

Hlapljivi spojevi meda od pajasena

Velić, Marina

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:752920>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD PAJASENA

DIPLOMSKI RAD

MARINA VELIĆ

Matični broj: 36

Split, listopad 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD PAJASENA

DIPLOMSKI RAD

MARINA VELIĆ

Matični broj: 36

Split, listopad 2022

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

VOLATILE COMPOUNDS OF AILANTHUS HONEY

MASTER'S THESIS

MARINA VELIĆ

Parent number: 36

Split, October 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na 25. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko – tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD PAJASENA

Marina Velić

Sažetak: U ovom su radu analizirani hlapljivi spojevi meda od pajasena. Hlapljivi spojevi meda izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći tri vlakna (ružičasto vlakno, sivo vlakno i bijelo vlakno). Uzorci hlapljivih spojeva su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Kao dominantni spojevi identificirani su: hotrienol, heksadekan-1-ol, trikosan, tetrakosan, dokosan i terpeni, pogotovo derivati linaloola: *trans*-linalool oksid, *cis*-linalool oksid i izomer adehida jorgovana.

Ključne riječi: hlapljivi spojevi, med od pajasena, hotrienol, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 46 stranica, 21 sliku, 6 tablica, 50 referenci

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 Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER'S THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology. Session no 25.

Mentor: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.

VOLATILE COMPOUNDS OF AILANTHUS HONEY

Marina Velić

Abstract: In this paper, the volatile compounds of ailanthus honey were analyzed. Volatile honey compounds were isolated by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) using three fibers (pink fiber, gray fiber and white fiber). Samples of volatile compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. The dominant compounds were identified as: hotrienol, hexadecan-1-ol, tricosane, tetracosane, docosane and terpenes, especially linalool derivatives: trans-linalool oxide, cis-linalool oxide and isomer of lilac aldehyde.

Keywords: volatile compounds, ailanthus honey, hotrienol, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 67 pages, 21 figures, 6 tables, 50 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 31st, 2022.

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

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

Iskreno se zahvaljujem svojem mentoru doc.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na stručnim savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama koji su studentske dane učinili puno ljepšima.

Posebno hvala mom Petru na pruženoj podršci, razumijevanju i pomoći tijekom ovih godina.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji koja mi je uvijek pružala najveću podršku tijekom cijelog školovanja, omogućila da ostvarim svoje snove i bez kojih sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće!

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je odrediti profil hlapljivih spojeva iz uzoraka meda od pajasena.

U tu svrhu potrebno je:

- Izolirati hlapljive spojeve uzoraka meda mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći ružičasto vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB)
- Izolirati hlapljive spojeve uzoraka meda mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS)
- Izolirati hlapljive spojeve uzoraka meda mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći bijelo vlakno s ovojnicom Polyacrylate
- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija spektrometrija masa (GC-MS) te usporediti rezultate analiza.

SAŽETAK

U ovom su radu analizirani hlapljivi spojevi meda od pajasena. Hlapljivi spojevi meda izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći tri vlakna (ružičasto vlakno, sivo vlakno i bijelo vlakno). Uzorci hlapljivih spojeva su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Kao dominantni spojevi identificirani su: hotrienol, heksadekan-1-ol, trikosan, tetrakosan, dokosan i terpeni, pogotovo derivati linaloola: *trans*-linalool oksid, *cis*-linalool oksid i izomer aldehida jorgovana.

Ključne riječi: hlapljivi spojevi, med od pajasena, hotrienol, HS-SPME, GC-MS

SUMMARY

In this paper, the volatile compounds of ailantus honey were analyzed. Volatile honey compounds were isolated by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) using three fibers (pink fiber, gray fiber and white fiber). Samples of volatile compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. The dominant compounds were identified as: hotrienol, hexadecan-1-ol, tricosane, tetracosane, docosane and terpenes, especially linalool derivatives: trans-linalool oxide, cis-linalool oxide and isomer of lilac aldehyde.

Keywords: volatile compounds, ailanthus honey, hotrienol, HS-SPME, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1 PČELARSTVO U POVIJESTI.....	2
1.2 PČELE.....	2
1.2.1 Sastav pčelinje zajednice.....	3
1.3 MED	4
1.4 KLASIFIKACIJA MEDA.....	5
1.5 KEMIJSKI SASTAV MEDA	7
1.5.1 Ugljikohidrati	7
1.5.2 Voda.....	8
1.5.3 Bjelančevine i aminokiseline	8
1.5.4 Enzimi	9
1.5.5 Organske kiseline	9
1.5.6 Vitamini	10
1.5.7 Minerali.....	10
1.5.8 5-Hidroksimetilfurfural.....	10
1.5.9 Fitokemikalije.....	11
1.6 FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA.....	11
1.6.1 Kristalizacija meda	12
1.6.2 Viskoznost.....	12
1.6.3 Higroskopnost.....	13
1.6.4 Električna vodljivost.....	13
1.6.5 Optička aktivnost meda.....	13
1.6.6 Specifična masa meda.....	13
1.6.7 Indeks refrakcije.....	14
1.7 SENZORSKA SVOJSTVA MEDA	14
1.7.1 Boja meda.....	14
1.7.2 Miris/aroma meda.....	15
1.7.3 Okus meda.....	15

1.8	HLAPLJIVI SPOJEVI U MEDU	15
1.8.1	Metode izolacije hlapljivih spojeva u medu	16
1.8.1.1	Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (SPME).....	17
1.8.2	Analiza hlapljivih spojeva	18
1.8.2.1	Plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i> , GC)	18
1.8.2.2	Spektrometrija masa (engl. <i>Mass Spectrometry</i> , MS)	20
1.8.2.3	Vežani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa.....	21
2.	EKSPERIMENTALNI DIO	23
2.1	OPĆE KARAKTERISTIKE VRSTE <i>AILANTHUS ALTISSIMA</i>	23
2.2	IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA MIKROEKSTRAKCIJOM VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI	23
2.3	ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEŽANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS).....	26
3.	REZULTATI.....	29
3.1	PRIKAZ REZULTATA.....	29
4.	RASPRAVA	38
5.	ZAKLJUČAK	42
6.	LITERATURA.....	43

UVOD

Medonosna pčela smatra se gospodarski najvažnijim kukcem. Osim što proizvodi med, propolis, vosak, matičnu mliječ i druge proizvode, medonosna pčela predstavlja nezamjenjivog oprašivača bez kojeg bi opstanak tisuća biljnih vrsta bio upitan.

