svoja ograničenja. U nekim studijama zanemarena je kalkulacija retencijskih indeksa (RI), što je smanjilo točnost identifikacije PAEs-a. Tradicionalno, preparativno kromatografsko pročišćavanje sekundarnih metabolita proizvedenih od strane biljaka uključuje primjenu kromatografije na silika gel stupcu, Sephadex LH-20 gel kromatografije, semi-preparativne HPLC, preparativne TLC, itd. Tijekom ovog postupka, PAEs poput di-n-butil ftalata i diizobutil ftalata pročišćeni su iz različitih biljnih vrsta. Liu i sur. (2011) izolirali su di-n-butil ftalat i diizobutil ftalat iz listova i stabljika *Toona ciliata*. Shi i sur. (2005) prvi su put dobili di-n-butil ftalat i diizobutil ftalat iz *C. basiretorsa* pomoću spektroskopskih metoda. Kao sekundarni metaboliti, di-n-butil ftalat i diizobutil ftalat također su izolirani iz cijelih biljaka *C. fracta*, korijena *Croton lachnocarpus* i plodova *Pyrus bretschneideri*.

Zaključno, PAEs identificirani i pročišćeni iz biljnih materijala ilustriraju da biljke mogu sintetizirati ove spojeve do određenog stupnja.





**Slika 3** Prirodna prisutnost PAEs-a u živim organizmima (prema Huang i sur., 2021)

Ftalatni spojevi kao bioaktivni prirodni proizvodi mogu biti proizvedeni ne samo od strane biljaka, već i bakterija i gljiva. Keire i sur. (2001) su prvi put izvijestili o dietil ftalatu proizvedenom od bakterije *Helicobacter pylori*, koja predstavlja novu klasu imunomodulatornih agenasa. Aboobaker i sur. (2019) izolirali su di-n-butil ftalat kao glavni bioaktivni spoj iz endofitske gljive *Pelargonium sidoides*, koja pokazuje značajan inhibitorski učinak na Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*) i Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). Rajamanikyam i sur. (2017) pročistili su dva PAEs-a, di(2-etilheksil) ftalat i di-n-butil ftalat, iz *Brevibacterium mcbrellneri*; oboje su prvi put izolirani iz ove bakterije. Di-n-butil ftalat je također izoliran iz *Streptomyces melanosporofaciens* kao učinkovit inhibitor  $\alpha$ -glukozidaze, što može pružiti korisne informacije za dizajn novih učinkovitih inhibitora glukozidaze. Nadalje, di(2-etilheksil) ftalat je izoliran iz *Streptomyces bangladeshensis* i *Penicillium olsonii*. Stoga se očekuje da se PAEs mogu karakterizirati u različitim mikroorganizmima, iako njihovi izvori ostaju nejasni (Huang i sur., 2021).

## 2.4. UČINCI NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Glavni načini izloženosti ljudi uključuju unos inhalacijom, kontaktom preko kože i intravenski (Heudorf i sur., 2007). Najveća izloženost javlja se kroz prehrambene proizvode kontaminirane DEPH-om iz plastičnih posuda ili ambalaže. Karačonji i sur. (2017) navode kako izloženost putem vode za piće i zraka u okolini doprinosi samo u manjoj mjeri ukupnom dnevnom unosu. Do sada je izloženost PAEs-ima povezana s nizom zdravstvenih problema; uključujući

endokrine i reproduktivne poremećaje, rani pubertet, endometrioza, spolne anomalije, neplodnost, promijenjeni fetalni razvoj, rak dojke i kože, pretilost, dijabetes tipa II, poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (ADHD), poremećaje iz spektra autizma, kardiotoksičnost, hepatotoksičnost i nefrotoksičnost (**Slika 4**) (Giuliani i sur., 2020).

Važno je napomenuti da djeca i odrasli različito reagiraju na izloženost PAEs-ima, zbog dječje navike da stavljaju ruke u usta, što bi ih lako moglo dovesti do unosa DEHP-a. Iako je provedeno vrlo malo studija o njihovim neurotoksičnim učincima, pretpostavlja se da ftalati utječu na pojavu nekoliko neuroloških poremećaja. Primijećeno je da izloženost PAEs-ima u ranom životu (npr. DEHP, MEP i MCP) može negativno utjecati na kogniciju (IQ djece), osobito u dobi od 3 godine, dok nije pronađena povezanost tijekom trudnoće ili kod djece starije od 3 godine (Li i sur., 2019).

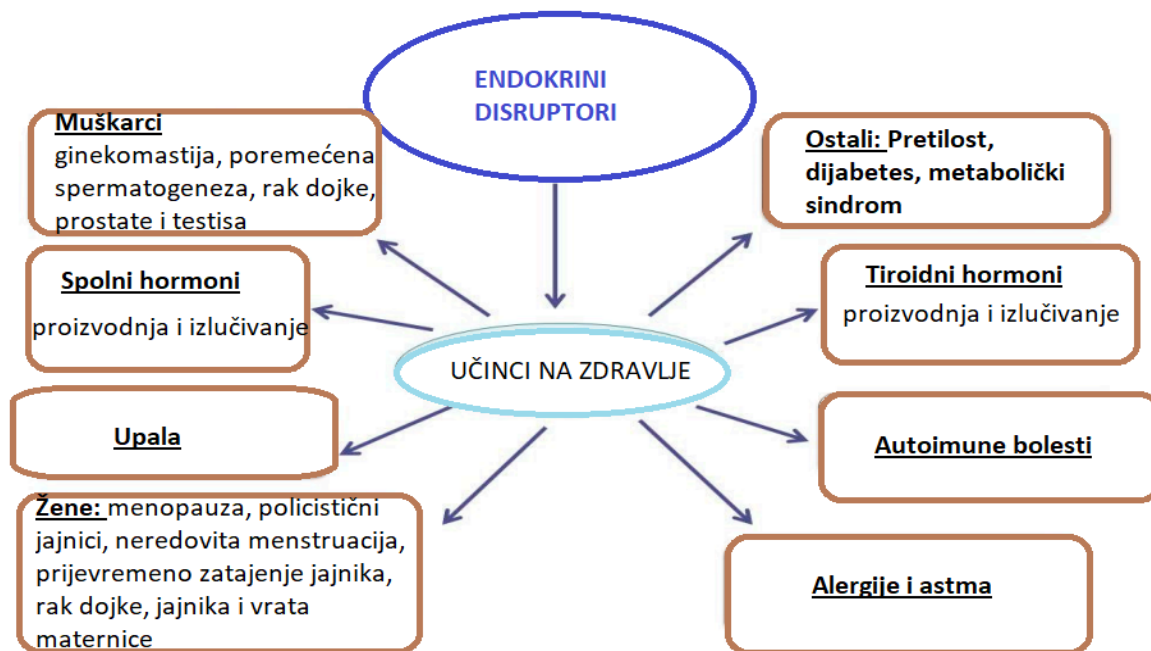
Druga studija pružila je dokaze o negativnom učinku DINP-a na psihomotorne vještine djece nakon prenatalne izloženosti (Polanska i sur., 2014). Međutim, zbog zajedničkih izvora i puteva izloženosti ljudi različitim kemijskim spojevima, kao što su npr. poliklorirani bifenili, polibromirani difenil eteri, te trenutno korištenim pesticidima – organofosfatima i piretroidima, bisfenolu A i ftalatima, izazovno je utvrditi koji je kemijski spoj ili metabolit odgovoran za određeni zdravstveni učinak (Karačonji i sur., 2017). Ftalati su opsežno povezani s nekoliko ljudskih karcinoma, uključujući rak kože, jetre, prostate i dojke. Također, problemi sa plodnošću u posljednjim desetljećima, za koje se pretpostavlja da su povezane sa okolišnim uzrocima, izazivaju globalnu pažnju znanstvenika, ali i opće populacije. Subplodnost predstavlja zdravstveni i socijalni problem koji pogađa sve veći broj osoba, od kojih 25–30% čine muškarci.

Zanimljivo je da je u studiji koju su proveli Minguez-Alarcon i suradnici analizirana korelacija između izloženosti PAEs-ima i opadanja koncentracije spermija i broja spermija za 37% odnosno 42% u specifičnom vremenskom razdoblju (2000–2017). Kada govorimo o dijabetesu, poznato je da je inzulinska rezistencija česta karakteristika mnogih bolesti, uključujući dijabetes tipa 2 (T2D), aterosklerozu i nealkoholnu masnu bolest jetre (Samuel i sur., 2012). Među ostalim spojevima, DEHP i njegovi metaboliti povezani su s početkom i napredovanjem T2D-a. U istraživanju koje su proveli Dales i sur., (2018) autori su mjerili povezanost između izloženosti PAEs-ima (iz urinskih metabolita PAEs-a) i niza parametara kao što su razina glukoze u krvi natašte, razine glikoziliranog hemoglobina (HbA1C) i inzulina te su otkrili moguću povezanost između izloženosti PAEs-ima i povećane koncentracije markera povezanih

s predijabetesom. PAEs se smatraju disruptorima endokrinog sustava, na način da ometaju estrogen i hormone štitnjače.

Ftalati s dugim alkilnim bočnim lancem u orto poziciji imaju potencijal za reproduktivne i razvojne toksične učinke na ljude. To uključuje DEHP > di-butil ftalat > benzil-butil ftalat (u redosljedu njihovog toksičnog potencijala), kao i di-izononil ftalat, di-n-heksil ftalat i di-izobutil ftalat. Ftalati također pokazuju respiratornu toksičnost. Izloženost ftalatima tijekom djetinjstva često je povezana s oštećenjem funkcije pluća, rizikom od bronhijalne opstrukcije, astmom i alergijama kod djece, te astmom kod odraslih. Pluća novorođenih štakora izloženih DEHP-u pokazala su histološke promjene slične onima koje se primjećuju u plućima djece s bronhopulmonalnom displazijom, kroničnom plućnom bolesti tipičnom za prijevremeno rođene dojenčad (Magliozzi i sur., 2003).

