

Karakterizacija meda od komorača kromatografijskom tehnikom (GC-MS) i spektroskopijom (FTIR-ATK)

Delonga, Franka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:603797>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

KARAKTERIZACIJA MEDA OD KOMORAČA
KROMATROGRAFSKOM TEHNIKOM (GC-MS) I
INFRACRVENOM SPEKTROSKOPIJOM (FTIR)

DIPLOMSKI RAD

FRANKA DELONGA

Matični broj: 46

Split, listopad 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

**KARAKTERIZACIJA MEDA OD KOMORAČA
KROMATROGRAFSKOM TEHNIKOM (GC-MS) I
INFRACRVENOM SPEKTROSKOPIJOM (FTIR)**

DIPLOMSKI RAD

FRANKA DELONGA

Matični broj: 46

Split, listopad 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRATUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY
FOOD TECHNOLOGY

**CHARACTERIZATION OF FENNEL HONEY BY
CROMATOGRAPHIC TECHNIQUE (GC-MS) AND INFRARED
SPECTROSCOPY (FTIR)**

MASTERS THESIS

FRANKA DELONGA

Parent number: 46

Split, october 2022

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko – tehnološki fakultet u Splitu
Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je je prihvaćena na 26. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko – tehnološkog fakulteta u Splitu održanoj 18.ožujka, 2022.

Mentor: doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

KARAKTERIZACIJA MEDA OD KOMORAČA KROMATROGRAFSKOM TEHNIKOM (GC-MS) I INFRACRVENOM SPEKTROSKOPIJOM (FTIR)

Franka Delonga, 46

Sažetak: U ovom radu analiziran je kemijski sastav meda od komorača. Hlapljivi spojevi izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) s dva različita vlakna (sivo vlakno i plavo vlakno) i ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom (USE). Analiza izoliranih hlapljivih spojeva uzoraka provedena je metodom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS). Također je izvršena FTIR analiza gdje se dobila opća slika sastava meda od komorača. Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pomoću sivog vlakna izolirano je 26 hlapljivih spojeva, a pomoću plavog vlakna izolirano je 18 spojeva. Ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom izolirano je 13 spojeva. FTIR analizom je utvrđeno da ima razlike u krivulji meda od komorača i glukoznog sirupa.

Ključne riječi: med od komorača, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS, ekstrakcija, FTIR

Rad sadrži: 37 stranica, 19 slika, 4 tablice, 33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Sanja Perinović Jozić

predsjednik

2. doc. dr. sc. Miće Jakić

član

3. doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

mentor

Datum obrane: 31. listopada 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 33.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology Split at session no 26. held 18th of May, 2022.

Mentor: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.

CHARACTERIZATION OF FENNEL HONEY BY CROMATOGRAPHIC TECHNIQUE (GC-MS) AND INFRARED SPECTROSCOPY (FTIR)

Franka Delonga, 46

Abstract: In this paper was, the chemical composition of fennel honey is analyzed. Volatile compounds were isolated by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibers (grey fiber and blue fiber) and organic solvent ultrasonic extraction (USE). The analysis of the isolated volatile compounds of the samples was performed by the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. FTIR analysis was also performed, where a general picture of the composition of fennel honey was obtained. By microextraction of the peak pairs on the solid phase, 26 volatile compounds were isolated using the gray fiber and 18 compounds were isolated using the blue fiber. 13 compounds were isolated by ultrasonic extraction with an organic solvent. It was determined by spectroscopy (FTIR-ATR) that the curve of honey differ from the curve of glucose syrup.

Keywords: fennel honey, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS, extraction, FTIR

Thesis contains: 37 pages, 19 pictures, 4 tables, 33 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Sanja Perinović Jozić, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Miće Jakić, PhD, assistant prof. | member |
| 3. Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof. | supervisor |

Defence date: October 31th, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od veljače do listopada 2022. godine.

Od srca se zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Zvonimiru Marjanoviću na strpljivosti, susretljivosti i posvećenom vremenu tijekom izrade završnog rada, te na prenesenom znanju. Hvala svim profesorima koji su svojim zalaganjem prenosili znanje tijekom studiranja. Hvala mojim prijateljima i kolegama na poticanju, ohrabrivanju i pomoći. Posebno hvala mojoj obitelji na pomoći, odricanju i vjeri u uspjeh.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz uzorka meda od komorača.

Potrebno je:

- Izolirati hlapljive spojeve uzorka meda od komorača pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi koristeći:
 - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm
 - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5cm.
- Izolirati hlapljive spojeve uzorka meda od komorača pomoću ultrazvučne ekstrakcije organskim otapalom (pentan: dietil – eter 1:2).
- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS).
- Odrediti sastav meda od komorača pomoću FTIR analize.

SAŽETAK

U ovom radu analiziran je kemijski sastav meda od komorača. Hlapljivi spojevi izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) s dva različita vlakna (sivo vlakno i plavo vlakno) i ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom (USE). Analiza izoliranih hlapljivih spojeva uzoraka provedena je metodom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS). Također je izvršena analiza na FTIR uređaju gdje se dobila opća slika sastava meda od komorača. Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pomoću sivog vlakna izolirano je 26 hlapljivih spojeva, a pomoću plavog vlakna izolirano je 18 spojeva. Ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom izolirano je 13 spojeva. FTIR analizom je utvrđeno da ima razlike u krivulji meda od komorača i glukoznog sirupa.

Ključne riječi: med od komorača, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS, ekstrakcija, FTIR

SUMMARY

In this paper, the chemical composition of fennel honey was analyzed. Volatile compounds were isolated by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibers (grey fiber and blue fiber) and organic solvent ultrasonic extraction (USE). The analysis of the isolated volatile compounds of the samples was performed by the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. FTIR analysis was also performed, where a general picture of the composition of fennel honey was obtained. By microextraction of the peak pairs on the solid phase, 26 volatile compounds were isolated using the gray fiber and 18 compounds were isolated using the blue fiber. 13 compounds were isolated by ultrasonic extraction with an organic solvent. It was determined by spectroscopy (FTIR-ATR) that the curve of honey differ from the curve of glucose syrup.

Key words: fennel honey, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS, extraction, FTIR

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. MED	2
1.2. KLASIFIKACIJA MEDA	3
1.2.1. Nektarni med	4
1.2.2. Med medljikovac	4
1.3. KEMIJSKI SASTAV MEDA	5
1.3.1. Ugljikohidrati	6
1.3.2. Voda	6
1.3.3. Enzimi	7
1.3.4. Organske kiseline	7
1.3.5. Aminokiseline	7
1.3.6. Minerali i vitamini	8
1.3.7. Hidroksimetilfurfural (HMF)	8
1.4. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA	9
1.4.1. Viskoznost	9
1.4.2. Kristalizacija	9
1.4.3. Higroskopnost	9
1.4.4. Optička aktivnost	10
1.4.5. Električna vodljivost	10
1.5. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA	11
1.5.1. Boja	11
1.5.2. Miris i aroma	12
1.5.3. Okus	13
1.6. HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA	13
1.8. METODE EKSTRAKCIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA	14
2. EKSPERIMENTALNI DIO	17
2.1. MED OD KOMORAČA	17
2.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI	17
2.3. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA ORGANSKIM OTAPALOM	19
2.4. PLINSKA KROMATOGRAFIJA I SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)	20

2.5. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA	22
3. REZULTATI.....	23
3.1. PRIKAZ REZULTATA	23
4. RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA	35

UVOD

Med je prirodno sladak proizvod kojeg proizvode medonosne pčele od nektara medonosnih biljaka, sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka. (1) Namijenjen je prehrani ljudi zbog svog bogatog sastava. Pčele žive u zajednicama koje se sastoje od matice, pčela radilica i trutova koji obavljaju određene zadaće. (2)

Prema podrijetlu med se dijeli na nektarni ili medonosni med i medljikovac. Različite vrste meda razlikuju se u ovisnosti o geografskom podrijetlu, klimi, pasmini pčela te o sposobnosti pčelara da doradi i skladišti med. Boja, okus i miris meda su najvažnija senzorska svojstva meda koja ovise o biljnom podrijetlu meda te o uvjetima čuvanja i prerade. (1)

Fizikalna svojstva meda usko su povezana s kemijskim sastavom. U fizikalna svojstva ubrajamo kristalizaciju, viskoznost, higroskopnost, električnu provodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije i specifičnu masu. Prema kemijskom sastavu med se sastoji uglavnom od šećera glukoze i fruktoze te vode. Također, sadrži druge tvari poput vitamina, minerala, enzima, bjelančevina, organskih kiselina, fenola i derivata klorofila koji zajedno medu daju bogata nutritivna svojstva. (3)

Cilj ovog rada je izolirati hlapljive spojeve iz uzorka meda od komorača mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi i ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom te izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Također, odrediti strukturu meda i moguće patvorenje meda od komorača.

1. OPĆI DIO

1.1. MED

Med je prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim djelovima biljaka, koje pčele sakupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja. (1).

Pčele su socijalna bića koja žive u pčelinjim zajednicama koje se sastoje od matice (reproduktivna ženka), pčela radilica (spolno nerazvijene ženke) i trutova (mužjaci) što je vidljivo na slici 1. (2)



Slika 1. Članovi pčelinje zajednice (2)

U svakoj pčelinjoj zajednici nalazi se jedna matica. Ona je majka svih članova pčelinje zajednice i održava rad zajednice. Najbrojniji članovi zajednice su radilice koje obavljaju sve poslove zajednice (gradnja saća, čišćenje košnice, obrana zajednice, sakupljanje hrane i ostalo). Trutovi imaju samo reprodukcijску ulogu te ih pčele izbacuju iz zajednice kada prestane ispaša pčela.