Med predstavlja proizvod suradnje pčela i biljaka. Prirodna je slatka tvar koju pčele proizvode od nektara medonosnih biljaka, biljnih izlučevina ili izlučevina kukaca, koje zatim sakupljaju, izdvajaju suvišnu vodu, dodaju vlastite izlučevine i odlažu u stanice saća na sazrijevanje.

U prošlosti je med predstavljao jedino sladilo koje su ljudi poznavali. Razvojem poljoprivrede i uzgojem šećerne trske i šećerne repe, konzumni šećer dobiva na sve većoj važnosti. Međutim, otkriveno je kako šećer ne može zamijeniti med zbog njegovih pozitivnih svojstava. Med se ne koristi samo kao namirnica, nego i kao ljekovito, kozmetičko i konzervirajuće sredstvo.

Svaki med ima specifičnu aromu koja dolazi od kombinacije hlapljivih spojeva koji su prisutni u malim količinama. Upravo hlapljive tvari predstavljaju 'otisak prsta' svakog meda i koriste se za autentičnost meda, dajući podatke o njegovom botaničkom i zemljopisnom podrijetlu.

Kemijski sastav meda ni danas nije do kraja objašnjen, što je jedan od razloga onemogućavanja industrijske proizvodnje i patvorenja meda. Ispitivanje izvornosti meda važna je s jedne strane za industriju, a s druge strane i za potrošače kako bi se spriječilo pogrešno označavanje podrijetla meda i njegovo sve češće patvorenje.

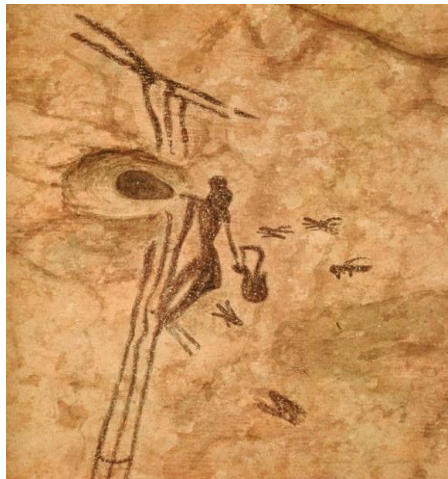
Cilj ovog rada bio je odrediti kemijski profil hlapljivih spojeva meda od pajasena koristeći metodu ultrazvučne ekstrakcije i metodu mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi. Izolirani spojevi dalje su analizirani koristeći vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa.

1. OPĆI DIO

1.1 PČELARSTVO U POVIJESTI

Još od najstarijih vremena čovjek poznaje pčele. Loveći životinje i sakupljajući hranu, čovjek je u šupljem drveću i pećinama opažao pčele i ukusnu hranu - med. U početku je čovjek pratio pčele u njihovom povratku s ispaše u gnijezda, a zatim je proučavao kako se roje i privlačio ih u šuplja stabla ili udubine zemlje. Upravo se ovakvim načinom ostvario prvi bliži kontakt između čovjeka i pčela. (1)

Još iz mlađeg kamenog doba (5 000 do 7 000 godina pr. Kr) iz pećine *Cuevas de la Araña* (Valencija, Španjolska) datira najstariji dokaz interakcije čovjeka i pčela, slika 1 u pećini prikazuje čovjeka s posudom koji iz udubina stijena uzima saće. (2)



Slika 1. Prikaz crteža iz pećine Cuevas de la Araña (3)

1.2 PČELE

Medonosna pčela (lat. *Apis mellifera*) svoje korijene dijeli s osama. Obje vrste su u početku bile mesožderi, ali manjom raspoloživosti ovakve hrane, pčele prelaze na dostupniju biljnu prehranu. Tijekom ovog razdoblja, pčele su razvile usne organe za prikupljanje i transport peluda i nektara. (4)

1.2.1 Sastav pčelinje zajednice

Medonosna pčela živi u zajednicama od nekoliko desetaka tisuća pčela. Ona ne može živjeti izvan zajednice, jer inače ugiba. Pčele predstavljaju nezamjenjive prirodne oprašivače bez čijeg bi rada bio upitan opstanak na tisuće biljnih vrsta. (5)

➤ Matica

Matica predstavlja spolno potpuno razvijenu ženku. Njena zadaća je da nese jaja i ona ne obavlja druge poslove. U svakoj pčelinjoj zajednici u pravilu postoji samo jedna matica. Prosječni životni vijek matica je 3-4 godine. (4)

Normalno razvijenu maticu je lako uočiti i razlikovati od pčela radilica i trutova. Ona je 2 puta veća i teža od pčela radilica i ima duži trbuh, a krila joj dosežu polovinu trbuha. Kod truta su krila duža od trbuha, a kod pčela radilica dužina krila jednaka je dužini trbuha. (6) Za razliku od pčela radilica, matice više ne posjeduju košnice za pelud na nogama i voskovne žlijezde. (4)

➤ Pčele radilice

Pčele radilice su najbrojniji članovi pčelinje zajednice i njihov broj doseže nekoliko desetaka tisuća. Radilice nemaju spolno razvijene organe i reproduktivnu funkciju. Život pčela radilica je vrlo kratak. U punoj sezoni one žive samo 30-45 dana, dok tijekom zimskog mirovanja one žive po nekoliko mjeseci. (6)

U pčelinjoj zajednici, pčele radilice obavljaju poslove: uzgajanja legla, čišćenje košnice, izgradnja saća i sakupljanje hrane.

S obzirom na svoje zadaće one imaju dobro razvijene organe za izgradnju saća, prikupljanje hrane i hranjenje legla. Također je kod njih žalčani aparat, koji im služi za obranu, u punoj funkciji. (4,6)

➤ Trutovi

Trutovi su muški članovi zajednice čija je jedina uloga reproduksijska. Njihov se broj u zajednici kreće od nekoliko stotina do koju tisuću.