Piskanje, rinitis i astma kod djece mogli bi biti povezani s višim koncentracijama benzil-butil ftalata i DEHP-a u kućnoj prašini (Karačonji i sur., 2017). Hauser i sur. (2007) u svojoj studiji iznose da su razine DEHP-a i dietil ftalata bile povezane s oštećenjem DNA spermija kod izloženih ljudi. Međutim, budući da nisu bili dostupni podaci o karcinogenosti DEHP-a kod ljudi, ali da postoje dovoljni dokazi o karcinogenosti DEHP-a kod eksperimentalnih životinja, klasificiran je kao mogući karcinogen za ljude. Ftalati čine skupinu ksenobiotika koji su pokazali značajne učinke na imunološki sustav, imitirajući prirodne hormone odgovorne za normalno funkcioniranje tijela, uključujući razvoj, reprodukciju, homeostazu i ponašanje. Kada je procijenjen utjecaj ftalata na imunološke odgovore, nisu se pojavili dosljedni rezultati. Naime, nekoliko studija izvijestilo je o pojačavanju imunoloških odgovora ili upalnih reakcija, dok druge studije nisu pokazale nikakav učinak, a neke su prikazale inhibicijski ili imunološki supresivan učinak (Giuliani i sur., 2020).



Slika 4 Učinci ftalata na ljudsko zdravlje (prema Giuliani i sur., 2020)

## 2.5. MIKROPLASTIKA

Plastika se može podijeliti u tri glavne skupine prema veličini čestica. Svi plastični materijali veći od 5 mm smatraju se makroplastikom. Kada uđu u morsko okruženje, plastični proizvodi i otpad mogu se potencijalno raspasti na manje komadiće, manje od 5 mm, koji se nazivaju mikroplastika. Mikroplastika se obično definira unutar približnog raspona veličine čestica od 50  $\mu\text{m}$  do 5 mm. Zapravo, onečišćenje koje uzrokuje ova skupina plastike smatra se prisutnijim zbog njihovih većih količina i malih veličina čestica. EFSA je mikroplastiku definirala kao: "mikroplastika je definirana kao heterogena mješavina materijala različitih oblika koji se nazivaju fragmenti, vlakna, sferoidi, granule, peleti, pahuljice ili kuglice, u rasponu od 0,1 - 5.000  $\mu\text{m}$ . Razlikovanje se može napraviti između primarne i sekundarne mikroplastike. Primarna mikroplastika su plastike koje su izvorno proizvedene da budu te veličine, dok sekundarna mikroplastika potječe od fragmentacije većih predmeta, npr. plastičnog otpada."

Procjenjuje se da u svjetskim oceanima ima više od 150 milijuna tona plastičnih materijala. Velik dio tog zagađenja čine veliki predmeti poput odbačenih boca za piće i plastičnih vrećica. Međutim, sve se više istražuje količina mnogo manjih materijala, mikroplastike, u riječnim i oceanskim sustavima, što predstavlja drugačiji tip problema za morski život (Robertson, 2015). Različite posljedice od gutanja makro-, mikro- i nano-plastike ili zaplitanja u makroplastiku također su prijavljene i dobro dokumentirane za različite vrste, uključujući ptice, kornjače, larve riba i morske sisavce (Steer, 2017). Posljedice takvog gutanja uključuju gušenje ili blokiranje

probavnog trakta, što može uzrokovati smrt (Gregory, 2009). Nekoliko studija provedenih na amfipodima, krastavcima, morskim krastavcima i školjkama izloženim mikroplastici pokazale su da ove vrste imaju sklonost gutanju mikroplastike (Thompson i sur., 2004; Browne i sur., 2008; Gouin i sur., 2008).

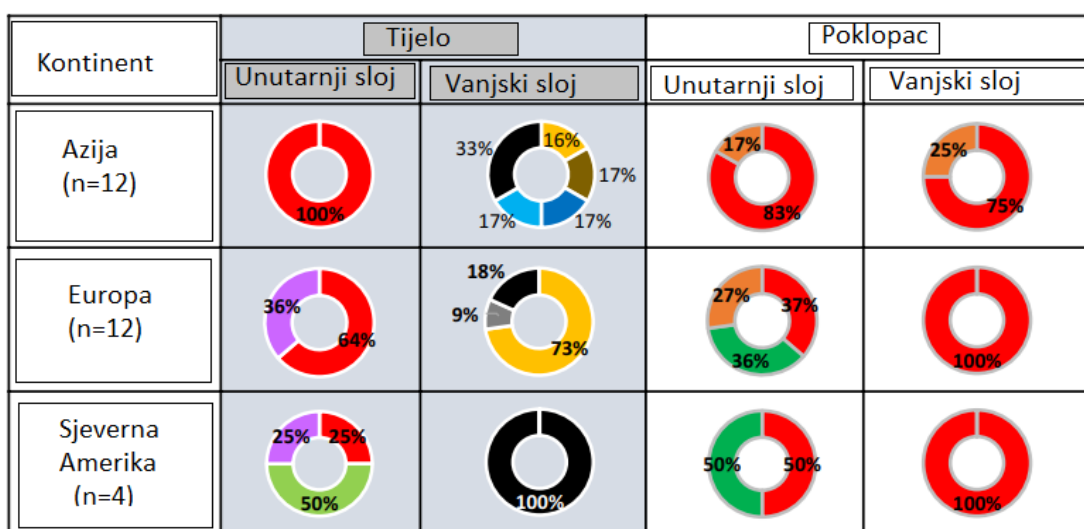
Godine 2014. nekoliko američkih saveznih država zabranilo je upotrebu mikroplastike u kozmetičkim formulacijama, a većina kozmetičkih tvrtki dobrovoljno postupno ukida njihovu uporabu. Infracrvena (IR) spektroskopija je etablirana tehnika za identifikaciju polimernih materijala i široko se koristi za identificiranje velikih (preko 100 mikrometara) polimernih materijala. Za mikroplastiku, veličine do nekoliko mikrometara, može se koristiti IR mikroskop za otkrivanje i identifikaciju tih materijala (Robertson, 2015). Osim toga, kako bi se stabilizirao polimer od degradacije uzrokovane prisutnošću UV svjetla ili zraka, u formulaciju polimera dodaje se antioksidans poput butiliranog hidroksitoluena (BHT). Zbog slabog vezivanja između plastičnih aditiva i polimera, mnogi znanstvenici zabrinuti su za njihovu sposobnost ispiranja u hranu i pića, kao i u okoliš. Prijavljeno je da se ftalati ispiru u morsku vodu iz plastičnih proizvoda poput polietilenskih vrećica i kablova od polivinil klorida. Međutim, malo je informacija dostupno o vrstama polimera i koncentracijama plastičnih aditiva u premaznim filmovima limenki proizvedenih u svijetu.

Nadalje, polimerni premazni film u ostacima limenki može biti potencijalni izvor mikroplastike nakon razgradnje u okolišu. Nurlatifah i Haruhiko Nakata u svojoj studiji istražuju vrste polimera korištene kao obloge i kemijske aditive sadržane u plastičnim filmovima limenki kao dodatnu referencu za moguću prijetnju morskom okolišu. U ovoj studiji analizirane su aluminijske limenke piva. Ukupno 27 piva iz 16 zemalja u Aziji (Kina, Indonezija, Japan, Mjanmar, Singapur, Tajland, Vijetnam), Europi (Belgija, Njemačka, Španjolska, Norveška, Rusija, Švedska, UK) i Sjevernoj Americi (Meksiko i SAD) nabavljeno je tijekom rujna i listopada 2020. Ta piva su bila popularne marke, kao i domaća zanatska piva u svojim matičnim zemljama. Osim toga, jedan uzorak limenke piva iz okoliša prikupljen je na obalnom području zaljeva Ariake, prefektura Kumamoto, a nova limenka iste marke prikupljena je za inspekciju metalne limenke nakon vremenskih uvjeta. Sadržaj svih uzoraka je potom ispražnjen, a pakiranja limenki su isprana vodom i osušena na zraku prije analize. Rezultati FTIR-a za identifikaciju polimera u premaznom filmu limenke piva pokazali su raznolikost polimernih materijala korištenih u različitim dijelovima limenke. FTIR (Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija) je analitička tehnika koja identificira polimere na temelju njihovih karakterističnih infracrvenih spektralnih otisaka.

**Rezultati:**

1. Poklopac limenke:
  - Unutarnji sloj: najčešće je prekriven epoksidnom smolom ili PET-om.
  - Vanjski sloj: epoksidna smola je također uobičajena, ali mogu se naći i drugi polimeri ovisno o uzorku.
2. Tijelo limenke:
  - Unutarnji sloj: epoksidna smola se koristi u svim analiziranim uzorcima, pružajući dobru otpornost na koroziju i prljanjanje.
  - Vanjski sloj: poli(1,2-butandiol izoftalat) bio je često korišten u europskim limenkama, dok su u nekim slučajevima korišteni i drugi polimeri.

FTIR analiza ukazuje na to da iako je epoksidna smola dominantan polimer u većini slojeva limenki, postoje značajne varijacije, posebno između unutarnjih i vanjskih slojeva tijela i poklopca limenke. Ova raznolikost u upotrebi polimera može biti povezana s različitim zahtjevima za zaštitu i funkcionalnost premaza u različitim dijelovima limenke. Na **Slici 5** možemo vidjeti sastav i vrstu polimera koje su prisutne u tijelu i poklopcu limenke.