Autentičnost meda određena je *Codexom Alimentariusom* koji određuje identitet i zahtjeve kvalitete meda koji je namijenjen prehrani ljudi. (1)

Med je prirodna viskozna, aromatična i slatka hrana koja se uglavnom sastoji od šećera i drugih sastojaka kao što su enzimi, aminokiseline, organske kiseline, minerali, vitamini, karotenoidi i tvari

arome. Boja, sastav, miris i okus meda potječu uglavnom od cvijeća, a ovise o klimi, zemljopisnom podrijetlu i vrstama pčela te o uvjetima koji utječu na pčele koje proizvode med. Med je proizvod koji podliježe raznim promjenama tijekom skladištenja, a to su oksidacijske promjene, fermentacija i različite kemijske reakcije.

Zbog prisutnosti flavonoida i fenolnih sastojaka med ima antioksidacijsko djelovanje. (3) Uz antioksidacijsko djelovanje, med ima i protuupalno, antibakterijsko te antineoplastično djelovanje. Proizvodnja vodikovog peroksida (H_2O_2) i pčelinjeg defensina-1, niska pH vrijednost te visoka osmolarnost utječu na antibakterijska svojstva meda. (2)

1.2. KLASIFIKACIJA MEDA

Med prema podrijetlu dijeli se na:

1. nektarni ili cvjetni med koji može biti uniflorni ili multiflorni
2. medljikovac koji je dobiven od izlučevina kukaca *Hemiptera* koji žive na djelovima biljaka ili od sekreta dijelova biljaka.

Prema načinu proizvodnje med dijelimo na:

1. vrcani med dobiven vrcanjem meda otklopljenog saća bez legla
2. prešani med dobiven prešanjem saća bez legla
3. med u saću kojeg pčele skladište u stanicama svježe izgrađenog saća s leglom u satnim osnovama izrađenim od voska
4. med sa saćem ili dijelovima saća
5. cijedeći med koji se dobiva cijedenjem otklopljenog saća bez legla
6. filtrirani med koji se dobiva uklanjanjem anorganskih ili organskih tvari.

Pekarski med je med koji se koristi kao sastojak hrane ili u industriji. Može imati strani okus ili miris, biti u stanju vrenja, prevrilo ili biti pregrijan. (1)



Slika 2. Med (4)

1.2.1. Nektarni med

Nektar je, prema kemijskom sastavu, otopina šećera zajedno s drugim tvarima poput aminokiselina, aromatskih tvari, vitamina, organskih kiselina, esencijalnih ulja i minerala. Sastav nektara razlikuje se od biljke do biljke pa razlikujemo tri kategorije nektara:

- nektar s dominantnom saharozom
- nektar s jednakom količinom glukoze, fruktoze i saharoze
- nektar s dominantnom fruktozom ili glukozom. (2)

Cvjetni ili nektarni med dobiven je od cvjetnog nektara, šećerno bogate tekućine koja se proizvodi u biljnim žlijezdama nektarijama ili mednicama. Obzirom na pašu, nektarni med može biti uniflorni kod kojeg prevladava nektar jedne biljke, ili poliflorni kod kojeg pronalazimo nektare više biljaka. Nektarni med ima slabije izraženu boju i slađi je u odnosu na medljikovac jer sadrži više monosaharida. Također, sadrži manje mineralnih tvari i pH vrijednost mu je 3,6 - 4,3 što pokazuje blagu kiselost. (5)

1.2.2. Med medljikovac

Medljika ili medna rosa je slatka tvar koja se javlja na listovima i ostalim dijelovima bjelogoričnih i crnogoričnih biljnih vrsta. Medljiku proizvode kukci roda *Hemiptera* koji žive na živim dijelovima biljaka ili žive od izlučevina živih dijelova biljaka. Pčele sakupljaju medljiku ili mednu rosu koju prerađuju u med medljikovac. (5) Medljikovac prema podrijetlu potječe od bjelogoričnih (hrast, bukva, lipa) i crnogoričnih (smreka, jela, bor) biljnih vrsta. U odnosu na nektarni med,

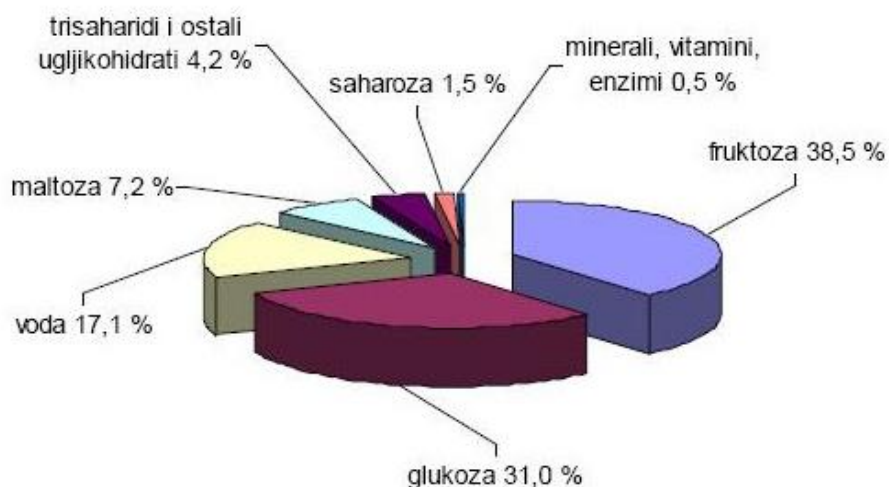
medljikovac je više obojen, manje je sladak, pH vrijednost mu je veća od 4,2 i ima manje kiselina te sadrži više mineralnih tvari. (2)

Komercijalna važnost medljikovca raste jer su mu se pokazala bolja terapijska svojstva, odnosno antimikrobna i antibakterijska svojstva u odnosu na nektarni med. Med od medljikovine ima veći sadržaj oligosaharida, uključujući melecitozu i rafinozu. (6)

1.3. KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med je namirnica koja sadrži oko 200 tvari, a sastoji se uglavnom od šećera glukoze i fruktoze te vode s kojom čine oko 99% meda. Također, sadrži druge tvari poput bjelančevina, minerala, vitamina, enzima, organskih kiselina, fenola i derivata klorofila. (3) Prosječan kemijski sastav meda prikazan je na slici 3.

Različite vrste meda razlikuju se u ovisnosti o geografskom podrijetlu, klimi, pasmini pčela te o sposobnosti pčelara da doradi i skladišti med. (5)

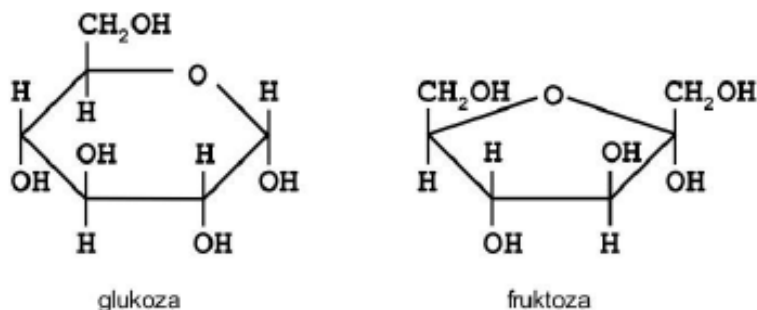


Slika 3. Prosječan kemijski sastav meda (7)

1.3.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati čine 73 – 83% meda što utječe na fizikalna svojstva meda poput viskoznosti, hidroskopnosti, kristalizaciji, gustoći i mikrobiološkoj stabilnosti. Najzastupljeniji šećer je fruktoza (38,5%) nakon koje slijedi glukoza (31%) kod većine vrsta meda, osim kod meda podrijetlom od maslačka i repice. Osim glukoze i fruktoze čije su kemijske strukture prikazane na slici 4, med sadrži disaharide poput saharoze, maltoze, izomaltoze, nigeroze, kobioze, te oligosaharide poput erloze, melecitoze, maltotrioze, panoze, centoz, izopanoza i rafinoza te izomaltotetroza i izomaltopentoza.

Uz pomoć omjera glukoze i fruktoze te ostalih navedenih šećera s vodom može se odrediti težnja meda kristalizaciji. Bitno je poznavanje količine disaharida saharoze kako bi se moglo predvidjeti patvorenje meda. (5)



Slika 4. Kemijska struktura glukoze i fruktoze (8)

Medljikovac uglavnom sadrži oligosaharide, trisaharide rafinozu i melecitozu, dok nektarni med navedene oligosaharide ne sadrži. Na osnovu toga može se odrediti vrsta meda i nezakonito dodavanje sirupa, odnosno šećera medu. (9)

1.3.2. Voda

Voda je, poslije šećera, najzastupljeniji sastojak meda (15 – 23%). Sadržaj vode je važan jer utječe na kvalitetu meda i njegovo čuvanje. Ovisi o botaničnom podrijetlu, klimi, nektaru i uvjetima čuvanja meda. (2) Med koji sadrži manje od 17,1% vode neće fermentirati kroz godinu dana, iako ni to nije sigurno zbog prisutnosti kvasaca u medu, temperature i raspodjeli vode nakon procesa kristalizacije. (9)

Voda značajno utječe na neka fizikalna svojstva meda (higroskopnost, kristalizaciju, viskoznost). Zbog higroskopnosti meda količina vode u njemu nije stalna veličina, već se za vrijeme čuvanja, u ovisnosti o vlažnosti zraka, mijenja. (10)

1.3.3. Enzimi

Med se od drugih sladila razlikuje zbog prisutnosti enzima. Enzimi u medu potječu iz nektara i medonosnih pčela, a enzimske aktivnosti u medu povezane su s protokom nektara, koncentracijom i sastavom nektara te pčela. (9)