Budući da trutovi imaju samo reproduktivnu ulogu, oni nemaju razvijen žučni aparat, kao ni organe za skupljanje hrane. (4) Životni vijek trutova iznosi 3-6 mjeseci, odnosno od početka proljeća pa do prestanka paše.

Tijekom priprema za preživljavanje zime, pčele radilice izbacuju trutove iz košnice nakon čega oni ugibaju. (6)

1.3 MED

Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva u Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda („Narodne novine“, broj 20/2000) daje definiciju meda: „Med jest prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (lat. *Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.“ (7)



Slika 2. Med (8)

Pčele pomoću svog usnog aparata sišu nektar koji se nalazi na cvjetovima biljaka i prenose ga do košnice u svom mednom mjehuru. U tom trenutku pčele radilice nektaru dodaju specifične tvari i pomoću enzima iz svog tijela invertiraju većinu saharoze u glukozu i fruktozu (tzv. invertni šećer) koji je glavni sastojak meda.

Pri povratku u košnicu, pčele radilice predaju med (slika 2) kućnim pčelama koje ga pakiraju u ćelije oblika šesterokuta. Višekratnim prenošenjem iz stanice saća, uklanja se suvišak vode i med se suši. (9)

Ljudska upotreba meda kao hrane i kao lijeka seže do 8 000 godina, a Stari Egipćani, Kinezi, Grci i Rimljani koristili su ga za rane i bolesti crijeva.

Osim meda, u košnici se nalazi još nekoliko ljekovitih tvari koje su proizvod pčela, a to su: matična mliječ, propolis, vosak i pčelinji otrov. (10)

1.4 KLASIFIKACIJA MEDA

Med se može podijeliti na 2 načina: prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje, odnosno prezentiranja.

A) Podjela meda prema podrijetlu mednih biljaka ili medne rose:

- Cvjetni ili nektarni med
- Medljikovac ili medun

Nektarni med je proizvod dobiven od nektara biljaka različitih vrsta (lipa, kadulja, bagrem i dr).

Nektar je slatka, šećerom bogata tekućina koja se proizvodi u biljnim žlijezdama (nektarijama), a služi za privlačenje kukaca za vrijeme oprašivanja.

Nektar po kemijskom sastavu predstavlja vodenu otopinu različitih šećera u kojoj dominiraju saharoza, glukoza i fruktoza. (4)

Nektarni med je karakterističan po slabije izraženoj boji, osim pojedinih sorti kao što su kestenov i heljdin med. Miris meda podsjeća na medonosnu biljku s koje nektar potječe, a za razliku od meljikovca, nektarni med ima izrazito slađi okus. (4)

Boja meda povezana je s njegovim botaničkim podrijetlom. Boja ovisi o sadržaju pepela, temperaturi i vremenu skladištenja meda. (11)

Nektarni med možemo podijeliti na uniflorni (sortni) i multiflorni (cvjetni) med.

Da bi se med klasificirao kao uniflorni, u njemu treba dominirati pelud samo jedne biljke (45% ili više uzorka peludi), od ukupno 300 zrnaca. Sortni med spada u vrjedniju kategoriju i stoga na tržištu postiže višu cijenu.

Multiflorni med je nastao od nektara različitih biljnih vrsta i u njemu ne dominira nijedna vrsta peludi. (12)

Medljikovac (medun) je proizvod koji se dobiva od izlučevina kukaca (lat. *Hemiptera*) koje nalazimo na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka.

Medljika (medna rosa) predstavlja slatku tvar koja se pojavljuje s obje strane listova i iglica crnogoričnog i bjelogoričnog drveća u vidu rose. Medljika se tako može pronaći na hrastu, jeli, boru, vrbi, breskvi, lipi, i drugom drveću. (13)

U usporedbi s nektarnim medom, medljikovac ima veći sadržaj minerala, veću obojenost, ali manji sadržaj kiselina, veću pH vrijednost i manju slatkoću. (4)

Med od medljike ima osjetno više oligosaharida od cvjetnog meda, a obiluje i antioksidativnim i antibakterijskim svojstvima više od nektarnog meda. (11)

B) Podjela meda prema načinu proizvodnje/prezentiranja

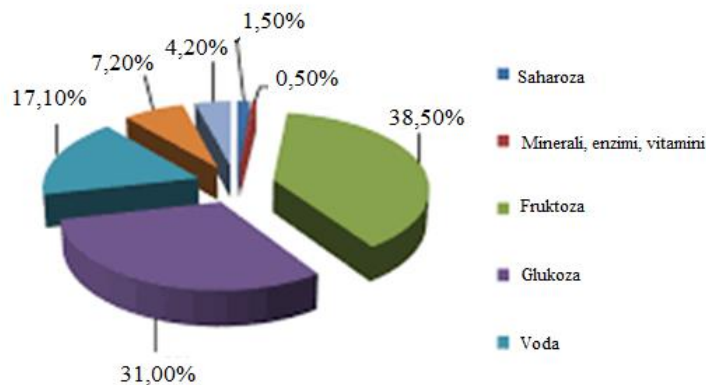
- med u saću: med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća
- med sa saćem ili med s dijelovima saća
- cijedeni med: med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla
- vrcani med: med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla
- prešani med: med dobiven prešanjem saća bez legla, s ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45 °C
- filtrirani med: med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi. (14)

1.5 KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med predstavlja proizvod vrlo složenog kemijskog sastava koji sadrži preko 70 različitih komponenata. Pojedine sastojke u med dodaju pčele, neki sastojci potječu od medonosne biljke, a neki nastaju tijekom zrenja meda u saću. (13)

Glavni sastojci meda su ugljikohidrati (većinom glukoza i fruktoza) i voda koji zajedno čine preko 99% meda. Ostale sastojke u medu čine proteini (enzimi), minerali, vitamini, fenolne tvari, organske kiseline i tvari arome. Udio ovih tvari u medu je jako mali (<1%), ali upravo su ove tvari odgovorne i za senzorska i za nutritivna svojstva meda. (5)

Bez obzira na razvoj analitičkih metoda, sastav meda ni danas nije do kraja razjašnjen. Upravo je to jedan od razloga zašto je onemogućena industrijska proizvodnja i otežano patvorenje meda i zato on zadržava karakteristike prirodne namirnice, dobivene isključivo od pčela. (5)



Slika 3. Udio pojedinih komponenti u medu (15)

1.5.1 Ugljikohidrati

Glavni sastojak meda čine ugljikohidrati s udjelom 73-83 %, što med čini prezasićenom otopinom šećera.