■ Epoksidna smola ■ Polietilen tereftalat (PET) ■ Fenoksi smola

■ Poli(etil-metakrilat) (PEMA) ■ Poli(etilakrilat-ko-stiren)

■ Poli(1,2-butandiol izoftalat) ■ Poli(2,2-dimetil-1,3-propandiol ftalat)

■ Poli(butilen ftalat) ■ Poli(dialil-ftalat) ■ Akrilno ljepilo ■ Ostalo

**Slika 5** Sastav i vrsta polimera u vanjskom i unutarnjem sloju limenki piva (prema Nurlatifah i Nakata., 2021)

### 1. Poklopac limenke:

- Unutarnji sloj:
  - Epoksidna smola: često korištena zbog svoje otpornosti na koroziju i odličnog prijanjanja. Pruža zaštitu unutarnjem sadržaju limenke od kontakta s metalom.
  - Polietilen tereftalat (PET): također korišten u nekim slučajevima, osobito u europskim limenkama, zbog svoje izdržljivosti i kemijske otpornosti.
- Vanjski sloj:
  - Epoksidna smola: pretežito korištena zbog svoje otpornosti na vremenske uvjete i dobru povezanost s metalnim površinama.
  - Poliester: u nekim slučajevima korišten za dodatnu zaštitu i izdržljivost.
  - Akrilne smole: također mogu biti prisutne u vanjskim slojevima u određenim slučajevima.

### 2. Tijelo limenke:

- Unutarnji sloj:
  - Epoksidna smola: uvijek prisutna zbog svoje sposobnosti da zaštiti unutrašnjost limenke od kemijskih reakcija i korozije. Pruža dugotrajnu zaštitu od interakcije između sadržaja i metala limenke.
  - Fenolne smole: povremeno korištene u azijskim i europskim limenkama zbog njihove otpornosti na kemikalije.
- Vanjski sloj:
  - Poli(1,2-butandiol izoftalat): često korišten u europskim limenkama zbog svoje otpornosti na uvjete okoliša i dobar estetski izgled.
  - Poliester: može biti korišten za poboljšanje izdržljivosti i zaštite vanjskog sloja.
  - Akrilne smole: povremeno prisutne, osobito u limenkama koje zahtijevaju dodatnu zaštitu ili specifičan izgled.

Polimeri korišteni u premazima limenki piva variraju ovisno o dijelu limenke i specifičnim zahtjevima zaštite i funkcionalnosti. Epoksidna smola dominira u unutarnjim slojevima zbog svojih izvanrednih svojstava otpornosti, dok se razne vrste polimera koriste za vanjske slojeve kako bi se zadovoljili estetski i funkcionalni zahtjevi.

Također su analizirane kemikalije aditiva prisutne u tijelu i poklopcu limenki piva. DEHP je detektiran u gotovo svim uzorcima s najvišom koncentracijom od 5300 ng/g. BHT je detektiran u dijelovima tijela svih limenki i gotovo u svim poklopcima s maksimalnom koncentracijom od 520 ng/g. Iako je DOA imala nižu učestalost detekcije, zabilježena je koncentracija od čak

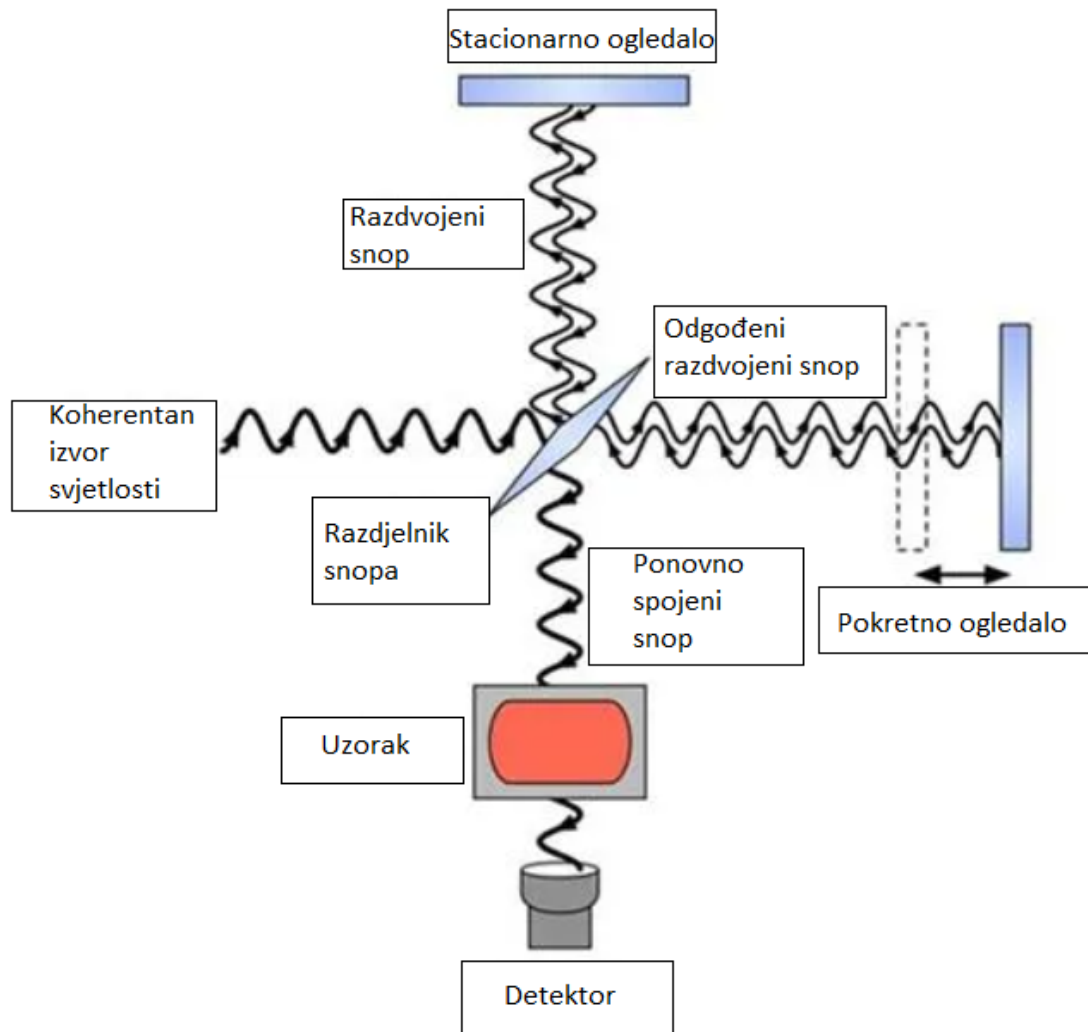
9600 ng/g u belgijskoj limenci piva. Općenito, nije bilo specifičnog obrasca koncentracije aditiva u odnosu na zemlje proizvodnje limenki piva. Jedan oštećeni uzorak iz okoliša sadržavao je jednu do dvije veličine reda više koncentracije aditiva u usporedbi s novom limenkom. S obzirom na visoku učestalost metalnih ostataka u morskom okolišu nakon plastičnih ostataka, važno je razumjeti da su materijali limenki i metalni i plastični, te da predstavljaju potencijalni izvor mikroplastike u morskom okolišu nakon raspadanja. Štoviše, potrebno je pratiti potencijalne štetne učinke mikroplastike i aditiva koji potječu iz metalnih limenki na vodeni ekosustav (Nurlatifah i Nakata, 2021).

### **2.5.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR)**

FT-IR je analitička tehnika koja se koristi za dobivanje infracrvenih spektra apsorpcije ili emisije uzoraka. Ova metoda omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju različitih kemijskih spojeva na temelju njihovih karakterističnih infracrvenih apsorpcijskih vrpca.

FT-IR spektroskopija koristi interferometar (obično Michelsonov interferometar) za mjerenje svih infracrvenih valnih duljina koje apsorbira ili emitira uzorak istodobno. **Slika 6** prikazuje princip FT-IR tehnologije.





**Slika 6** Struktura Fourierovog infracrvenog spektrometra (izvor: <https://www.powerwaywafer.com/ftir.html>)

Glavne komponente FT-IR spektrometra su:

- Izvor infracrvenog zračenja: emitira širokopoljasno infracrveno svjetlo.
- Interferometar: kombinira svjetlosne zrake iz izvora stvarajući interferencijski uzorak.
- Detektor: mjeri intenzitet interferencijskog uzorka dok se zrcalo u interferometru pomiče, stvarajući interferogram.
- Računalna obrada: primjenjuje Fourierovu transformaciju na interferogram kako bi se dobio infracrveni spektar.

FT-IR spektroskopija se koristi u različitim područjima prirodnih znanosti; Identifikacija organskih i anorganskih spojeva, proučavanje strukture proteina, lipida i drugih biomolekula, kontrola kvalitete i analiza lijekova, detekcija i kvantifikacija onečišćivača u zraku, vodi i tlu, analiza sastava i degradacije polimera.

Prednosti FT-IR metode:

- Brzina: svi valni brojevi se mjere istodobno, što omogućuje brzo dobivanje spektra.
- Visoka osjetljivost: FT-IR može detektirati vrlo male količine tvari.
- Reproducibilnost: FT-IR spektrometri pružaju visoko reproducibilne rezultate.