Sadrži enzime invertazu, dijastazu, glukoza oksidazu, peroksidazu, polifenol oksidazu, esterazu, katalazu, kiselu fosfatazu, inulazu i proteolitičke enzime. Invertaza hidrolizira saharozu na jednostavne šećere, fruktozu i glukožu. (10) Dijastaza se sastoji od α -amilaze, koja razgrađuje škrob na dekstrine, i β -amilaze, koja razgrađuje maltozu. Glukoza oksidaza oksidira glukožu do glukonolaktona koji stvara glukonsku kiselinu pri čemu nastaje vodikov peroksid. Nadalje, katalaza razlaže vodikov peroksid na vodu i kisik, kisela fosfataza hidrolizira estere fosfatne kiseline, esteraza hidrolizira esterske veze i proteaza hidrolizira proteine i polipeptide na manje peptide. (2, 5)

Aktivnost enzima smanjuje se zagrijavanjem i predugim skladištenjem. Dijastaza najčešće ukazuje na toplinsku obradu jer joj se tada smanjuje aktivnost. Zbog toga se za razlikovanje botaničkog podrijetla koriste svježi medovi. (9)

1.3.4. Organske kiseline

Iako organske kiseline čine manje od 0,5% sastojaka meda, daju važan doprinos organoleptičnim svojstvima kao što su okus i boja te fizikalnim i kemijskim svojstvima kao što su pH vrijednost, električna vodljivost i kiselost. (11) Najzastupljenija organska kiselina je glukonska kiselina koja nastaje djelovanjem glukoza oksidaze na glukožu. Osim glukonske kiseline, prisutne su mravlja, oksalna, maslačna, octena, limunska, vinska, jabučna, piroglutaminska, mliječna, benzojeva, maleinska, valerijanska, jantarna, pirogroždana, α -ketoglutarna, glikolna i 2,3-fosfogliceratna. (5)

1.3.5. Aminokiseline

Aminokiseline u medu potječu od životinjskog ili biljnog porijekla, odnosno od pčela ili od cvijeta. Od 18 prisutnih aminokiselina u medu, prolin je najzastupljenija aminokiselina i služi kao indikator

zrelosti meda. Prolin potječe iz pčela prilikom prerade nektara u med i čini najmanje 66% ukupnih aminokiselina. Osim prolina, važne su aminokiseline glutaminska kiselina, alanin, fenilalanin, leucin, tirozin i izoleucin. (12)

1.3.6. Minerali i vitamini

Minerali u medu su malo zastupljeni, ali imaju važnu ulogu za ljudski organizam. Medovi koji sadrže više minerala, tamniji su.

U medu su, osim minerala, u maloj količini prisutni i vitamini topivi u vodi, tj. vitamini B skupine (tiamin, riboflavin, nikotinamid, piridoksin, pantotenska kiselina, biotin i folna kiselina) te vitamin C. (12)

1.3.7. Hidroksimetilfurfural (HMF)

Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklički aldehid proizveden razgradnjom šećera u *Maillardovoj* reakciji tijekom obrade hrane ili dugog skladištenja. Prisutnost jednostavnih šećera, mineralnih tvari i kiselina može povećati nastajanje HMF-a. Koncentracija HMF-a služi kao parametar svježine meda jer ga u svježem medu obično nema, dok u starijem ili loše skladištenom medu ima tendenciju porasta koncentracije. Osim uvjeta skladištenja, na koncentraciju HMF-a utječu i metalne posude te izvori meda.

Brzina stvaranja HMF-a ovisi o omjeru fruktoza/glukoza i vrsti nastalih šećera. Zabilježeno je da fruktoza ima pet puta veću reaktivnost od glukoze te da veći omjer fruktoza/glukoza ubrzava reakciju.

Komisija *Codex Alimentarius* je količinu HMF-a ograničila na 40 mg/kg. Na taj način se osigurava da proizvod nije podvrgnut zagrijavanju tijekom obrade i siguran je za konzumaciju. (13)

1.4. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA

U fizikalna svojstva meda ubrajamo kristalizaciju, viskoznost, higroskopnost, električnu provodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije i specifičnu masu. Navedena fizikalna svojstva usko su povezana s kemijskim svojstvima meda. (14)

1.4.1. Viskoznost

Viskoznost ovisi o sastavu meda, osobito o količini vode. Što je manja količina vode, viskoznost meda je veća. Osim količine vode, na viskoznost utječe prisutnost bjelančevina te odnos monosaharida i oligosaharida. Na viskoznost utječe i temperatura, tj. što je veća temperatura viskoznost je manja i obrnuto. (5)

1.4.2. Kristalizacija

Kristalizacija je prirodno svojstvo meda jer je med prezasićena otopina šećera u vodi. Zbog prezasićenosti otopine, dolazi do spontanog taloženja glukoze koja gubi vodu i prelazi u kristalni oblik. Voda koja je bila vezana na glukozu postaje slobodna pa med postaje skloniji kvarenju i procesu fermentacije. (5)

Brzina kristalizacije ovisi o omjeru šećera glukoze i fruktoze. Kristalizacija će biti brža ako med sadrži više glukoze u odnosu na fruktozu i obrnuto. Prilikom brže kristalizacije, nastaju finiji kristali, dok kod sporije kristalizacije, kada je više fruktoze nego glukoze, nastaju veći i nepravilni kristali. Kristalizaciju mogu potaknuti čestice peludi, dijelovi voska i propolisa te zračni mjehuri prisutni u medu.

Pri temperaturama od 14 °C kristalizacija je najbrža, a kako se temperatura snižava prestaje i kristalizacija. Uz djelovanje na temperaturu, kristalizacija se može odgoditi filtriranjem. Tako se uklone čestice koje služe kao jezgre od kojih počinje kristalizacija. (2)

1.4.3. Higroskopnost

Higroskopnost je svojstvo meda da upija vlagu iz zraka. Ovisi o relativnoj vlažnosti prostora, količini vode i količini fruktoze koja je higroskopnija od glukoze i drugih šećera. Zbog velike

viskoznosti meda, gibanje apsorbirane vode s površinskih slojeva u unutrašnjost je sporo, tako da se promjene koje nastaju zbog higroskopnosti očituju uglavnom na površini.

Med upija vlagu iz zraka ako je relativna vlažnost veća od 60 %, a ako je relativna vlažnost manja, med otpušta vlagu što je vidljivo u tablici 1.

Tablica 1. Ovisnost relativne vlažnosti i udjela vode u medu (15)

Relativna vlažnost zraka (%)	Udio vode (%)
50	15,9
55	16,8
60	18,3
65	20,9
70	24,2
75	28,3
80	33,1

1.4.4. Optička aktivnost

Med posjeduje svojstvo zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti zbog različitog sastava ugljikohidrata. Fruktaza zakreće ravninu ulijevo, dok glukoza i polisaharidi udesno. Na osnovu toga svojstva može se razlikovati nektarni med od medljikovca. Nektarni med sadrži više fruktoze pa je negativan i zakreće ravninu ulijevo, a medljikovac zakreće ravninu udesno zbog prisutnosti oligosaharida (melecitoza i erloza). (5)

1.4.5. Električna vodljivost

Električna vodljivost je sposobnost meda da provodi električnu struju. Jedinica joj je mS/cm, odnosno *Millisiemens* po centimetru. Mjeri se konduktometrom. Za provođenje električne struje u medu zaslužne su disocirane kiseline i minerali u ionskom obliku. Vrijednosti električne vodljivosti kreću se između 0,06% i 2,17 mS/cm. (5)

Utvrđeno je da se vrijednosti električne vodljivosti za medljikovac nalaze iznad 0,8 mS/cm. Za nektarni med je ta vrijednost ispod 0,8 mS/cm, uz iznimku kestenovog meda kojem vrijednost električne provodljivosti ide iznad 0,8 mS/cm. (2)

1.5. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

Boja, okus i miris meda su najvažnija senzorska svojstva meda koja ovise o biljnom podrijetlu meda te o uvjetima čuvanja i prerade. Njihova analiza ima značajnu ulogu u definiranju ukupnih svojstava meda.

1.5.1. Boja

Boja meda kreće se od gotovo bezbojne do tamno smeđe boje ovisno o vrsti medonosne biljke. Boje meda prikazane su na slici 5. (2) Izrazito svijetlu boju ima bagremov med, a kestenov tamnu. Boja je određena i udjelom karotenoida, flavonoida, klorofila, antocijana, tanina i šećera.

Med postaje tamniji zbog *Maillardove* reakcije pri kojoj dolazi do kondenzacije proteina i aminokiselina s reducirajućim šećerima te zbog dugotrajnog čuvanja pri višim temperaturama, a svjetliji postaje zbog procesa kristalizacije jer su kristali glukoze bijeli. Na boju utječu količina pepela, pogotovo bakra, mangana i željeza. (5)



Slika 5. Boje meda (16)

1.5.2. Miris i aroma

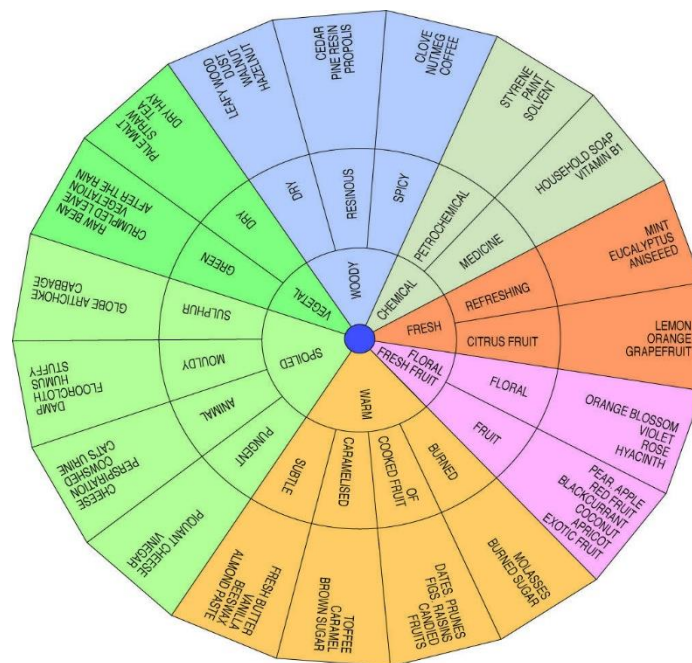
Vrsta meda može se raspoznati prema mirisu i okusu. Miris i okus meda potječu od nektara koji sadrži aromatične tvari. Tvari arome su lako hlapljive pa se dugotrajnim čuvanjem meda smanjuju, kao i zagrijavanjem na temperature više od 35 °C. U medu je uočeno preko 200 spojeva arome koje potječu od aldehida, ketona, ugljikovodika, karbonilnih spojeva, estera i aromatskih kiselina u organskim kiselinama. (2) Okus i aroma monoflornog meda karakteristični su biljci od koje je dobiven, a kod poliflornog meda okus i aroma nisu karakteristični biljci.