Monosaharidi čine 88-95% ukupnih ugljikohidrata, od čega su najzastupljeniji fruktoza (s udjelom 33,3-40,0%) i glukoza (s udjelom 25,2-35,3%). Ova dva monosaharida odgovorna

su za slatkoću meda, njegovu energetska vrijednost i fizikalna svojstva kao što su viskoznost, gustoća, kristalizacija, higroskopnost i mikrobiološka aktivnost.

Pored monosaharida, u medu se nalaze još i disaharidi (saharoza, maltoza, izomaltoza) te trisaharidi i oligosaharidi. (5)

Koncentracija i omjer fruktoze i glukoze su korisni pokazatelji za klasifikaciju sortnog meda. Omjer fruktoze i glukoze (F/G) svojstven je pojedinim vrstama meda i uglavnom je veći od 1,0. Fruktoza je, u skoro svim vrstama meda, ugljikohidrat u najvećem udjelu, osim u medu od uljane repice (lat. *Brassica napus*) i maslačka (lat. *Taraxacum officinale*), gdje udio glukoze može biti veći od udjela fruktoze. (16)

Za razliku od meda od uljane repice i maslačka, med od bagrema i kestena bogati su fruktozom i odnos F/G kod ovih vrsta meda iznosi 1,5-1,7.

S obzirom na to da je najzastupljeniji šećer u medu fruktoza, med je čak 1,5 puta slađi od konzumnog šećera. (5)

1.5.2 Voda

Nakon ugljikohidrata, voda predstavlja drugi najzastupljeniji sastojak meda. Udio vode je promjenjiva komponenta u medu, a kreće se od 14 do 20% s izuzetkom za med od vrijeska (lat. *Calluna vulgaris*) gdje je moguć udio vode do 23%.

Udio vode je važan parametar kakvoće meda jer o njemu ovisi stabilnost meda i otpornost na mikrobiološko kvarenje tijekom čuvanja. (4)

Ako su vrijednosti udjela vode niže mogu biti otežani vrcanje i daljnja dorada meda, dok s druge strane previsok udio vode može potaknuti fermentaciju meda pri čemu kvasci fermentiraju med i uzrokuju gubitak okusa (nastaje alkohol koji se u prisutnosti kisika može razgraditi na octenu kiselinu i vodu). (5)

1.5.3 Bjelančevine i aminokiseline

Med sadrži svega 0 - 1,7% dušičnih tvari koje se nalaze u obliku slobodnih aminokiselina i bjelančevina različitog podrijetla. (4, 13)

Proteini i aminokiseline u medu potječu uglavnom od pčela, a dio potječe i iz biljnog podrijetla, odnosno iz nektara i peludi. (5)

Najzastupljenija slobodna aminokiselina u medu je prolin koji čini 80-90% udjela svih aminokiselina. Prolin potječe od pčela, a u med dopijeva pri preradi nektara u med. Budući da je on najzastupljeniji, njegov je udjel predložen kao jedan od indikatora zrelosti meda te indikator patvorenja meda ako je udjel prolina u medu niži od 180 mg/kg. (5)

U neprikladnim uvjetima skladištenja i obrade meda može doći do stvaranja nepoželjnih produkata nastalih reakcijom karboksilne skupine (na redukcijskom kraju šećera) sa slobodnim amino skupinama (iz aminokiselina i proteina) što se očituje tamnjenjem meda (Maillardova reakcija). (17)

1.5.4 Enzimi

Prisutnost enzima u medu jedna je od glavnih karakteristika po kojima se med razlikuje od ostalih zaslađivača. Zajedno s proteinima, enzimi medu daju posebna svojstva koja se umjetnim putem ne mogu proizvesti niti nadomjestiti. (5)

Enzimi u med uglavnom dolaze od pčela prilikom prerade nektara, a ostatak potječe od peludi i nektara. (4)

Enzimi koji se nalaze u medu su: invertaza, dijastaza, glukoza oksidaza, peroksidaza, katalaza, kisela fosfataza, esteraza, polifenoloksidaza i proteolitički enzimi. (13)

1.5.5 Organske kiseline

Svaki med, iako zamaskiran slatkoćom, ima blagu kiselost koja nastaje kao rezultat prisutnosti 0,57% organskih kiselina. Organske kiseline nastaju iz šećera uz pomoć enzima koje pčele izlučuju tijekom pretvaranja nektara u med. (4, 16)

Organske kiseline upotpunjuju okus meda, doprinose mikrobiološkoj stabilnosti, djeluju antibakterijski i antioksidativno. Niska pH vrijednost meda inhibira razvoj mnogih mikroorganizama.