Ograničenja FT-IR metode:

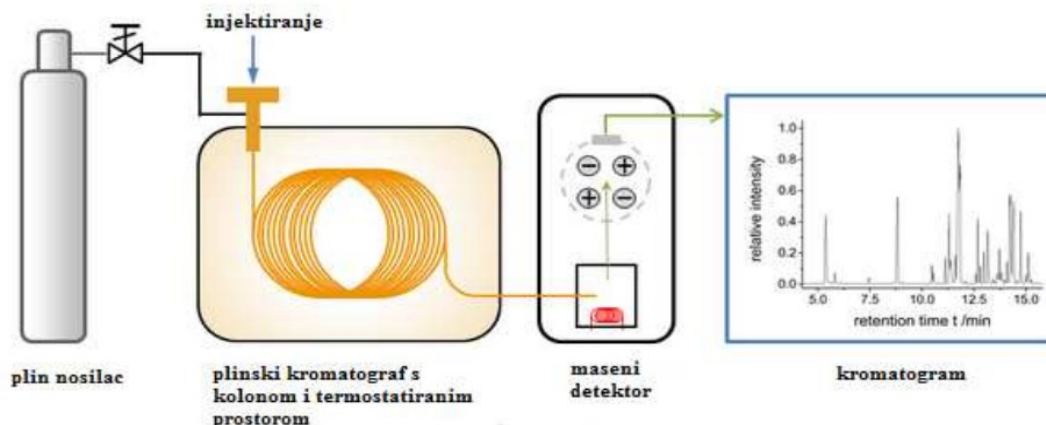
- Ograničenja u uzorcima: uzorci moraju biti kompatibilni s infracrvenim zračenjem, tj. ne smiju potpuno apsorbirati infracrveno zračenje.
- Složena interpretacija: spektri mogu biti kompleksni i zahtijevaju stručnost u interpretaciji.

FT-IR spektroskopija s Fourierovom transformacijom je ključna metoda u analitičkoj kemiji zbog svoje brzine, osjetljivosti i mogućnosti analize složenih uzoraka. S obzirom na njezinu svestranost, koristi se u mnogim znanstvenim i industrijskim područjima (Smith, 2011; White, 1990).

### **2.5.2. GC/MS metoda određivanja( Plinska kromatografija/masena spektrometrija)**

GC/MS (*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*) je analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju različitih spojeva u složenim smjesama. Ova metoda kombinira dva različita analitička pristupa: plinsku kromatografiju (koja odvaja i kvantificira pojedine komponente uzorka) i spektrometriju masa (koja identificira svaku komponentu zasebno). Povezivanjem ovih dviju tehnika značajno se povećava njihova specifičnost i osjetljivost, što omogućuje analitičkom kemičaru da istovremeno provede kvantitativnu i kvalitativnu analizu otopine koja sadrži velik broj hlapljivih i poluhlapljivih komponenti (Skoog, 1999).

**Slika 7** prikazuje shematski prikaz plinskoga kromatografa s masenim spektrometrom.



Slika 7 Shematski prikaz plinskoga kromatografa s masenim spektrometrom (Pine, 1994)

### Funkcioniranje GC/MS-a:

#### 1. Plinska kromatografija (GC):

- Načelo: plinska kromatografija razdvaja komponente smjese na temelju njihove hlapljivosti i interakcije sa stacionarnom fazom unutar kromatografske kolone. Smjesa se najprije isparava i prenosi kroz kolonu pomoću inertnog plina (npr. helijem).
- Kolona: stacionarna faza je unutar tanke kapilarne kolone, obložene tekućinom ili polimernim materijalom. Komponente smjese prolaze kroz kolonu različitim brzinama, što omogućava njihovu separaciju.
- Detekcija: nakon što se odvoje, komponente napuštaju kolonu i ulaze u maseni spektrometar.

#### 2. Masena spektrometrija (MS):

- Ionizacija: kada komponente uđu u MS, one se ioniziraju (obično pomoću elektronskog udara) kako bi se stvorili molekularni ioni.
- Fragmentacija: ovi ioni se zatim fragmentiraju u manje dijelove. Svaka molekula stvara specifičan obrazac fragmentacije, poznat kao maseni spektar.
- Analiza: fragmenti se analiziraju na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) u masenom analizatoru. Ovo generira spektar koji služi kao "otisak prsta" za svaku molekulu.

#### 3. Identifikacija i kvantifikacija:

- Identifikacija: na temelju mase i obrazaca fragmentacije, moguće je identificirati spojeve uspoređujući ih s referentnim spektrometrima u bazama podataka.
- Kvantifikacija: količina svakog spoja može se odrediti pomoću kalibracijskih krivulja i usporedbom s poznatim standardima.

**Prednosti GC/MS metode:**

- Visoka preciznost: GC/MS pruža visoku preciznost u identificiranju i kvantificiranju spojeva, omogućujući vrlo detaljnu analizu složenih smjesa.
- Osjetljivost: ova metoda može detektirati i najniže koncentracije spojeva, što je posebno korisno u analizi tragova kontaminanata u okolišu i biološkim uzorcima.
- Širok raspon: GC/MS može analizirati širok raspon kemijskih spojeva, uključujući organske molekule i njihove fragmente, što je korisno u različitim znanstvenim disciplinama.

**Primjene GC/MS metode:**

- Analiza okoliša: koristi se za detekciju i kvantifikaciju zagađivača poput pesticida, teških metala i drugih kontaminanata u zraku, vodi i tlu.
- Farmaceutska industrija: pomaže u razvoju i kontroli kvalitete lijekova, uključujući identifikaciju aktivnih sastojaka i praćenje njihovih metabolita.
- Forenzika: koristi se u forenzičkim istragama za identifikaciju droga, otrova i drugih kemikalija prisutnih u biološkim uzorcima poput krvi i urina.
- Kemijska istraživanja: pomaže u istraživanju i razvoju novih materijala i kemikalija, uključujući sintezu novih spojeva i analizu njihovih svojstava.

**Ograničenja GC/MS metode:**

- Priprema uzoraka: Za uspješnu analizu, uzorci moraju biti pripremljeni na specifičan način, što može zahtijevati složene procedure za čišćenje i koncentraciju.
- Kompleksnost: interpretacija rezultata može biti složena zbog velikog broja mogućih fragmenta i njihovih spektralnih obrazaca, što zahtijeva visoku stručnost i upotrebu referentnih baza podataka.
- Neprikladnost za nehlapljive spojeve: GC/MS nije pogodna za analizu spojeva koji nisu hlapljivi ili koji se ne mogu izložiti plinskoj kromatografiji, kao što su neki polimerni materijali.

GC/MS metoda ostaje ključna u mnogim znanstvenim i industrijskim područjima zbog svoje sposobnosti da precizno identificira i kvantificira kemijske spojeve, usprkos određenim izazovima i ograničenjima (Skoog, 1999; Pine, 1994; Sparkman i sur. 2011).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog istraživanja je definirati tipove ftalata i njihove koncentracije u tržišno dostupnim pivima pakiranim u različita pakiranja: staklene boce, PET boce i limenke. Ftalati u uzorcima su analizirani korištenjem GC-MS metode, što uključuje pripremu uzorka, također se provela analiza limenki pomoću FTIR tehnologije.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Proizvodnja piva

Postupak kuhanja piva za potrebe istraživanja proveo se kako je opisan u diplomskom radu Vuzem (2022). Stil piva koji je kuhan za ovo istraživanje bio je ale, a fermentacija je provedena kvascem Safale-US05 (Fermentis). Nakon fermentacije, pivo je stavljeno na hlađenje (2 °C) radi taloženja proteina, inaktivacije kvasca i njegovog taloženja, gaziralo se, te se nakon gaziranja punilo u PET boce zapremnine 2L. Pivo je do analize skladišteno na 4 °C.

#### 3.2.2. Priprema uzoraka za GC-MS analizu

Deset piva u aluminijskim limenkama (500 mL), 15 u PET bocama (2 L) i osamnaest u staklenim bocama (500 mL) kupljeno je u lokalnoj trgovini i podvrgnuto GC-MS analizi za kvantifikaciju i identifikaciju ftalata. Analiziran je i uzorak proizveden na PTFOS-u i pakiran u PET ambalažu. Uzorci su do analize pohranjeni na hladnom i suhom mjestu. Uzorkovanje je provedeno izravno iz boce nakon otvaranja, a analiza ftalata obavljena je prema sljedećem postupku.

Otprilike 5 mL uzorka, koji je prethodno bio dezintegriran u ultrazvučnoj kupelji tijekom 15 minuta, dodano je 5 mL acetonitrila (ACN) i 5 mL vode, a zatim preneseno u staklenu epruvetu. Smjesa je snažno protresena jednu minutu. Nakon toga, dodano je 3 g bezvodnog MgSO<sub>4</sub> i 1 g NaCl, a uzorak je ponovno protresen i centrifugiran 5 minuta.

Prema QuEChERS (eng. *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) postupku (Yadav i sur., 2017; Carnol i sur., 2017), 1 mL ekstrakta pročišćen je uz pomoć soli: 150 mg bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, 50 mg PSA (primarni sekundarni amin) i 50 mg C18 (Bond Elut C18). Nakon dodavanja soli za pročišćavanje i snažnog protresanja jednu minutu, centrifugiranje je obavljeno tijekom 5 minuta (5000 o/min). Čisti acetonitril ekstrakt prenesen je u GC bočicu i ubrizgan za analizu.

### 3.2.3. GC–MS analiza

Identifikacija ftalata temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja vrhova i ciljnih iona s onima dobivenim iz standardne mješavine ftalata (standardi su isporučeni od strane proizvođača instrumenta). Kvantifikacija se temeljila na vanjskim kalibracijskim krivuljama pripremljenim iz standardne otopine svakog od ispitivanih ftalata (Kartalović i sur., 2021).

Verifikacija vrhova izvršena je na temelju vremena zadržavanja, a ciljni ioni su uspoređeni s onima vanjskih ftalata. Analizirani su i kvantificirani otapala bez uzoraka, te su neki ftalati pronađeni u tim uzorcima, ali količina je bila manja od LOQ (granica kvantifikacije).

Određivanje je provedeno u splitless modu pri konstantnom protoku. Plin nosač bio je helij, brzina: 35.698 cm/s; tlak: 7.0 psi.