Miris meda potječe od:

- alkohola (propanol, izopropanol, etanol, butanol, izobutanol, pentol, fenol)
- karbonilnih spojeva (acetaldehid, propilaldehid, aceton, metiletilketon, formaldehid)
- estera (metilni i etilni spojevi mravlje, octene, propionske, benzojeve kiseline)

U mirisne komponente ubraja se i hidroksimetilfurfural.

Tvari koje utječu na miris meda lako isparavaju pri visokim temperaturama i dugotrajnim čuvanjem. (5)



Slika 6. Kotač mirisa i arome za med (15)

Kotač arome (slika 6) služi kako bi se jednostavnim rječnikom opisao senzorski profil različitih vrsta meda, posebno monofloernih. Tim belgijskih stručnjaka razvio je standardiziranu terminologiju za miris i aromu te je osmišljen kotač mirisa i arome za med. Svi izrazi su smješteni na kotaču koji ima sekcije i podsekcije. (17)

1.5.3. Okus

Okus je jedna od najvažnijih organoleptičkih odlika meda. Ovisi o biljnoj vrsti, sadržaju šećera i kiseline. Med je sladak zbog sadržaja šećera, tj. fruktoze koja je slađa od glukoze i saharoze. Zbog različitog omjera navedenih šećera svaki med nije jednako sladak. Također, neke vrste meda karakterizira gorak i trpak okus, primjerice kestenov med. Mineralne i organske tvari, bjelančevine i druge tvari prisutne u medu daju cjelokupan dojam na okus.

Kao i kod mirisa, prekomjerno zagrijavanje meda i skladištenje mogu nepovoljno djelovati na okus meda. (2)

1.6. HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA

Hlapljivi spojevi ključna su značajka arome meda. Poznato je da med posjeduje brojne hlapljive spojeve, koji uz mikro i makro spojeve, daju prepoznatljiv okus meda. (18) Hlapljivi spojevi mogu se svrstati u sedam skupina:

- aldehidi
- ketoni
- alkoholi
- kiseline
- esteri
- ugljikovodici
- ciklički spojevi. (19)

Hlapljivi spojevi u medu mogu nastati:

- direktnim prijenosom iz biljke
- proizvodnjom od strane pčela
- pretvorbom biljnih sastojaka od strane pčela
- pretvorbama spojeva prisutnih u nezrelom medu
- dodatnim postupcima obrade.

Nekoliko hlapljivih spojeva, poput 3-hidroksi-2-butanona, 2,3-butandiola, 1-hidroksi-2-propanona i 1-(2-furanil)-etanona, predloženo je za razlikovanje cvjetnog meda od medljikovine. Spojevi 3-hidroksi-2-butanon, 2,3-butandiol, 1-hidroksi-2-propanon pokazali su najveću korelaciju s medom od medljike, dok je 1-(2-furanil)-etanon povezan s cvjetnim medom. (20)

1.7. PROBLEMATIKA PATVORENJA MEDA

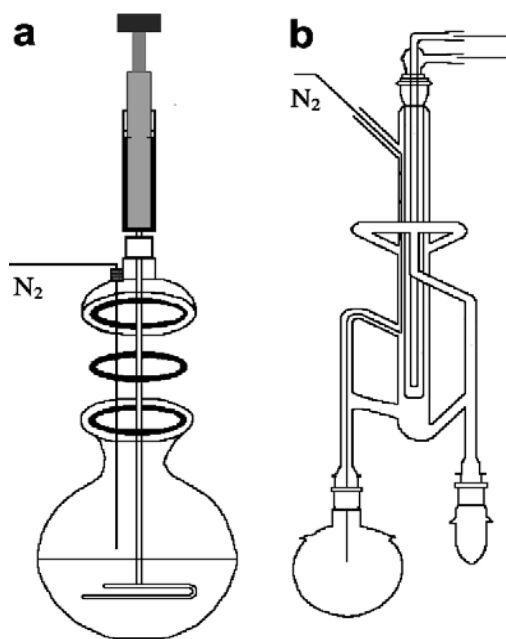
Patvoreni med predstavlja jedan od glavnih ekonomskih problema pčelarstva. Velik broj proizvoda koji se stavlja na tržište ne sadrži deklaraciju na kojoj piše sadrži li med patvorine ili strane tvari. Patvorenje satnih osnova može ugroziti dobrobit pčelinje zajednice narušavanjem uvjeta za kemijsku komunikaciju, negativnim utjecajem na normalan razvoj legla. Također može otežati proces vrcanja meda, kao i kakvoću meda. Metode koje se koriste za otkrivanje patvorenje meda su plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS), spektroskopija u srednjem infracrvenom dijelu spektra s Fourierovom transformacijom u kombinaciji s univerzalnom prigušenom totalnom refleksijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy – universal attenuated total reflectance* - FTIR-UATR). Kontaminacija parafinom dovodi do propadanja košnica, a stearinska kiselina ima negativan učinak na razvoj pčelinjeg legla. (21)

1.8. METODE EKSTRAKCIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

Tehnike metode ekstrakcije hlapljivih spojeva su hidrodestilacija (HD), mikro - simultana destilacija - ekstrakcija (MSDE), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (USE).

Ekstrakcija hlapljivih spojeva iz meda je kompleksna jer se zagrijavanjem meda stvaraju hlapljivi spojevi ugljikohidrata i aminokiselina koje su prisutne u medu. Da bi se dobio reprezentativni profil spojeva ili *fingerprint*, treba odabrati prikladnu metodu ekstrakcije.

Hidrodestilacija (HD), zajedno sa simultanom destilacijom - ekstrakcijom otapalom (SDE) koristi se za izolaciju hlapljivih spojeva, iako zbog aktivnog nastajanja artefakata nisu pogodne za određivanje *fingerprinta*. Kako bi se izbjegli nedostaci klasičnih metoda, u današnje vrijeme se koriste mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i ultrazvučna ekstrakcija otapalom (USE).



Slika 7. a) Pred-ekstrakcija meda s diklormetanom b) Simultana destilacija-ekstrakcija otapalom
(22)

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) je tehnika bez otapala u kojoj se koristi vlakno s polimernom ovojnicom za odvajanje spojeva iz matrice i prijenos u injektor GC-a na analizu. (22) Nedostatak HS-SPME je što ima ograničenu osjetljivost. Prednosti HS-SPME su jednostavnost, izbjegavanje organskih otapala i mogućnost korištenja u kombinaciji s plinskom kromatografijom. (23)

Ultrazvučna ekstrakcija otapalom (USE) omogućuje ekstrakciju vodotopljivih spojeva i poluhlapljivih spojeva koji imaju malu molekulsku masu što se ne može provoditi pomoću

hidrodestilacije (HD). Korištenje ultrazvučne vodene kupelji je jednostavno, lako za provedbu i brzo zbog ultrazvuka koji ubrzava ekstrakciju. Otapalo se primjenjiva za ekstrakciju hlapljivih spojeva meda jer se tako izbjegava pojava artefakata. (22) Ultrazvuk visoke snage omogućava djelovanje kavitacije na stijenku, stoga je veći kontakt između otapala i unutarstaničnog sadržaja. Tako se povećava efikasnost ekstrakcije i ubrzava se proces. (24)

1.9. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

Infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared Spectroscopy*, IR) je analitička metoda koja koristi infracrveno zračenje za proučavanje strukture tvari. Daje detaljnije informacije o sastavu i građi tvari. Infracrveni dio se u elektromagnetskom spektru zračenja nalazi u području 0,8 – 1000 mikrometara. Molekule pod utjecajem IR zračenja vibriraju na točno određenim amplitudama što ovisi o masama atoma u molekuli i čvrstoći veza. Upravo te karakteristike molekula omogućuju određivanje funkcionalnih skupina od kojih se molekula sastoji.