Najzastupljenija kiselina u medu je glukonska kiselina koja nastaje djelovanjem enzima glukoza-oksidaze na glukozu i ona daje glavni doprinos kiselosti. (18)

U medu su prisutne i druge kiseline poput limunske, mravlje, octene, jabučne, maslačne i druge. (4)

1.5.6 Vitamini

Budući da med sadrži vrlo male količine vitamina, on se ne smatra značajnim izvorom vitamina za ljudski organizam. Med sadrži nešto veću količinu vitamina skupine B (tiamin, riboflavin, nikotinsku kiselinu, pantotensku kiselinu, piridoksin, biotin i folnu kiselinu) te vitamin C. (4,16)

Budući da su nektar i pelud glavni izvori vitamina u medu, onda zastupljenost određenih vitamina u najvećoj mjeri ovisi o biljci s koje su pčele prikupljale nektar. (4)

1.5.7 Minerali

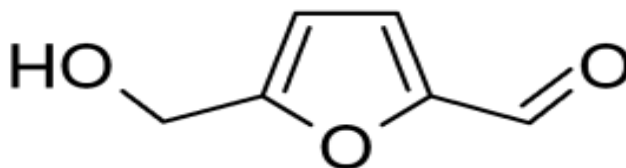
Udio minerala u medu kreće se u rasponu od 0,04% kod svijetlih medova do 0,2% kod tamnih medova. Bez obzira na to što su minerali u medu količinski malo prisutni, med sadrži cijeli spektar mineralnih tvari koji su bitni za niz metaboličkih reakcija u ljudskom organizmu i imaju važnu ulogu u tjelesnim funkcijama. (5, 16)

Od minerala koji su sadržani u medu prevladavaju kalij, natrij, kalcij, magnezij, željezo, cink, fosfor, selen, bakar i mangan. (4)

Najzastupljeniji je kalij koji čini $\frac{1}{4}$ do $\frac{1}{2}$ udjela minerala, a s natrijem, kalcijem i fosforom čini 50% udjela. (16)

1.5.8 5-Hidroksimetilfurfural

5-hidroksimetilfurfural (HMF) je heterociklički organski spoj koji nastaje dehidratacijom fruktoze i glukoze u kiselom mediju, a također je i vrlo čest međuprodukt u Maillardovim reakcijama kada se med zagrijava ili čuva dulje vrijeme. HMF se dalje razgrađuje na levulinsku i mravlju kiselinu. (5)



Slika 4. Struktura hidroksimetilfurfurala (19)

Visok sadržaj HMF-a u medu se u početku koristio kao indikator patvorenja meda dodavanjem sirupa od invertnog šećera. Međutim, uočeno je kako i prirodno zagrijan med ima više koncentracije HMF-a, stoga njegov sadržaj samo ukazuje na pregrijavanje ili neadekvatne uvjete čuvanja. (5, 16)

Koncentracija HMF-a uzima se kao parametar svježine meda, jer ga svježi med uglavnom nema (ili je prisutan u zanemarivim količinama), dok s druge strane njegova koncentracija raste tijekom obrade ili starenjem meda.

Kako bi se osiguralo da med nije podvrgnut intenzivnom zagrijavanju i da je siguran za konzumaciju, komisija *Codex Alimentarius* postavila je maksimalnu vrijednost HMF-a od 40 mg/kg, dok za med iz tropskih krajeva ta vrijednost doseže 80 mg/kg. (20)

1.5.9 Fitokemikalije

U kemijski sastav meda spadaju i fitokemikalije koje imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. One potječu od biljaka s kojih su pčele sakupljale nektar ili mednu rosu. U skupinu fitokemikalija ubrajaju se antioksidansi i flavonoidi. (5)

- Antioksidansi u medu mogu imati enzimsko (katalaza, glukoza-oksida) i neenzimsko podrijetlo (fenoli, vitamin E, vitamin C, karotenoidi i drugi). (5)
Ovi spojevi štite ljudski organizam od bolesti zbog svoje sposobnosti hvatanja oksidansa i slobodnih radikala. Apsorbiraju oštećenja koja mogu imati štetno djelovanje na funkciju proteina, nukleinskih kiselina i esencijalnih lipida. (21)
- Flavonoidi su spojevi koji također imaju antioksidativni učinak, a prirodno su prisutni u biljkama i vezani su uz proces fotosinteze. U skupinu flavonoida spadaju spojevi kao što su katehini, flavoni, flavanoli, antocijanidi i proantocijanidi.
Najčešće prisutni flavonoidi u medu su apigenin, kempferol, kvercetin, luteonin, galatin i drugi. (5)

1.6 FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA

Fizikalna svojstva meda, u koja spadaju kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, specifična masa, električna vodljivost, optička svojstva i indeks refrakcije, usko su povezana s

kemijskim sastavom meda. Zbog različitog sastava svakog meda, vrijednosti ovih parametara mogu biti specifične i različite. (13)

1.6.1 Kristalizacija meda

Kristalizacija meda je prirodan proces koji se spontano odvija u medu tijekom skladištenja. Med koji predstavlja prezasićenu otopinu glukoze spontano prelazi u ravnotežno stanje kristalizacijom suvišne količine glukoze. Glukoza otpušta vodu i prelazi u kristalni oblik. Fruktosa, koja ostaje u tekućem stanju, čini tanak sloj oko kristala glukoze. (13)

Kristalizacijom glukoze povećava se sadržaj slobodne vode u nekristaliziranim dijelovima meda, a time se povećava aktivnost vode i nestabilnost meda što za posljedicu ima pojavu fermentacije i promjene svojstava meda. (22)

Brzina kristalizacije meda ovisi o odnosu glukoze i fruktoze (G/F). Ako je u medu sadržano više glukoze nego fruktoze, tada je kristalizacija brža i nastaju sitniji, fini kristali. Ako je odnos G/F na strani fruktoze, kristalizacijom nastaju krupniji i nepravilni kristali i proces je sporiji. (13)

Nakon kristalizacije nastaju dvije faze: kristalna faza koja ima veći sadržaj glukoze i tekuća faza u kojoj dominira fruktoza. Budući da med mijenja svoju boju nakon kristalizacije i postaje neproziran, vrlo je čest slučaj neprihvatanja takvog meda kod potrošača. Iz tog razloga med se može podvrgnuti metodama sprječavanja kristalizacije od kojih su najčešće: toplinska obrada na visokim ili vrlo niskim temperaturama, ultrazvuk, filtracija i ultrafiltracija. (22)

1.6.2 Viskoznost

Viskoznost predstavlja otpor tekućine prema tečenju i jedno je od temeljnih svojstava meda. Viskoznost meda ovisi o: sadržaju vode, količini i odnosu monosaharida i oligosaharida, sadržaju proteina, temperaturi, veličini kristala u medu i medonosnom bilju od kojeg potječe nektar. (13)

1.6.3 Higroskopnost

Svojstvo meda da u ovisnosti o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode privlači ili otpušta vodu naziva se higroskopnost.