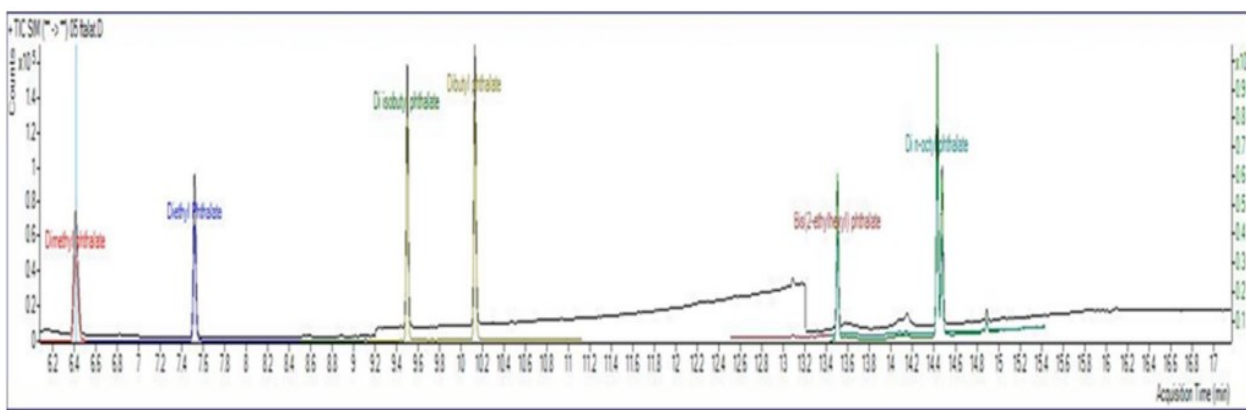
#### Kalibracija

Standardi ftalata (PAE) korišteni u ovom istraživanju, i to dimetil ftalat (DMP;  $C_{10}H_{10}O_4$ ), dietil ftalat (DEP;  $C_{12}H_{14}O_4$ ), diizobutil ftalat (DiBP;  $C_{16}H_{22}O_4$ ), dibutil ftalat (DBP;  $C_{16}H_{22}O_4$ ), bis (2-etilheksil) ftalat (DEHP;  $C_{24}H_{38}O_4$ ) i di-n-octil ftalat (DnOP;  $C_{24}H_{34}O_4$ ), kupljeni su od Dr. Ehrenstorfer™ GmbH (Augsburg, Njemačka); n-heksan je bio HPLC-kvalitete (Carlo Erba, Milano, Italija). Otopine svakog ftalata pripremljene su u koncentracijama od 1 mg/mL. Otopine ftalata u različitim koncentracijama (0.005, 0.01, 0.1, 0.05, 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) pripremljene su razrjeđivanjem u n-heksanu. Otopine su pohranjene u bočicama na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija zbog reagensa, materijala i laboratorijske opreme, provedena je temeljita procedura čišćenja prije pripreme standarda: stakleno posuđe je namočeno i oprano u acetonu i sušeno na  $140\text{ }^\circ\text{C}$  najmanje 4 sata. Sva otapala korištena u analizi testirana su kako bi se provjerila potencijalna prisutnost PAE kontaminacije, korištenjem GC-MS analize. Izuzetno čista voda proizvedena je pomoću Milli-Q sustava (Millipore, Bedford, MA, SAD) (Kartalović i sur., 2021). Granica kvantifikacije (LOQ) i granica detekcije (LOD) za analizirane ftalate prikazane su u **Tablici 1**, a kromatogram se može vidjeti na **Slici 8**.

U ovoj studiji korišten je instrument Agilent 7890B/5977A MSD (**Slika 9**) s fuzioniranom silicijskom kolonom ( $30\text{ m} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$  film debljine HP-5M) od Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, SAD). Uvjeti instrumenta bili su sljedeći: temperatura ubrizgavanja  $280\text{ }^\circ\text{C}$ , MSD  $280\text{ }^\circ\text{C}$ ; pećnica: početna temperatura  $90\text{ }^\circ\text{C}$  (držana 1 min) do  $210\text{ }^\circ\text{C}$  pri  $15\text{ }^\circ\text{C/min}$  (držana 2 min); zatim pri brzini od  $5\text{ }^\circ\text{C/min}$  do  $240\text{ }^\circ\text{C}$  (držana 5 min); nakon čega slijedi povećanje od  $5\text{ }^\circ\text{C/min}$  do  $250\text{ }^\circ\text{C}$ ; i zatim povećanje od  $25\text{ }^\circ\text{C/min}$  do  $300\text{ }^\circ\text{C}$  i držano 4 min.

**Tablica 1** Granica kvantifikacije (LOQ) i granica detekcije (LOD) za svaki analizirani ftalat.

| Ftalat                    | LOQ $\mu\text{g/mL}$ | LOD $\mu\text{g/mL}$ |
|---------------------------|----------------------|----------------------|
| Dimetil ftalat            | 0.00469              | 0.00141              |
| Dietil ftalat             | 0.00418              | 0.00030              |
| Diizobutil ftalat         | 0.00101              | 0.00030              |
| Dibutil ftalat            | 0.00101              | 0.00030              |
| Bis (2-etilheksil) ftalat | 0.00141              | 0.00032              |
| Di-n-octil ftalat         | 0.001101             | 0.00031              |

**Slika 8** Kromatogram analiziranih ftalata**Slika 9** Agilent 7890B/5977A MSD (<https://www.labx.com/item/agilent-7890b-5977a-gc-ms/11960984>)



### **3.2.4. Priprema uzoraka za FTIR i analiza**

Svi uzorci bili su filtrirani u dvije paralele pomoću celuloznog filter papira promjera 70 mm s veličinom pora od 11  $\mu\text{m}$  (GE Whatman). Daljnja analiza rađena je na FT-IR uređaju Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, SAD) Spectrum 10. Svi uzorci analizirani su u duplikatu kako je opisano u diplomskom radu Šibalić (2023).

### **3.2.5. Statistička analiza**

Provedena je analiza varijance (ANOVA) i Fisherov test najmanje značajne razlike (LSD), s minimalnom statističkom značajnošću postavljenom na  $p < 0.05$ . Statistički program Statistica 13.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA ) korišten je za obradu ovog skupa podataka.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Prema Wittasseku i sur. (2011), ftalati su fizički, a ne kovalentno, vezani za polimerne lance; stoga se lako oslobađaju u značajnim količinama u okoliš. Zbog toga završavaju u hrani i pićima. Jasno je da ftalati mogu dospjeti u pivo iz sirovina, spremnika i opreme za preradu, ali se također mogu osloboditi iz plastičnih materijala koji su u izravnom kontaktu s pivom.

Ova istraživanja imala su za cilj odrediti količine ftalata u pivima pakiranim u PET ambalaži, limenkama i staklenim bocama. Dobiveni podaci prikazani su u **Tablicama 2, 3 i 4**. Rezultati su donekle očekivani; međutim, uočene su određene razlike u odnosu na predviđanja. Pivo u staklenim bocama i PET ambalaži sadržavalo je značajno ( $p < 0,05$ ) veće količine ftalata. Dimetil ftalat i di-n-octil ftalat nisu otkriveni ni u jednom od uzoraka.

**Tablica 2** Koncentracije analiziranih ftalata ( $\mu\text{g/L}$ ) u uzorcima piva pakiranim u PET ambalažu

| Uzorak | Dimetil ftalat | Dietil ftalat | Diizobutil ftalat | Dibutil ftalat | Bis (2-etilheksil) ftalat | Di-n-octil ftalat | Zbroj   |
|--------|----------------|---------------|-------------------|----------------|---------------------------|-------------------|---------|
| P1     | <LOQ           | 0.46p         | 17.28m            | 29.73o         | 15.46n                    | <LOQ              | 62.93p  |
| P2     | <LOQ           | 5.13g         | 25.93g            | 41.75k         | 27.298i                   | <LOQ              | 100.10l |
| P3     | <LOQ           | 9.16d         | 28.04e            | 51.44g         | 24.99k                    | <LOQ              | 113.62h |
| P4     | <LOQ           | 23.08a        | 25.97g            | 49.11h         | 29.11g                    | <LOQ              | 127.27g |
| P5     | <LOQ           | 9.97c         | 43.30c            | 73.29c         | 53.13d                    | <LOQ              | 179.69c |
| P6     | <LOQ           | 4.76j         | 22.73j            | 37.68n         | 9.12p                     | <LOQ              | 74.29o  |
| P7     | <LOQ           | 4.28l         | 28.22e            | 61.10e         | 48.46e                    | <LOQ              | 142.06f |
| P8     | <LOQ           | 2.10n         | 25.46h            | 40.01l         | 23.07l                    | <LOQ              | 90.64m  |
| P9     | <LOQ           | 5.61f         | 30.24d            | 62.75d         | 85.74b                    | <LOQ              | 184.33b |
| P10    | <LOQ           | 14.21b        | 43.72b            | 86.93b         | 74.96c                    | <LOQ              | 219.82a |
| P11    | <LOQ           | 4.63k         | 24.14i            | 54.65f         | 25.22j                    | <LOQ              | 108.64i |
| P12    | <LOQ           | 4.87i         | 20.65l            | 38.15m         | 11.15o                    | <LOQ              | 74.82n  |
| P13    | <LOQ           | 4.95h         | 56.96a            | 92.17a         | 17.16m                    | <LOQ              | 171.24e |
| P14    | <LOQ           | 1.29o         | 26.88f            | 54.46f         | 95.06a                    | <LOQ              | 177.68d |
| P15    | <LOQ           | 6.53e         | 24.09i            | 47.61i         | 28.49h                    | <LOQ              | 106.72k |
| P16    | <LOQ           | 2.39m         | 22.30k            | 44.65j         | 37.95f                    | <LOQ              | 107.29j |

<sup>a-p</sup> Srednje vrijednosti triju mjerenja; vrijednosti s različitim indeksima unutar retka značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ); LOQ-granica kvantifikacije.