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) je spektroskopska metoda mjerenja koja bilježi infracrveni spektar uzorka i daje informaciju o njegovom ukupnom kemijskom sastavu. Ova metoda uspješno se koristi za određivanje sastava meda, kao i za detekciju patvorenja meda. FTIR spektroskopija zahtjeva malu količinu uzorka s malom ili gotovo nikakvom pripremom. Koristi se za otkrivanje patvorenja s invertnim sirupom od šećerne repe, djelomično invertnim sirupom od šećerne trske, visoko fruktoznim kukuruznim sirupom, dekstroznim sirupom i šećernim sirupom od saharoze. (25)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

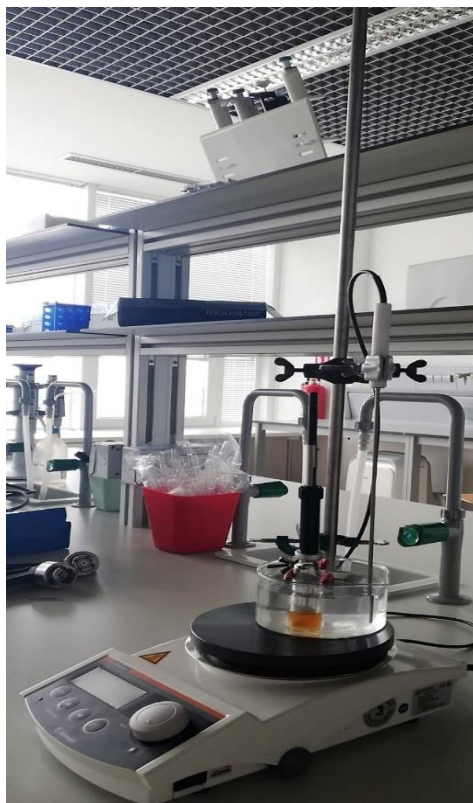
2.1. MED OD KOMORAČA

Komorač je aromatična biljka koja često raste uz druge biljke, stoga je teško dobiti monoflorni med od komorača. Prije sjemena, komorač stvara žute cvjetove pune nektara koji privlače medonosne pčele. Cvjetovi sadrže svijetložuti do zlatno - smeđi pelud i imaju topao, aromatičan miris. (26) Kemijski sastav komorača ovisi o morfotipu, podrijetlu, klimi i fazi berbe. Sadrži vodu, proteine, masti, ugljikohidrate, vlakna, pepeo (Ca, Fe, K, Mg, Na, P i Zn), vitamin A, tiamin, niacin, i riboflavin. (24) Med od komorača je tamne boje, mirisa i okusa karamele. Karakterizira ga spora kristalizacija. (20)

U ovom radu korišten je med od komorača iz Požeške županije. Med je nabavljen 2021. godine iz OPG-a Pavliša.

2.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Volumen od 5 mL vodene otopine uzorka meda i 2 mL zasićene otopine NaCl se stavi u staklenu posudu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori PTFE/silikon septom i postavi u vodenu kupelj (60 °C). Sadržaj u posudi se miješa magnetskom miješalicom. Na slici 9 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi.

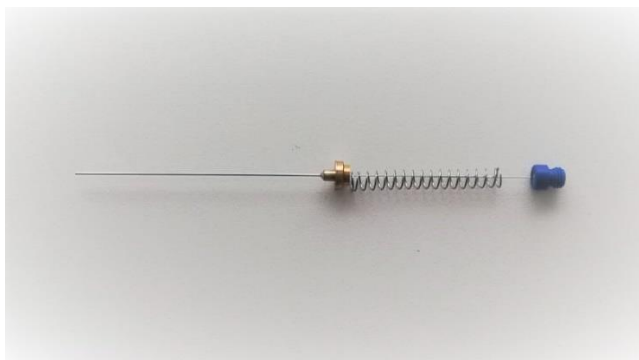


Slika 8. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 °C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Sivo vlakno je kondicionirano na isti način 60 min na 270 °C. Nakon kondicioniranja, vlakna su korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je najpogodnije vlakno za ekstrakciju vršnih para uzoraka meda s obzirom na ukupni broj identificiranih spojeva u vršnim parama. Za med od komorača korišteno je:

- plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (slika 10)
- sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5cm (slika 11).



Slika 9. Plavo vlakno polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB)



Slika 10. Sivo vlakno divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS)

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, vlakno se izvlači te se provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min uz konstantnu brzinu miješanja otopine uzorka meda (1000 o/min). Nakon uzorkovanja, SPME vlakno se vraća u iglu, izvlači iz posude i postavlja u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje se provodi toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu. (22)

2.3. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA ORGANSKIM OTAPALOM

Izolacija hlapljivih spojeva provedena je u ultrazvučnoj kupelji metodom indirektno sonifikacije pri frekvenciji 35 kHz i temperaturi 25 ± 3 °C. Odvagani uzorak (40 g) u tikvici od 100 mL i razrijedi se s 22 mL destilirane vode. Postupno se dodaje 1,5 g bezvodnog $MgSO_4$ i intenzivno se miješa. Ultrazvučna ekstrakcija je provedena s pentan: dietil – eterom u omjeru 1:2 s ciljem dobivanja reprezentativnog profila hlapljivih i poluhlapljivih spojeva.

U tikvicu s uzorkom dodano je 20 mL pentan: dietil-etera i provedena je ultrazvučna ekstrakcija u vremenu od 30 min što je prikazano na slici 11. Centrifugiranjem 5 min na 4000 o/min, izdvojen je sloj organskog otapala koji je filtriran preko bezvodnog MgSO_4 . Vodeni sloj je vraćen u tikvicu, a ekstrakcija s novom količinom pentan: dietil-etera (20 mL) i odjeljivanje slojeva ponovljeno je dva puta na isti način. Organski ekstrakti koncentrirani su frakcijskom destilacijom do 0,2 mL, a 1 mL je korišten za GC-MS analizu. (22)



Slika 11. Ultrazvučna ekstrakcija otapalom

2.4. PLINSKA KROMATOGRAFIJA I SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva uzoraka provedena je metodom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) koristeći plinski kromatograf model 7890A, u kombinaciji s masenim detektorom 7820A, spojen na računalo (slika 13).



Slika 12. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)

Za separaciju komponentni je korištena kapilarna kolona HP-5MS gdje je stacionarna faza (5% fenil-metilpolisiloksan, duljina 30 m, promjer 25 μm i debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm).

Uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu su:

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

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV
- temperatura ionskog izvora: 280 °C
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

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

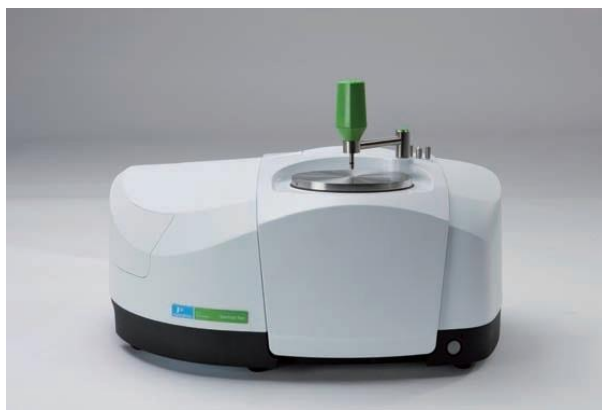
- kromatogram ukupne ionske struje
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbliži spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postocima
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima.

Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS-SPME i šprice za ekstrakte s otapalom (injektirani volumen ekstrakata je 1 μL). (22)

2.5. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

Za određivanje strukture meda i mogućeg patvorenja meda upotrijebila se metoda infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) na FTIR spektrometru *Spectrum Two* (Perkin-Elmer, SAD) u području valnih brojeva $\bar{\nu}=4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$, pri rezoluciji od 4 cm^{-1} i 10 snimaka pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. FTIR spektri uzoraka snimljeni su tehnikom univerzalne prigušne totalne refleksije (engl. *Universal Attenuated Total Reflectance*, UATR) na dijamantom refleksijskom elementu pomoću Perkin - Elmerovog Spectrum IR računalnog programa.

Uz pomoć ove metode može se odrediti opća slika meda, ali ne i o kojem je medu riječ.



Slika 13. FTIR spektrometar *Spectrum Two* (27)

3. REZULTATI

3.1. PRIKAZ REZULTATA

Hlapljivi spojevi meda od komorača određeni su vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama (tablica 2 i tablica 3) i u obliku kromatograma (slika 14 i slika 15).

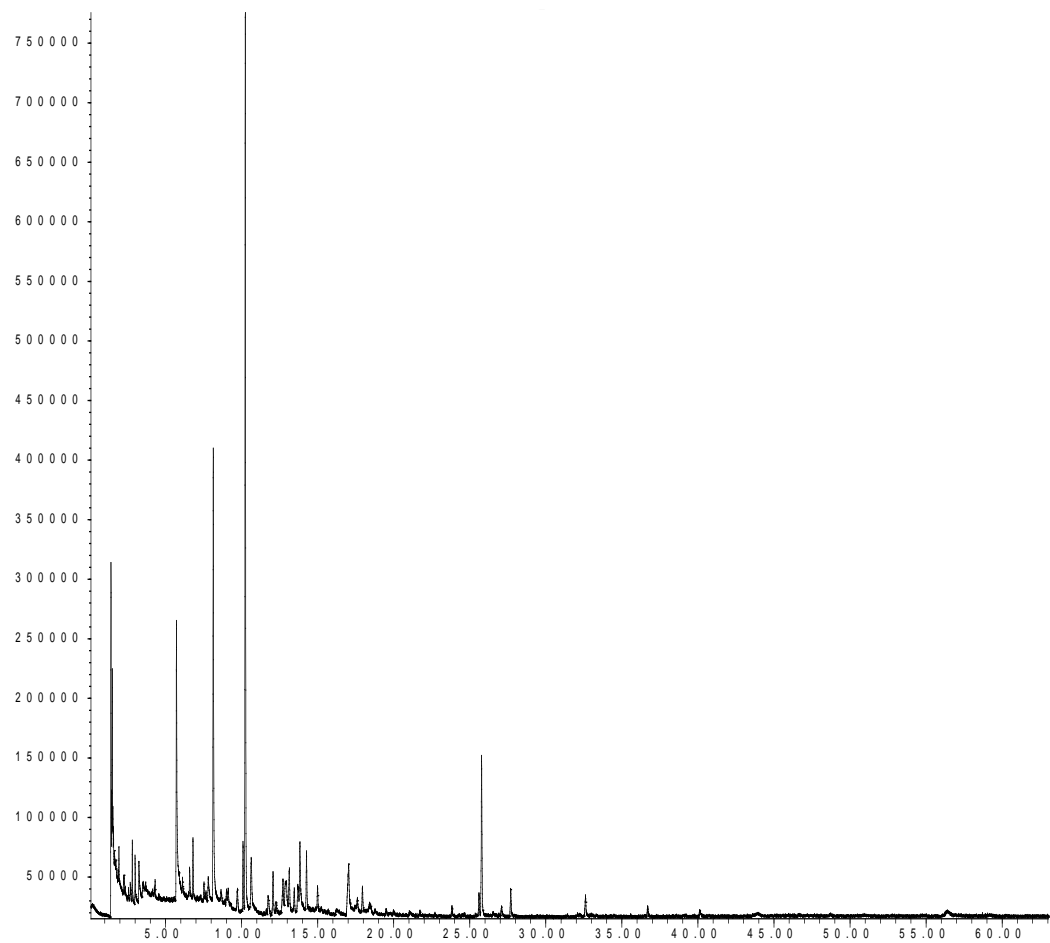
Pomoću FTIR analize određen je kemijski sastav meda i moguće patvorenje meda od komorača što je prikazano na spektrogramu (slika 16).