Ovo fizikalno svojstvo meda ovisi o udjelu šećera i sadržaju vode. Proces traje sve dok se ne uspostavi ravnoteža (58% vlažnosti zraka i 17,4% vode u medu). Za higroskopnost meda odgovoran je visok udio fruktoze, koja je higroskopnija od glukoze i drugih šećera.

Zbog velike viskoznosti meda voda s površine sporo prodire u unutrašnjost meda, pa su promjene uzrokovane higroskopnošću vidljive uglavnom na površini. (13)

1.6.4 Električna vodljivost

Električna vodljivost je svojstvo tvari da može provoditi električnu struju. Za provođenje električne struje u medu su zaslužne disocirane kiseline i mineralne tvari. Što je udio ovih tvari u medu veći, to je veća i električna vodljivost meda. (5, 13)

1.6.5 Optička aktivnost meda

Ugljikohidrati u medu imaju sposobnost skretanja ravnine polarizirane svjetlosti. Smjer i stupanj rotacije karakteristični su za pojedini ugljikohidrat, dok ukupna optička rotacija meda ovisi o sadržaju ugljikohidrata prisutnih u medu. (23)

Fruktoza, glavni šećer u nektarnom medu, skreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo i ima visoku negativnu optičku rotaciju. S druge strane glukoza, di-, tri- i oligosaharidi, koji su u većim količinama prisutni u medljikovcu, ravninu polarizirane svjetlosti skreću udesno i imaju pozitivne rotacije. Ova metoda koristi se za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca. (13, 23)

1.6.6 Specifična masa meda

Specifična masa meda je omjer mase meda prema masi iste količine vode, a ovisi o udjelu vode u medu. Što med ima više vode to mu je niža specifična masa, odnosno litra tog meda je lakša. Osim udjela vode, na specifičnu masu u manjoj mjeri utječe i medonosno bilje od kojeg nektar potječe. (13)

1.6.7 Indeks refrakcije

Indeks refrakcije služi za određivanje udjela vode, odnosno udjela topljive suhe tvari u medu. Mjerenje se vrši refraktometrom koji se zasniva na principu loma svjetlosti kad ona prolazi kroz otopinu. Mjerenje se provodi uglavnom pri 20°C. (5)

1.7 SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

Senzorska analiza predstavlja ispitivanje proizvoda procjenom svojstava koja se uočavaju pomoću pet osjetilnih organa: boja, miris, okus, dodir, tekstura i zvuk. Okus, miris i boja su glavna senzorska svojstva meda koja ovise o biljnom podrijetlu i o uvjetima čuvanja i prerade meda. (24, 25)

Senzorska analiza koristi se kao dopuna fizikalno-kemijskim i peludnim analizama. Upotrebljava se za utvrđivanje botaničkog podrijetla meda, potvrdu kvalitete, identificiranje određenih nedostataka (fermentacija, nečistoće, neugodni okusi i mirisi) i za razumijevanje preferencije potrošača.

Rezultati ovih ispitivanja mogu ukazati i na patvorenje meda kao što su dodavanje šećera u med, dobivanje meda hranjenjem pčela šećerom ili lažno deklariranje meda s obzirom na njegovo botaničko podrijetlo (25, 26)

1.7.1 Boja meda

Boja meda najviše ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu, a varira od svjetložute, žute, smeđe do tamnosmeđe. Boja meda je također uvjetovana i udjelom pigmenata karotenoida, flavonoida, klorofila, tanina, antocijana te količinom prisutnog šećera.

Med nakon kristalizacije postaje svjetliji, jer su kristali glukoze bijeli, a potamni tijekom čuvanja.

Med potamni prilikom kondenzacije proteina, odnosno aminokiselina, s reducirajućim šećerima (Maillardova reakcija), pri čemu nastaju melanoide. (25)

1.7.2 Miris/aroma meda

Med sačinjava preko 50 spojeva koji mu daju miris. Monoflorni med uglavnom nosi okus i miris koji su svojstveni određenoj biljnoj vrsti, dok je za poliflorni med karakterističan neodređen okus i miris. (13)

Mirisne tvari meda su lako hlapljive pa čuvanjem ili zagrijavanjem meda, miris slabi ili čak nestaje.

Mirisne tvari možemo svrstati u tri skupine:

- Karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni kao što su: formaldehid, acetaldehid, aceton, metiletilketon i drugi)
- Alkoholi (propanol, izopropanol, etanol, fenol, butanol, izobutanol i drugi)
- Esteri (metilni i etilni spojevi mravlje, octene, propionske i benzojeve kiseline) (25)

Aroma meda potječe od esencijalnih ulja, aromatičnih aldehida, terpena, diacetila te hlapljivih i nehlapljivih kiselina.

Aroma meda slabi prilikom kristalizacije meda jer se eterična ulja uklapaju u kristale; dok se aroma pojačava tijekom Maillardovih reakcija jer kao produkti nastaju aromatski karbonili (vanilin, benzaldehid, fenilacetilaldehid i drugi). (25)

1.7.3 Okus meda

Prepoznatljivost i punoću okusa čini slatkoća meda koja ovisi o omjeru i udjelu glukoze, fruktoze, eteričnih ulja, organskih kiselina i aminokiselina.

Sam okus meda, koji je povezan s mirisom, kreće se od slatkog do gorkog. Okus meda također se može mijenjati tijekom zagrijavanja ili fermentacije. Zbog toga, ako se s medom ne postupa pravilno može doći do njegovog tamnjenja, promjene mirisa, slabljenja arome i pojave nepoželjnih okusa. (13)

1.8 HLAPLJIVI SPOJEVI U MEDU

Svaki med ima karakterističnu aromu koja je rezultat kombinacije hlapljivih spojeva prisutnih u niskim koncentracijama. (27) Njih čine velike skupine organskih molekula kao

što su aldehidi, ketoni, alkoholi, kiseline, ugljikovodici, fenoli, esteri, terpeni i benzenski spojevi i njihovi derivati, derivati furana i pirana.