**Tablica 3** Koncentracije analiziranih ftalata ( $\mu\text{g/L}$ ) u uzorcima piva pakiranima u aluminijskim limenkama

| Uzorak | Dimetil ftalat | Dietil ftalat | Diizobutil ftalat | Dibutil ftalat | Bis (2-etilheksil) ftalat | Di-n-octil ftalat | Zbroj   |
|--------|----------------|---------------|-------------------|----------------|---------------------------|-------------------|---------|
| C1     | <LOQ           | 2.46bc        | 2.63a             | 2.95b          | 326.81a                   | <LOQ              | 334.86a |
| C2     | <LOQ           | 2.36c         | 2.39b             | 2.79c          | 313.15b                   | <LOQ              | 318.64c |
| C3     | <LOQ           | 2.35c         | 2.35bc            | 2.49d          | 326.71a                   | <LOQ              | 333.90a |
| C4     | <LOQ           | 2.49b         | 2.75a             | 3.07a          | 313.15b                   | <LOQ              | 321.47b |
| C5     | <LOQ           | 1.72f         | 2.07e             | 2.22e          | 131.20g                   | <LOQ              | 137.22h |
| C6     | <LOQ           | 4.15a         | 2.75a             | 2.72c          | 241.26d                   | <LOQ              | 250.89e |
| C7     | <LOQ           | 2.07d         | 2.22cd            | 4.41d          | 121.19h                   | <LOQ              | 127.91i |
| C8     | <LOQ           | 1.95e         | 2.07e             | 2.22e          | 95.45i                    | <LOQ              | 101.60j |
| C9     | <LOQ           | 1.73f         | 2.11de            | 2.39d          | 141.05f                   | <LOQ              | 147.28g |
| C10    | <LOQ           | 1.84ef        | 1.92f             | 1.99g          | 229.62e                   | <LOQ              | 235.38e |

<sup>a-j</sup> Srednje vrijednosti triju mjerenja; vrijednosti s različitim indeksima unutar retka značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ); LOQ-granica kvantifikacije.

**Tablica 4** Koncentracije analiziranih ftalata ( $\mu\text{g/L}$ ) u uzorcima piva pakiranima u staklene boce

| Uzorak | Dimetil ftalat | Dietil ftalat | Diizobutil ftalat | Dibutil ftalat | Bis (2-etilheksil) ftalat | Di-n-octil ftalat | Zbroj   |
|--------|----------------|---------------|-------------------|----------------|---------------------------|-------------------|---------|
| G1     | <LOQ           | 0.76m         | 4.29a             | 3.99bcd        | 1.11b                     | <LOQ              | 10.14cd |
| G2     | <LOQ           | 0.74m         | 4.15ab            | 3.55g          | 3.65a                     | <LOQ              | 12.10a  |
| G3     | <LOQ           | 1.52i         | 3.99bc            | 3.42gh         | 0.33hi                    | <LOQ              | 9.26ef  |
| G4     | <LOQ           | 1.56i         | 3.90cd            | 3.60fg         | 0.39gh                    | <LOQ              | 9.45e   |
| G5     | <LOQ           | 2.05c         | 2.80hi            | 3.05ij         | 0.35ghi                   | <LOQ              | 8.25g   |
| G6     | <LOQ           | 2.55a         | 3.10g             | 2.90j          | 0.40g                     | <LOQ              | 8.95f   |
| G7     | <LOQ           | 0.89l         | 3.55ef            | 4.10bc         | 1.01c                     | <LOQ              | 9.55e   |
| G8     | <LOQ           | 0.99k         | 2.35l             | 3.85de         | 0.87d                     | <LOQ              | 8.06gh  |
| G9     | <LOQ           | 2.45b         | 2.75hij           | 4.45a          | 0.41g                     | <LOQ              | 10.06d  |
| G10    | <LOQ           | 1.61hi        | 3.95bcd           | 4.20b          | 0.71e                     | <LOQ              | 10.47c  |
| G11    | <LOQ           | 1.89d         | 3.75de            | 3.95cde        | 0.58f                     | <LOQ              | 10.17cd |
| G12    | <LOQ           | 1.72fg        | 2.35l             | 3.25hi         | 0.52f                     | <LOQ              | 7.85h   |
| G13    | <LOQ           | 1.83de        | 2.85hij           | 3.75ef         | 0.73e                     | <LOQ              | 9.06f   |
| G14    | <LOQ           | 2.59a         | 2.94gh            | 4.65a          | 0.74e                     | <LOQ              | 10.92b  |
| G15    | <LOQ           | 1.67gh        | 2.53jkl           | 3.11ij         | 0.83d                     | <LOQ              | 8.14gh  |
| G16    | <LOQ           | 1.77ef        | 3.33f             | 3.93cde        | 0.97c                     | <LOQ              | 10.01d  |
| G17    | <LOQ           | 1.27j         | 2.65ijk           | 2.88j          | 0.27i                     | <LOQ              | 7.07i   |
| G18    | <LOQ           | 1.31j         | 2.45kl            | 3.07ij         | 0.40g                     | <LOQ              | 7.24i   |

<sup>a-m</sup> Srednje vrijednosti triju mjerenja; vrijednosti s različitim indeksima unutar retka značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ); LOQ-granica kvantifikacije.

Dietil ftalat je pronađen u svim uzorcima, s najvišom koncentracijom u PET bocama, dosegnuvši maksimalne vrijednosti u uzorku P4 s 23.08  $\mu\text{g/L}$ . Najniže vrijednosti otkrivene su u pivu pakiranom u staklenim bocama, s maksimalnom vrijednošću u uzorku G3 od 1.511  $\mu\text{g/L}$ , dok su piva u limenkama općenito pokazala vrijednosti iznad 2  $\mu\text{g/L}$ ; uzorak C6 imao je najvišu količinu ove kemikalije, 4.15  $\mu\text{g/L}$ , kao što je prikazano u **Tablici 5**.

Diizobutil ftalat također je otkriven u svim uzorcima, s minimalnom vrijednošću od 17.28  $\mu\text{g/L}$  u uzorku P1, a maksimalna vrijednost iznosila je 56.96  $\mu\text{g/L}$  u uzorku P13. Ovaj ftalat otkriven

je i u pivima u limenkama (maksimalna vrijednost bila je 2.75 µg/L u dva uzorka, C4 i C6), s vrijednostima nižim nego u pivima u staklenim bocama (čija je maksimalna vrijednost otkrivena u uzorku G1, 4.29 µg/L).

**Tablica 5** Izdvojene minimalne, maksimalne i prosječne vrijednosti (µg/L) analiziranih ftalata

| Uzorak | Dimetil ftalat | Dietil ftalat | Diizobutil ftalat | Dibutil ftalat | Bis (2-etilheksil) ftalat | Di-n-octil ftalat | Zbroj   |
|--------|----------------|---------------|-------------------|----------------|---------------------------|-------------------|---------|
| MIN P  | <LOQ           | 0.46c         | 17.28a            | 27.73a         | 9.12b                     | <LOQ              | 62.93b  |
| MIN G  | <LOQ           | 0.74b         | 2.35b             | 2.83b          | 0.27c                     | <LOQ              | 7.07c   |
| MIN C  | <LOQ           | 1.72a         | 1.92c             | 1.99c          | 95.45a                    | <LOQ              | 101.60a |
| MAX P  | <LOQ           | 23.09a        | 56.96a            | 92.17a         | 95.06b                    | <LOQ              | 219.82b |
| MAX G  | <LOQ           | 2.59c         | 4.29b             | 4.65b          | 3.65c                     | <LOQ              | 12.10c  |
| MAX C  | <LOQ           | 4.15b         | 2.75c             | 3.07c          | 326.90a                   | <LOQ              | 334.86a |
| AVG P  | <LOQ           | 6.46a         | 29.12a            | 54.09a         | 37.90b                    | <LOQ              | 127.57b |
| AVG G  | <LOQ           | 1.62c         | 3.20b             | 3.65b          | 0.79c                     | <LOQ              | 9.27c   |
| AVG C  | <LOQ           | 2.31b         | 2.33c             | 2.52c          | 223.75a                   | <LOQ              | 230.92a |

<sup>a-c</sup> Srednje vrijednosti triju mjerenja; vrijednosti s različitim indeksima unutar retka značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ); LOQ-granica kvantifikacije

Dibutil ftalat pokazao je posebno visoke vrijednosti u PET ambalaži u usporedbi s limenkama (**Tablica 3**) ili staklenim bocama (**Tablica 4**). Najviša vrijednost ove kemikalije otkrivena je u uzorku P13 s 92.17 µg/L, dok je najniža vrijednost zabilježena u uzorku P1, 29.73 µg/L. Kao što se može vidjeti iz Tablica 2 i 3, aluminijska limenka i staklena boca sadržavale su značajno ( $p < 0.05$ ) niže vrijednosti za dibutil ftalat, <3 µg/L za piva pakirana u aluminijske limenke i <4 µg/L za staklene boce.

Bis (2-etilheksil) ftalat također je pokazao značajne razlike između materijala za pakiranje, kako je potvrđeno u Tablici 4. Naime, maksimalna koncentracija bis (2-etilheksil) ftalata bila je 95.06 µg/L (P14) u pivu pakiranom u PET, dok je pivo pakirano u aluminijske limenke sadržavalo gotovo tri puta više vrijednosti, dosegnuvši preko 300 µg/L u nekoliko uzoraka, C1-C4. U usporedbi s tim, pivo pakirano u staklene boce imalo je niske vrijednosti ovog ftalata, s maksimalnom vrijednošću od 3.65 µg/L. Tako visoke koncentracije ove kemikalije u pivima iz aluminijskih limenki podržane su rezultatima objavljenim u studiji (Nurlatifah i Nakata, 2021). Naime, otkrili su bis (2-etilheksil) ftalat kao pretežni aditiv u tijelima limenki (71%) i poklopcima (89%).