Tablica 2. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od komorača izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s DVB/CAR/PDMS ovojnicom)

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	oktan	<900	1,04
2.	heksanal	<900	0,78
3.	2-furankarboksialdehid	<900	0,96
4.	benzaldehyd ^a	965	9,39
5.	2,3,5-trimetilpirazin*	1005	2,22
6.	benzil-alkohol ^a	1038	1,42
7.	2-fenilacetaldehyd ^a	1048	13,04
8.	<i>cis</i> -linalool oksid	1091	1,94
9.	hotrienol	1106	1,96
10.	nonanal ^a	1109	24,77
11.	2-feniletanol ^a	1116	2,27
12.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1155	1,09
13.	aldehid jorgovana (izomer II**)	1169	1,70
14.	nonal-1-ol	1178	2,09
15.	oktanska kiselina	1180	0,38
16.	<i>p</i> -cimen-8-ol	1190	1,38
17.	α -terpineol	1192	1,77
18.	metil salicilat	1195	1,89
19.	decanal	1208	1,81
20.	5-hidroksimetilfurfural	1230	0,89
21.	nonanska kiselina	1273	2,94
22.	timol	1303	0,84

23.	5-metil-2-fenilheks-2-enal*	1490	0,91
24.	pentadekan	1500	5,24
25.	4-hidroksibenzojeva kiselina (<i>p</i> -salicilna kiselina)	1542	1,03
26.	4-hidroksi-3,5-dimetoksi- benzaldehyd (siringaldehyd)	1661	0,77

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni; ^a = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja; * = spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); ** = točan izomer nije identificiran

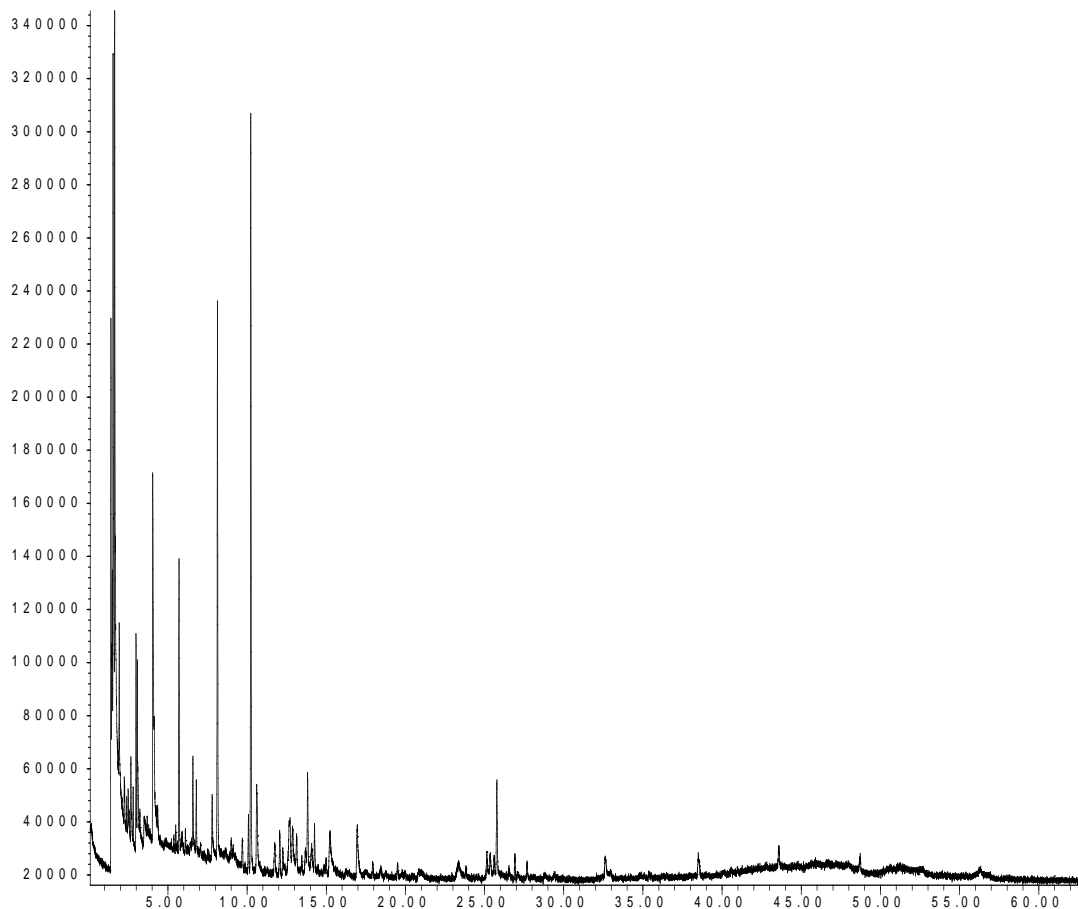


Slika 14. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od komorača izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) (sivo vlakno)

Tablica 3. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od komorača izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s PDMS/DVB ovojnicom)

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	2-furanmetanol	<900	9,35
2.	oktan	<900	1,80,
3.	heksanal	<900	2,42
4.	2-furankarboksialdehid	<900	3,05
5.	1,3-dimetilbenzen	<900	8,86
6.	benzaldehyd ^a	965	4,30
7.	2,3,5-trimetilpirazin*	1005	2,75
8.	benzil-alkohol ^a	1038	0,96
9.	2-fenilacetaldehyd ^a	1048	9,59
10.	cis-linalool oksid	1091	0,99
11.	nonanal ^a	1109	12,67
12.	2-feniletanol ^a	1116	2,48
13.	aldehid jorgovana (izomer II ^{**})	1169	0,92
14.	nonanal-1-ol	1178	2,09
15.	metil salicilat		
16.	5-hidroksimetilfurfural	1195	1,87
17.	nonanska kiselina	1230	0,96
18.	pentadekan	1273	1,04

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni; ^a = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja; * = spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); ** = točan izomer nije identificiran

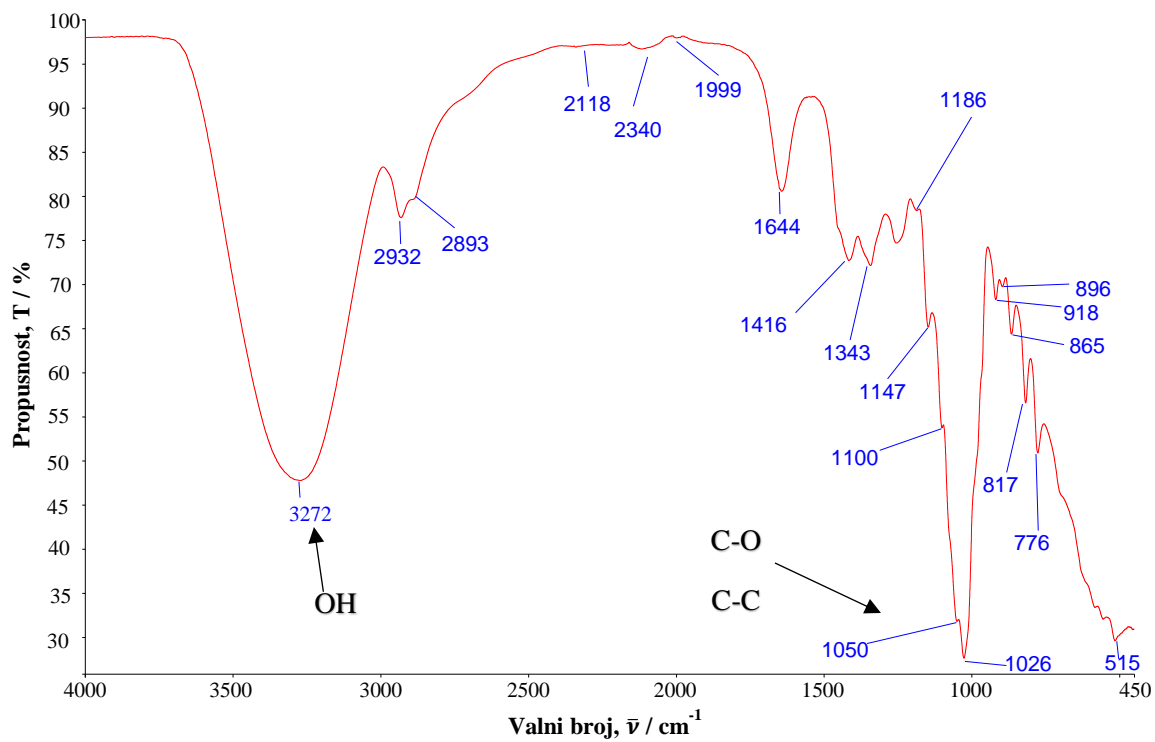


Slika 15. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od komorača izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) (plavo vlakno)