Hlapljive tvari predstavljaju ‘otisak prsta’ određenog meda i upotrebljavaju se za autentičnost meda, pružajući važne informacije o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu meda. (28)

Već je u 1960-im godinama započelo istraživanje hlapljivih tvari u medu i utvrđeno je da one mogu dospijevati u med:

- iz biljaka ili nektara,
- transformacijom biljnih spojeva putem metabolizma pčela,
- proizvodnjom od strane pčela,
- termičkom obradom ili tijekom dužeg skladištenja
- mikrobnom ili ekološkom kontaminacijom (27,28)

Danas provjera autentičnosti meda predstavlja veliki izazov radi brojnih krivotvorenja meda, što dalje vodi do potrage za pouzdanim spojevima markera za razne monoflorne vrste meda. (27)

1.8.1 Metode izolacije hlapljivih spojeva u medu

Ispitivanje autentičnosti meda ima važnu ulogu kako za industriju, tako i za potrošače u borbi protiv pogrešnog označavanja podrijetla meda i sve učestalijeg patvorenja šećerom ili sirupima. (29)

Pokazalo se kako tradicionalna analiza peludi meda nije u potpunosti pouzdana, pa se u novije vrijeme, pored ove metode, koristi analiza hlapljivih sastojaka koja ukazuje na botaničko podrijetlo meda. (30)

Metode koje se koriste za izolaciju hlapljivih tvari su: hidrodestilacija (HD), mikrosimultana destilacija – ekstrakcija (MSDE), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (USE) (31)

Budući da se mogu koristiti različite metode izolacije, kao rezultat toga mogu se očekivati i različiti rezultati u sastavu dobivenih aroma.

Dokazano je kako hidrodestilacija i mikrosimultana destilacija – ekstrakcija nisu pogodne za izolaciju hlapljivih frakcija meda jer uključuju zagrijavanje koje dovodi do stvaranja artefakata i degradacije osjetljivih spojeva. Zbog toga su ultrazvučna ekstrakcija i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi prikladnije metode za izolaciju hlapljivih spojeva. (31)

1.8.1.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (SPME)

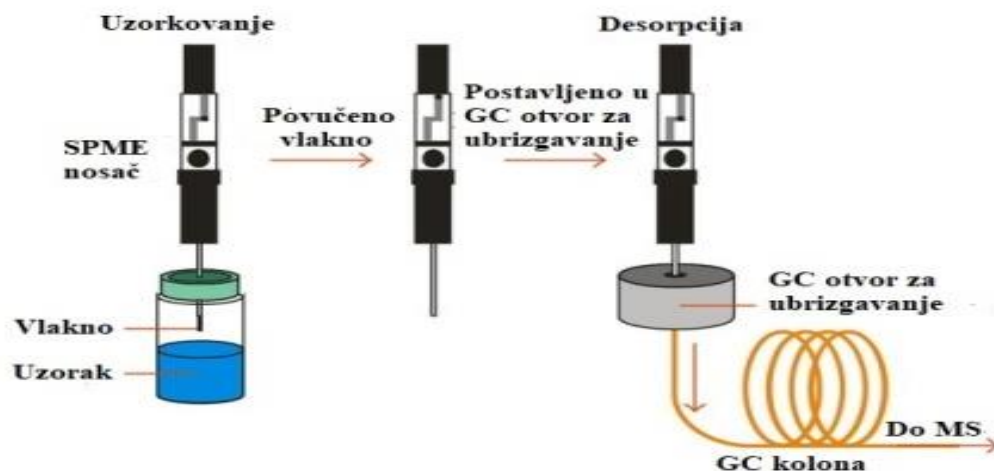
Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (SPME) - je tehnika izumljena 1989. koja je olakšala bržu pripremu uzorka u laboratoriju ili na mjestu gdje se nalazi ispitivani sustav.

Aparatura mikroekstrakcije na krutoj fazi sastoji se od držača (nosača) vlakana, snopa vlakana i igle.

Metoda se sastoji od dva osnovna koraka, a to su: raspodjela analita na vlakno i desorpcija koncentriranih ekstrakata u analitički uređaj. (32) Bez otapala i u jednom koraku, vlakno prikuplja i koncentrira uzorak, nakon čega ga prenosi u instrument za analizu.

Vlakno kod mikroekstrakcije na čvrstoj fazi dugo je 1 cm i pričvršćeno je na klip. Kada se pritisne klip, vlakno se produži i na njega se sakuplja uzorak adsorpcijom i adsorpcijom, u ovisnosti o vrsti premaza. Nakon izvjesnog vremena izlaganja vlakno se uvlači. U drugom koraku, vlakno se stavlja u GC-MS sustav. Otvor injektora koji je zagrijan odvodi sakupljene spojeve u instrument za kvantitativnu ili kvalitativnu analizu. S obzirom na to da je vlakno prilikom zagrijavanja u injektoru očišćeno, ono je spremno za ponovno korištenje. (33)

Ova metoda je riješila potrebu za brzom pripremom uzorka, jer ona integrira uzorkovanje, ekstrakciju, koncentriranje i uvođenje uzorka u jednom koraku bez otapala. Metoda se rutinski upotrebljava u kombinaciji s plinskom kromatografijom (GC) i plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS), a posebno je uspješna primjena za ekstrakciju hlapljivih i poluhlapljivih organskih spojeva iz složenih matrica uzoraka. (32)



Slika 5. Prikaz tehnike mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (34)

1.8.2 Analiza hlapljivih spojeva

Nakon izolacije hlapljivih spojeva, potrebno je provesti njihovu analizu. Analiza hlapljivih spojeva podrazumijeva identificiranje određenih sastojaka smjese (kvalitativna analiza) i određivanje udjela sastojaka koji su identificirani (kvantitativna analiza).