Ukupna količina svih ftalata bila je najviša u pivu iz aluminijskih limenki, dosegnuvši 334.86 µg/L u uzorku C1. Većina ukupne količine ftalata čini bis (2-etilheksil) ftalat, jer je bio najzastupljeniji ftalat u svim uzorcima. Uzorci C1 i C3 ne pokazuju statističku razliku, ali svi ostali uzorci pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) među pivima iz limenki. Pivo

pakirano u staklene boce pokazalo je najnižu ukupnu količinu ftalata, s maksimalnom koncentracijom od 12.10 µg/L.

Nurlatifah i Nakata (2021) izvijestili su o visokim razinama ftalata u limenkama piva iz 27 zemalja, pri čemu je bis (2-etilheksil) ftalat dosegao 5300 ng/g u tijelu limenke. Ovo sugerira da sadržaj ftalata u pivu može značajno varirati između zemalja, vjerojatno zbog razlika u premazima aluminijskih limenki. Također, sadržaj alkohola u pivu može olakšati oslobađanje ftalata u napitak (Carnol i sur., 2017; Ye i sur., 2009).

S obzirom na to da ne postoje zakonska ograničenja o maksimalnim razinama ftalata u hrani i pićima, potrebna su daljnja istraživanja. Ova istraživanja trebala bi se usredotočiti na razumijevanje kako različiti čimbenici, uključujući materijale pakiranja i uvjete skladištenja, utječu na razine ftalata u pivu.

Rezultati ovog istraživanja podudaraju se s nekim prethodnim studijama, ali također otkrivaju značajne razlike. Carnol i sur. (2017) koji su istraživali staklene boce, aluminijske limenke i aluminijske boce, pronašli su znatno niže razine ftalata u aluminijskim limenkama piva u usporedbi s našim rezultatima. Konkretno, izvijestili su o maksimalnoj koncentraciji ukupnih ftalata od 61,56 µg/L za aluminijske limenke piva, dok smo u našem istraživanju identificirali koncentracije koje prelaze 300 µg/L. Osim toga, dok je bis (2-etilheksil) ftalat identificiran kao najzastupljeniji ftalat u pivu općenito, rijednosti koje je pronašao Carnol i sur. bile su znatno niže od onih u našem istraživanju, gdje su vrijednosti uglavnom bile ispod 1 µg/L.

Ove varijacije naglašavaju potrebu za nastavkom istraživanja kako bi se istražili čimbenici koji utječu na kontaminaciju ftalatima u pivu i uspostavili dosljedni standardi prihvatljivih razina.

Budući da se pivo distribuira u različite dijelove svijeta (ima dugu distribucijsku mrežu) i skladišti u različitim uvjetima (ljetne/zimske temperature, izloženost UV svjetlu), vjerojatno je da takve promjene utječu na brzinu oslobađanja različitih ftalata iz pakiranja u pivo. U svakom slučaju, mnogi čimbenici mogu utjecati na koncentracije ftalata u pivu i trebaju se uzeti u obzir.

**Tablica 5** prikazuje minimalne, maksimalne i prosječne vrijednosti svih analiziranih uzoraka te značajne statističke razlike među njima. Očito postoji značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između svih vrsta pakiranja. Najniže minimalne ukupne koncentracije ftalata pronađene su u staklenim bocama (7,07 µg/L), dok su najviše vrijednosti utvrđene u limenkama, s vrijednošću od 101,60 µg/L. Najviša maksimalna vrijednost također je zabilježena u limenkama, dosegnuvši 334,86 µg/L. PET boce su pokazale nižu maksimalnu vrijednost za ukupne ftalate (219,82 µg/L) u usporedbi s limenkama, što nije bilo očekivano. U usporedbi s PET pakiranim i limenkama

piva, staklene boce su pokazale niske vrijednosti za ukupne ftalate, s maksimalnom vrijednošću od 12,10 µg/L.

Najviše minimalne i maksimalne vrijednosti za bis (2-etilheksil) ftalat pronađene su u pivu iz aluminijskih limenki (95,45 µg/L i 326,90 µg/L). Dibutil ftalat također je pokazao relativno visoku maksimalnu vrijednost u PET-bocama, dosegnuvši 92,17 µg/L.

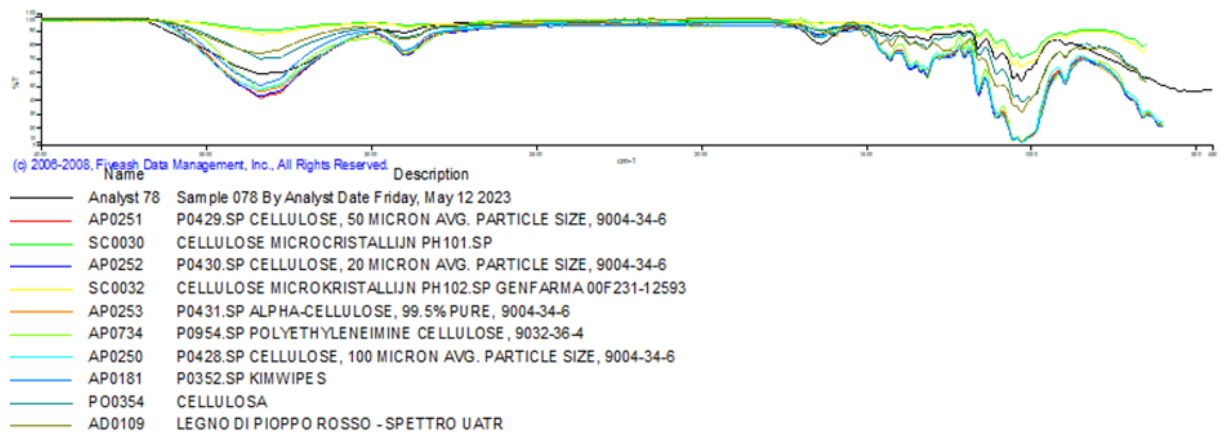
Prosječne vrijednosti ukupnih ftalata također pokazuju značajne statističke razlike između vrsta pakiranja, pri čemu je najviša vrijednost pronađena u pivu iz aluminijskih limenki (230,92 µg/L), dok je pivo u PET bocama imalo gotovo polovicu te koncentracije, 127,57 µg/L. Prosječna vrijednost piva u staklenim bocama bila je samo 9,27 µg/L. Treba imati na umu da je 96% ukupnih ftalata u pivu iz limenki poteklo od bis (2-etilheksil) ftalata (223,75 µg/L), dok je za uzorke u PET bocama dibutil ftalat (54,09 µg/L) činilo 43% ukupnih ftalata. Iz Tablice 4 može se vidjeti da, iako su piva u limenkama sadržavala veće količine ukupnih ftalata, piva u PET bocama sadržavala su značajno ( $p < 0,05$ ) više količine diizobutil ftalata (29,12 µg/L). Općenito, ovo istraživanje naglašava važnost mjerenja ftalata u pivu pakiranog u različite materijale, a posebno u pivu iz limenki.

Analize uzoraka provedene na FT-IR uređaju rezultirale su velikom količinom kemikalija, ali isticale su se sljedeće:

- klorirani polietilen,
- mikrokristalna celuloza – različitih veličina,
- polietilenimin celuloza,
- akrilonitril,
- poli(2,3-dihidrofuran),
- etoksilirani polietilenimin te
- 2-akrilamido-2-metilpropan sulfonska kiselina (AMPS).

Neke od ovih kemikalija su dokazano direktno povezane sa mikroplastikom (npr. klorirani polietilen, polietilenimin celuloza). Neke od ovih kemikalija, iako se čine nepovezane sa mikroplastikom, vjerojatno potječu od raspadanja PET polimera tijekom skladištenja ili njihovog raspadanja na manje dijelove. U većini uzoraka zabilježena je prisutnost neke mikroplastike. Ovo istraživanje bi svakako trebalo proširiti i produbiti da bi se dobila potpunija slika.

Osim mikroplastike, na FT-IR uređaju je zabilježena i prisutnost drugih kemikalija, kao što su boje za drvo, lijekovi, detergentsi. Primjer analiziranog uzorka na FT-IR uređaju, odnosno grafički prikaz dobivenih rezultata može se vidjeti na **Slici 10**.



**Slika 10** Primjer dobivenih rezultata analize u grafičkom obliku



## **5. ZAKLJUČCI**

Ova studija je potvrdila da se ftalati mogu naći u različitim vrstama piva. Posebno visoke koncentracije bis (2-etilheksil) ftalata pronađene su u pivu pakiranom u PET bocama, dok su još više vrijednosti kvantificirane u pivu u aluminijskim limenkama. Opći rezultati ukazuju na to da pivo u limenkama sadrži veće razine ukupnih ftalata u usporedbi s pivom u PET bocama. Ovo zahtijeva pažnju, budući da mnogi proizvođači prelaze na limenke. Međutim, piva u limenkama imala su visoke vrijednosti samo bis (2-etilheksil) ftalata, dok su piva u PET bocama imala visoke vrijednosti diizobutil ftalata, dibutil ftalata i bis (2-etilheksil) ftalata. To bi moglo biti rezultat slabijih veza između PET matrice i ftalata, što rezultira lakšim oslobađanjem u pivo u PET bocama. Pivo u staklenim bocama čini se najsigurnijim gledano sa zdravstvenog aspekta, jer sadrži najniže količine ftalata.