Tablica 4. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od komorača izoliranih USE
metodom (pentan : dietileter=1:2 (v/v))

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	3-metilbutanska kiselina (izovalerijanska kiselina)	<900	7,32
2.	2-furalmetanol	<900	0,56
3.	1,3-dimetilbenzen	<900	1,53
4.	nonan	900	17,87
5.	5-metil-2-furfural	965	0,40
6.	benzil-alkohol ^a	1038	0,44
7.	2-fenilacetaldehid ^a	1048	1,64
8.	aldehid jorgovana (izomer I ^{**})	1169	0,92
9.	5-hidroksimetilfurfural	1230	0,29
10.	anetol	1289	0,37
11.	4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid (siringil-aldehid)	1661	40,52
12.	metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoat (metil-siringat) ^a	1774	22,68
13.	trikosan ^a	2300	1,42

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni; ^a = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja; * = spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); ** = točan izomer nije identificiran

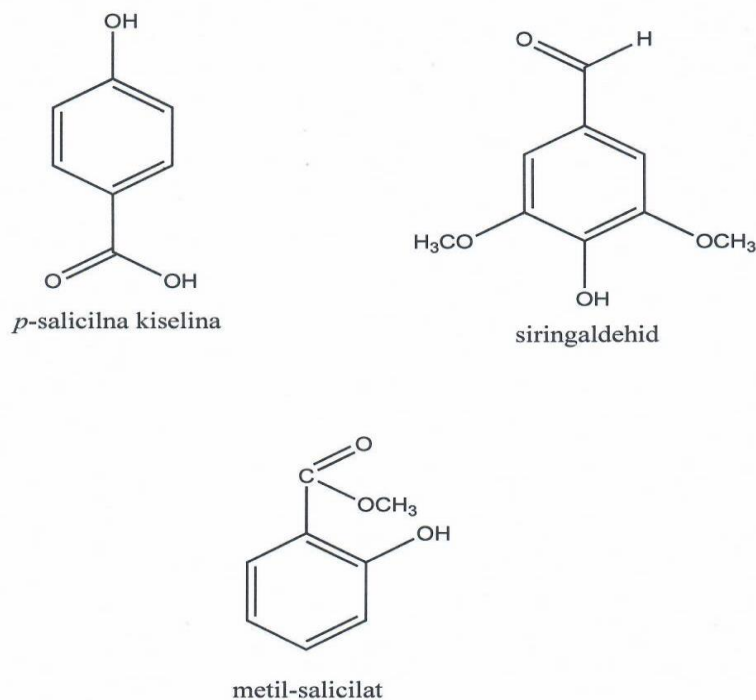


Slika 16. Spektrogram FTIR spektra za med od komorača

4. RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti hlapljive spojeve meda od komorača. Hlapljivi spojevi izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi s dva različita vlakna i ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom. Također, uz pomoć infracrvene spektroskopije s *Fourierovom* transformacijom dobiveni su podaci o kemijskom sastavu meda od komorača.

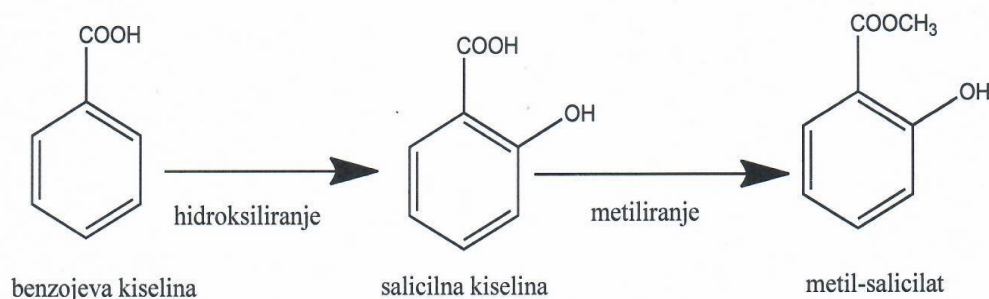
Profil hlapljivih spojeva meda od komorača, odnosno kemijski sastav i udio izoliranih spojeva pomoću sivog vlakna (DVB/CAR/PDMS) prikazan je tablici 2. U uzorku je pronađeno 26 spojeva od kojih dominira nonanal (24,77%), zatim slijedi 2-fenilacetaldehid (13,04%) i benzaldehid (9,39%). Osim tih spojeva, značajni su spojevi metil salicilat (1,89%), 4-hidroksibenzojeva kiselina ili *p*-salicilna kiselina (1,03%) i 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid ili siringaldehid (0,77%) čije su strukturne formule prikazane na slici 17. Salicilna kiselina je poznata kao spoj koji se koristi u lijekovima, a dokazana su i analgetska svojstva komorača u pokusima koji su se provodili na štakorima. (28)



Slika 17. Strukturne formule *p*-salicilne kiseline, siringaldehida i metil-salicilata

U tablici 3 prikazan je profil hlapljivih spojeva meda od komorača pomoću plavog vlakna (PDMS/DVB), pronađeno je 18 spojeva. Najzastupljeniji spoj je također nonanal (12,67%), zatim 2-fenilacetaldehid (9,59%), 2-furanmetanol (9,35%) i 1,3-dimetilbenzen (8,86%). U obje tablice je prisutan metil salicilat s neznatnom razlikom u udjelu. Metodom izolacije hlapljivih spojeva pomoću sivog vlakna izolirani su spojevi hotrienol, oktanska kiselina, *p*-cimen-8-ol, α -terpineol, decanal, timol, 5-metil-2-fenilheks-2-enal, 4-hidroksibenzojeva kiselina i 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid ili siringaldehid, koji nisu izolirani pomoću plavog vlakna.

Metil salicilat nastaje u reakciji hidroksiliranja benzoične kiseline pri čemu nastaje salicilna kiselina iz koje metiliranjem nastaje metil salicilat što je prikazano na slici 18. (29)



Slika 18. Reakcija nastajanja metil-salicilata

U tablici 4 izolirano je 13 spojeva USE metodom od kojih su najviše zastupljeni siringaldehid (40,52%), metil-siringat (22,68%) i nonan (17,8%). Spoj anetol (0,37%) je spoj komorača u eteričnom ulju komoračevog sjemena te ima antitumorsko djelovanje. Metil-siringat može se istaknuti kao hlapljivi marker botaničkog podrijetla uniflornog meda od drugih vrsta meda, poput meda od čeplice, što je vrlo važno za ograničenja korištenja melisopalinološke analize za određivanje botaničkog podrijetla meda. Ovom metodom je identificiran velik udio poluhlapljivog metil-siringata bez derivatizacije što je bitno za brzo određivanje botaničkog podrijetla meda.

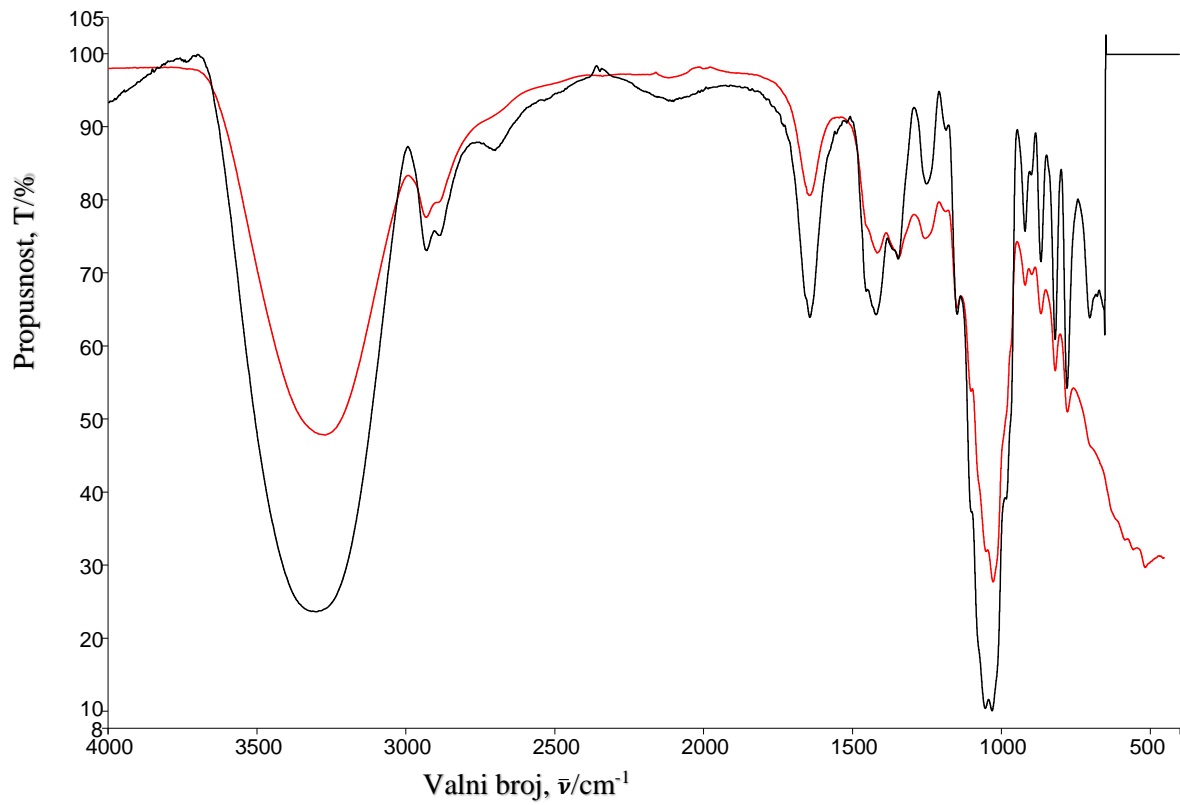
Metil-siringat je uočen u medu od amorfe kao drugi najzastupljeniji spoj. Također je prisutan u drugim medovima koji potječu od biljaka srodnog botaničkog podrijetla, ali jedino je u medu od čepjeza dosegao najvišu razinu. (30)

Zajedno s metil-siringatom, siringaldehid je prisutan u medu od javora i čini najvažniji spoj u medu.