Daljnja i detaljnija istraživanja trebala bi biti provedena kako bi se potvrdili ovi nalazi. Također bi trebalo dodatno istražiti razlike između limenki iz različitih zemalja, kao i utjecaj različitih uvjeta skladištenja. U svakom slučaju, ovo je značajan preliminarni nalaz, budući da malo studija izvještava o podacima o ftalatima u pivu. Ovo otvara mogućnosti za nastavak istraživanja.

## **6. LITERATURA**

1. Aboobaker, Z., Viljoen, A., Chen, W., Crous, P.W., Maharaj, V.J. i Van, V.S., Endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides* DC: Antimicrobial interaction and isolation of a bioactive compound. *South African Journal of Botany*, 122(11), str. 535-542, 2019.
2. Bičak, D., Najveći uvoznik piva, zbog krize svuda raste prodaja u PET ambalaži. *Poslovni dnevnik*. 2013. <https://www.poslovni.hr/svijet-i-regija/bih-najveci-uvoznik-piva-zbog-krize-svuda-raste-prodaja-u-pet-ambalazi-254488> (Pristupljeno: 12. kolovoza 2024.).
3. Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M. i Thompson, R.C., Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(12), str. 5026-5031, 2008.
4. Cao, X.I., Phthalate esters in foods: Sources, occurrence and analytical methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), str. 21-43, 2010.
5. Carnol, L., Schummer, C. i Moris, G., Quantification of six phthalates and one adipate in Luxembourgish beer using HS-SPME-GC/MS. *Food Analytical Methods*, 10(1), str. 298-309, 2017.
6. Cheng, Z. i Xu, P., GC-MS identification of chemicals in lily root exudates. *Journal of Northwest A&F University, Natural Science Edition*, 40(3), str. 202-208, 2012.
7. Dales, R.E., Kauri, L.M. i Cakmak, S., The associations between phthalate exposure and insulin resistance,  $\beta$ -cell function and blood glucose control in a population-based sample. *Science of the Total Environment*, 612(19), str. 1287-1292, 2018.
8. EC, Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *European Commission*. 2011. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R0010> (Pristupljeno: 22. srpnja 2024.).
9. EFSA, Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM): Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*, 14(6), str. 45-50, 2016.
10. Gagula, G., Mastanjević, K., Mastanjević, K., Krstanović, V., Horvat, D. i Magdić, D., The influence of packaging material on volatile compounds of pale lager beer. *Food Packaging and Shelf Life*, 24(9), str. 160-196, 2020.
11. Giuliani, A., Zuccarini, M., Cichelli, A., Khan, H. i Reale, M., Critical review on the presence of phthalates in food and evidence of their biological impact. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), str. 5655-5655, 2020.
12. Gouin, T., Roche, N., Lochman, R. i Hodges, G., A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. *Environmental Science & Technology*, 45(3), str. 1466-1472, 2011.
13. Gregory, M.R., Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(122), str. 2010-2019, 2009.
14. Habschied, K., Mastanjević, K., Šibalić, M., Krstanović, V. i Galić, V.A., Survey on detection of plastic-related chemicals in beer packaged in PET using FT-IR technology. *Beverages*, 8(73), str. 1-10, 2022.

15. Hauser, R., Meeker, J.D., Singh, N.P., Silva, M.J., Ryan, L., Duty, S. i Calafat, A.M., DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Human Reproduction*, 22(3), str. 688-695, 2007.
16. Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. i Angerer, J., Phthalates: toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(5), str. 623-626, 2007.
17. Huang, L., Zhu, X., Zhou, S., Cheng, Z., Shi, K., Zhang, C. i Shao, H., Phthalic acid esters: Natural sources and biological activities. *Toxins*, 13(495), str. 2-17, 2021.
18. Jurica, K., Uršulin-Trstenjak, N., Vukić-Lušić, D., Lušić, D. i Smit, Z., Exposure to phthalates and their presence in alcoholic beverages. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64(19), str. 317-325, 2013.
19. Karačonji-Brčić, I., Jurica-Anić, S., Lasić, D. i Jurica, K., Facts about phthalate toxicity in humans and their occurrence in alcoholic beverages. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 68(2), str. 81-92, 2017.
20. Kartalović, B., Vranešević, J., Petrović, J., Đurđević, B. i Ratajac, R., Detekcija ostataka mikroplastike - Razvoj metode za ftalate u medu. *Archives of Veterinary Medicine*, 14(2), str. 19-33, 2021.
21. Keire, D.A., Anton, P., Faull, K.F., Ruth, E., Walsh, J.H., Chew, P., Quisimoro, D., Territo, M. i Reeve, J.R., Diethyl phthalate, a chemotactic factor secreted by *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(91), str. 48847-48853, 2001.
22. Li, N., Papandonatos, G.D., Calafat, A.M., Yolton, K., Lanphear, B.P., Chen, A. i Braun, J.M., Identifying periods of susceptibility to the impact of phthalates on children's cognitive abilities. *Environmental Research*, 172(76), str. 604-614, 2019.
23. Liu, Y.B., Cheng, X.R., Qin, J.J., Yan, S.K. i Zhang, W.D., Chemical constituents of *Toona ciliata* var. *pubescens*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(1), str. 115-119, 2011.
24. Magliozzi, R., Nardacci, R., Scarsella, G., Di Carlo, V. i Stefanini, S., Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: Catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 120(13), str. 41-49, 2003.
25. Minguez-Alarcon, L.W., Chiu, Y.H., Gaskins, A.J., Nassan, F.L., Hauser, R. i Chavarro, J.E., Secular trends in semen parameters among men attending a fertility center between 2000 and 2017, Identifying potential predictors. *Environment*, 121(20), str. 1297-1303, 2018.
26. Nurlatifah-Nakata, H., Monitoring of polymer type and plastic additives in coating film of beer cans from 16 countries. *Scientific Reports*, 11(1), str. 220-225, 2021.
27. Page, A., Pira International Ltd. Plastic Packaging Market Trends and Forecasts. 2024. Dostupno na: <https://www.slideshare.net/adampage1976/plastic-packaging-market-trends-and-forecasts> (24. srpnja 2024.).
28. Plank, C.M. i Trela, B.C., A review of plastics use in winemaking: HACCP considerations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 69(10), str. 307-320, 2018.
29. Polanska, K., Ligocka, D., Sobala, W. i Hanke, W., Phthalate exposure and child development: The Polish Mother and Child Cohort Study. *Early Human Development*, 90(2), str. 477-485, 2014.
30. Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Parvathaneni, S.P., Koude, D., Sripadi, P., Misra, S., Amanchy, R. i Upadhyayula, S.M., Isolation and characterization of phthalates from

- Brevibacterium mcbrellneri* that cause cytotoxicity and cell cycle arrest. *EXCLI Journal*, 16(2), str. 375-387, 2017.
31. Rist, S., Carney-Almroth, B., Hartmann, N.B. i Karlsson, T.M., A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *Science of the Total Environment*, 626(39), str. 720-726, 2018.
  32. Robertson, I., Infrared, IR microscopy. *PerkinElmer*, 2015.
  33. Samuel, V.T. i Shulman, G.I., Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell*, 148(21), str. 852-871, 2012.
  34. Schettler, T., Human exposure to phthalates via consumer products. *International Journal of Andrology*, 29(7), str. 134-139, 2006.
  35. Shi, D., Han, L., Sun, J., Wang, Y., Yang, Y., Shi, J. i Fan, X., Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorsa*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 30(3), str. 347-350, 2005.
  36. Šibalić, M., *Primjena infracrvene spektroskopije Fourierovom transformacijom u detekciji mikroplastike u pivu*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2023.
  37. Skoog, D.A., West, D.M. i Holler, F.J., *Uvod u kromatografske metode. u: Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, str. 645-674, 1999.
  38. Smith, B.C., *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press, str. 1-60, 2011.
  39. Sparkman, O.D., Penton, Z.E. i Kitson, F.G., *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Elsevier Science, 2(2), str. 15-70, 2011.
  40. Steer, M., Cole, M., Thompson, R.C. i Lindeque, P.K., Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel. *Environmental Pollution*, 226(33), str. 250-259, 2017.
  41. Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., John, A.W.G., McGonigle, D. i Russell, A.E., Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*, 304(78), str. 838-869, 2004.
  42. Vuzem, M., *Proizvodnja i karakteristike lager piva proizvedenog kveik kvascem*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
  43. White, R., *Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications*. Taylor and Francis, 1(1), str. 1-37, 1990.
  44. Wittassek, M., Koch, H., Angerer, J. i Brüning, T., Assessing exposure to phthalates: The human biomonitoring approach. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(22), str. 7-31, 2011.
  45. Wright, S.L. i Kelly, F.J., Plastic and human health: A micro issue? *Environmental Science & Technology*, 51(11) str. 6634-6647, 2017.
  46. Yadav, S., Rai, S., Srivastava, A.K., Panchal, S., Patel, D.K., Sharma, V.P., Jain, S. i Srivastava, J.P., Determination of pesticide and phthalate residues in tea by QuEChERS method and their fate in processing. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), str. 3074-3083, 2017.
  47. Ye, C.W., Gao, J., Yang, C., Liu, X.J., Li, X.J. i Pan, S.Y., Development and application of an SPME/GC method for the determination of trace phthalates in beer using a calix [6] arene fiber. *Analytica Chimica Acta*, 64(11), str. 64-74, 2009.
  48. Zhou, B.L., Yin, Y.L., Zhang, F.L. i Ye, X.L., Allelopathic effects of root exudates of grafted eggplants on *Verticillium dahliae* and their constituents' identification. *Allelopathy Journal*, 25(7), str. 393-402, 2010.