Metil-siringat i siringaldehid nastaju reakcijom hidrolacije/metilacije benzil-alkohola pri čemu nastaju hidroksi/metoksi derivati (4-hidroksi-3-metoksibenzil-alkohol, 3,4-dimetoksibenzil-alkohol, 3,4,5-trimetoksibenzil-alkohol). Reakcije redukcije nemaju prednost nad oksidacijom, stoga se može pretpostaviti oksidacija do aldehida i karboksilne kiseline te daljnja esterifikacija do metil-siringata.

Na slici 16 prikazan je spektrogram FTIR spektra za med od komorača. FTIR prikazuje opću sliku meda, ali ne može se odrediti točno o kojem je medu riječ. Područje $3000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ i $1610 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ odgovara području O-H vibracija što se očituje širokim i velikim signalom. Upravo u tim područjima izražena su dva signala, 1644 cm^{-1} i 3272 cm^{-1} što ukazuje na hidroksilne skupine vezane vodikovim vezama. (31) Vibracije s maksimalnom propusnošću od 1416 cm^{-1} i 1343 cm^{-1} karakteristične su za vibracije savijanja O-CH i C-C-H u strukturi ugljikohidrata ili vibracije savijanja koje dolaze od OH u C-OH grupi. Signali na 2933 cm^{-1} i 2893 cm^{-1} ukazuju na C-H istezanje. Područje od 500 do 1500 cm^{-1} naziva se otisak prsta ili *fingerprint*. Područje *fingerprinta* odgovara najosjetljivijem području apsorpcije glavnih komponenti meda, najprikladnijem području za kvantificiranje šećera u medu i organskih kiselina. Područje signala $1050 - 970 \text{ cm}^{-1}$ može se pripisati skupini C-OH ili istezanju u strukturi ugljikohidrata. Upravo u tom području se nalazi izražen signal pri 1026 cm^{-1} koji se može povezati sa prisutnošću ugljikohidrata u medu od komorača, kao i prisutnost organskih kiselina. (32, 33)

Uspoređujući spektrogram glukoznog sirupa iz baze podataka i spektrograma meda od komorača (slika 19), korelacija je 85,2% što ukazuje da u med nije dodan glukozni sirup. Da bi se mogla potvrditi prisutnost glukoznog sirupa u medu od komorača, korelacija bi trebala biti minimalno 95%.



Slika 19. Spektrogram glukoznog sirupa i meda od komorača

5. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir dobivene rezultate, kao i raspravu ovog diplomskog rada može se zaključiti sljedeće:

- Pomoću sivog vlakna mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi izolirano je 26 spojeva, od kojih je najzastupljeniji nonanal.
- Pomoću plavog vlakna mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi izolirano je 18 spojeva od kojih je najzastupljeniji nonanal.
- USE metodom (pentan : dietileter=1:2 (v/v)) izolirano je 13 spojeva od kojih je najzastupljeniji 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid (siringaldehid).
- Spoj metil salicilat pronađen je pomoću sivog i plavog vlakna u neznatnoj kvantitativnoj razlici.
- Spojevi hotrienol, oktanska kiselina, *p*-cimen-8-ol, α -terpineol, decanal, timol, 5-metil-2-fenilheks-2-enal, 4-hidroksibenzojeva kiselina i 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid ili siringaldehid izolirani su samo pomoću sivog vlakna.
- Spoj anetol izoliran je samo pomoću USE metode.
- Usporedba spektrograma glukoznog sirupa i meda od komorača ukazuje da u med od komorača nije dodan glukoзни sirup.
- FTIR analizom utvrđena je prisutnost vode, organskih kiselina i ugljikohidrata u medu.

6. LITERATURA

1. [Mrežno] Narodne novine: Pravilnik o medu, Ministarstvo poljoprivrede, 53/2015
2. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z., Dražić M., Barišić D., Filipi J., Jakopović I., Krakar D., Palčić K., Ševar M., Tretinjak V., Konvencionalno i ekološko pčelarstvo, Zagreb, 26-185, 2011
3. Da Silva P.M., Gauche G., Gonzaga L.V., Oliveira Costa A.C., Fett R., Honey: Chemical composition, stability and authenticity, Food Chemistry (2015), 196, 309-323
4. [Mrežno] <https://vitamini.hr/hrana-i-zivot/hrana/med-je-najstarija-vrsta-zasladvaca-710/> (14.3.2022.)
5. Jerković I., nerecenzirani material, Interna skripta, 2021
6. Pita-Calvo C., Vazquez M., Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origins, Journal of Agricultural and food chemistry (2018), 66, 2523-2537
7. [Mrežno] <https://repositorij.ktf-split.hr/islandora/object/ktfst%3A9/datastream/PDF/view> (15.4.2022.)
8. [Mrežno] <https://repositorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A588/datastream/PDF/view> (15.4.2022.)
9. Wang J., Li Q.X., Honey: Chemical Composition, Characterisation and differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins, Advances in Food and Nutrition Research (2011), 62, 89-137
10. Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P. (1999) Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Commission. Mitt. Lebensm. Hyg.(1999), 90, 108-125
11. Mato I., Huidobro J.F., Simal Lozano J., Teresa Sancho M., Review, Significance of Nonaromatic Organic Acids in Honey, Journal of Food Protection (2003), 66, 12, 2371–2376
12. Hermosín I., Chicon R.M, Dolores Cabezudo M., Free amino acid composition and botanical origin of honey, Food Chemistry (2003), 83, 263-268

13. Mahfuza Shapla U., Solayman M., Alam N., Khalil I., Hua Gan S., Review, 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health, *Chemistry Central Journal* (2008), 12(1)
14. [Mrežno] Vahčić N., Matković D., *Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda*, 2009; <https://pdfslide.tips/reader/f/kemijske-fizikalne-i-senzorske-karakteristike-meda>
15. Marijanović Z., 2021, *Med prezentacija* (14.4.2022.)
16. [Mrežno] <https://gumdrop.ru/hr/ovoschnye/cvet-meda-v-zavisimosti-ego-proishozhdeniya-kakie-byvayut-sorta-meda-temnye/> (15.3.2022.)
17. Bruneau, E., Barbier, E., Gallez, L.M., Guyot-Declerck, C., *La roue des arômes des mieles. Abeille & Cie 77*, 16-23, 2000
18. Ioannis K. Karabagias, Anastasia Badeka, Michael G. Kontominas, A decisive strategy for monofloral honey authentication using analysis of volatile compounds and pattern recognition techniques, *Microchemical Journal* (2000), 152, 104-263
19. Kaškonienė V, Venskutonis PR. Floral markers in honey of various botanical and geographical origins: A review. *Comprehensive reviews in Food Sci Food Saf* (2010), 9(6), 620-634
20. Consuelo Pita-Calvo, Manuel Vázquez, Differences between honeydew and blossom honeys: A review, *Trends in Food Science & Technology* (2017), 59, 79-87
21. Jozić M., *Utvrđivanje patvorenja pčelinjih proizvoda*, Završni rad, Agronomski fakultet, Zagreb, 2021, 23
22. Marijanović Z., *Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda*, Doktorski rad, Osijek (2014), 13-19, 34-40
23. Sporkert F., Pragst F., Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds, *Forensic Science International* (2000), 107, 129–148
24. Gretić M., *Ultrazvučna, mikrovalna i tlačna ekstrakcija otapalom. s.l. : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije*, 2016
25. Svečnjak, L., Chesson, L.A., Gallina, A., Maia, M., Martinello, M., Mutinelli, F., Necati Muz, M., Nunes, F.M., Saucy, F., Tipple, B.J., Wallner, K., Waś, E., Waters, T.A., Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research, *Journal of Apicultural Research* (2019), 58(2), 1-108
26. [Mrežno] <https://healthywithhoney.com/how-is-fennel-honey>

27. [Mrežno]<https://academy.uz/uz/news/spectrum-two-ik-furje-spektrometri-u-qanday-imkoniyatlarga-ega> (21.10.2022.)
28. Fariba J., Evaluation of Prophylactic effect of the Fennel essential oil on Experimental osteoporosis models in Rats, *International Journal of Pharmacology*, 2(5), 588-592
29. Jerković I., Marijanović Z., Tuberoso C.I.G., Bubdalo D., Kezić N., Molecular diversity of volatile compounds in rare willow (*Salix* spp.) honeydew honey: identification of chemical biomarkers, *Molecular Diversity* (2010), 14, 237-248
30. Jerković I., Marijanović Z., Kezić J., Gugić M., Headspace, Volatile and Semi-Volatile Organic Compounds Diversity and Radical Scavenging Activity of Ultrasonic Solvent Extracts from *Amorpha fruticosa* Honey Samples, *Molecules* (2009), 14, 2717-2728
31. Bunaciu A.A., Sboul-Enein H., Honey Discrimination Using Fourier Transform – Infrared Spectroscopy, *Chemistry* (2022), 4, 848-854
32. Kedzierska-Matysek M., Marwiczuk A., Florek M., Barłowska J., Wolanciuk A., Matwiczuk A., Chusciel E., Walkowiak R., Karez D., Gładyszewska B., Application of FTIR spectroscopy for analysis of the quality of honey, *BIO Web of Conferences* (2018), 10, 02008
33. Škorić I., Molekulska spektroskopija, nastavni materijal, 6-9