Najprikladnija i najčešće korištena metoda za analizu hlapljivih spojeva je plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom kao metodom detekcije, odnosno vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). (35)

1.8.2.1 Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC)

Općenito, kromatografija predstavlja metodu odjeljivanja u kojoj se komponente razdjeljuju između dviju faza od kojih je jedna stacionarna, a druga mobilna. (35)

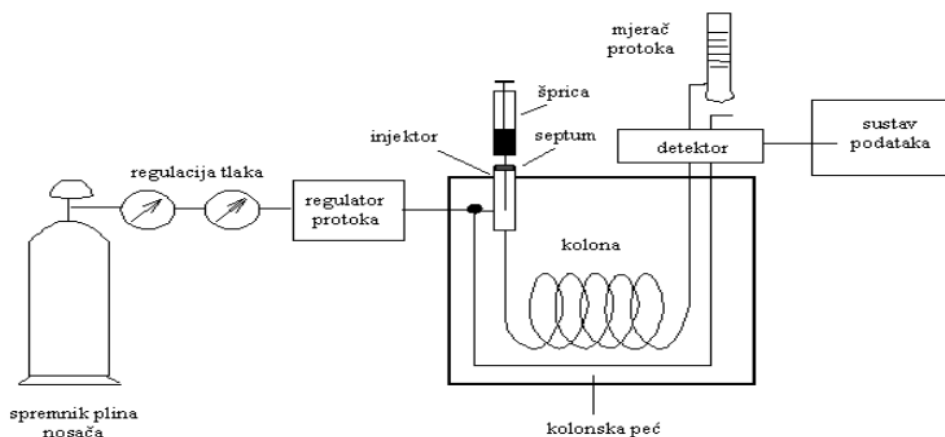
Nepokretna faza može biti čvrsta, kapljevita ili u obliku gela. Pokretnu fazu predstavlja fluid koji prolazi kroz ili uzduž nepokretne faze, a može biti kapljevina (tekućinska kromatografija) ili plin (plinska kromatografija). (36)

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) predstavlja najčešće korištenu tehniku za odjeljivanje smjesa hlapljivih spojeva. Kod plinske se kromatografije

komponente smjese odvajaju kao rezultat različite raspodjele između pokretne plinovite faze i tekuće ili čvrste stacionarne faze držane u koloni.

Uređaj za plinsku kromatografiju sastoji se od:

- plina nositelja (inertni plin, uglavnom helij, neon i argon) s regulatorom tlaka i mjerачem protoka
- injekcijskog bloka (injektora koji uštrcava uzorke)
- kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranom prostoru
- detektora, pojačala i računala (35)



Slika 6. Shematski prikaz plinskog kromatografa (37)

Mobilna faza je u plinovitom stanju, a stacionarna faza, koja je smještena u koloni, je kruti adsorbens ili tekućina nanescna na kruti nosač.

Uzorci koji se koriste za plinsku kromatografsku analizu trebaju biti hlapljivi kako bi se u injektoru preveli u plinovito stanje i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. (35, 38)

Sustav za uvođenje plina nositelja sastoji se od spremnika plina nosača i redukcijskog ventila za tlak i protok plina. Bitno je da plin nositelj bude inertan i visoke čistoće, pa se zbog toga skladišti u spremnicima pod visokim tlakom.

Regulatorom se kontrolira tlak i protok plina prije njegovog ulaska u kolonu, jer plin ne smije nositi uzorak ni presporo ni prebrzo. Ukoliko se unosi prebrzo, smanjuje se vjerojatnost separiranja komponenti uzorka. S druge strane, ako plin presporo unosi uzorak kroz kolonu, dolazi do zadržavanja komponenti u koloni.

Uzorak koji se želi razdvojiti ubrizgava se pomoću injektora pri povišenoj temperaturi kako bi mogao ispariti. Temperatura injektora je uglavnom 50°C iznad točke vrenja najmanje hlapljive komponente uzorka.

Najvažniji dio kromatografa, kolona, smještena je u termostatirani dio uređaja. U plinskoj kromatografiji koriste se dvije vrste kolona, a to su kapilarne i punjene kolone. Punjene kolone izrađene su od stakla ili nehrđajućeg čelika, a duge su do 2 m, dok su kapilarne kolone načinjene su od taljenog kvarca, a duge su 30-100 m.

Prolaskom uzorka kroz kolonu, hlapljivije komponente stupaju u kontakt s mobilnom fazom i bivaju odnesene do detektora koji registrira prisutnost komponente u plinu nositelju. (39)

Kao detektor se mogu koristiti: detektor toplinske vodljivosti, detektor apsorpcije elektrona, plamenofotometrijski detektor, fotoionizacijski detektor i spektrometar masa koji na osnovu kemijskog ili fizičkog svojstva komponente detektiraju njenu prisutnost u plinu nosiocu.

Upravo detektor spektrometar masa daje najveći broj podataka koji su potrebni za identificiranje i određivanje strukture organskih složenih molekula. (35)

1.8.2.2 Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS)

Spektrometrija masa je instrumentalna analitička tehnika kojom se određuje relativna molekulska masa spoja. (40)

MS je temeljena na ionizaciji i fragmentaciji molekula uzorka koji se nalazi u plinovitoj fazi. Molekule uzorka se bombardiraju elektronima visoke energije i pri tome se iz molekule izbacuje jedan ili više elektrona. Kao rezultat ionizacije nastaje molekulski kation (M⁺) koji se dalje fragmentira ovisno o strukturi spoja i dovedenoj energiji. Kationi,

nabijeni fragmenti, dolaze do detektora i razvrstavaju se prema masi, odnosno omjeru mase i naboja.

Budući da su molekule fragmentirane na jedinstven način, rezultat fragmentacije iona se upotrebljava za dobivanje strukturnih informacija za pojedinu molekulu. (35, 41)

Maseni spektrometar se sastoji od 4 dijela:

- sustava za unošenje uzorka
- ionskog izvora (koji stvara ione svojstvene ispitivanom uzorku i u električnom ih polju ubrzava do analizatora)
- analizatora (uglavnom magnetno polje; savija putanje iona i razdvaja ih u ovisnosti o omjeru m/z)
- detektora (u kojem se ioni registriraju i bilježi se intenzitet m/z).

Komponente masenog spektrometra rade pod vakuumom kako bi se izbjegli nepoželjni sudari s neutralnim molekulama u sustavu, jer takvi sudari mogu doprinijeti povećanjem složenosti finalnog spektra mase, što otežava spektralnu interpretaciju. (40, 41)

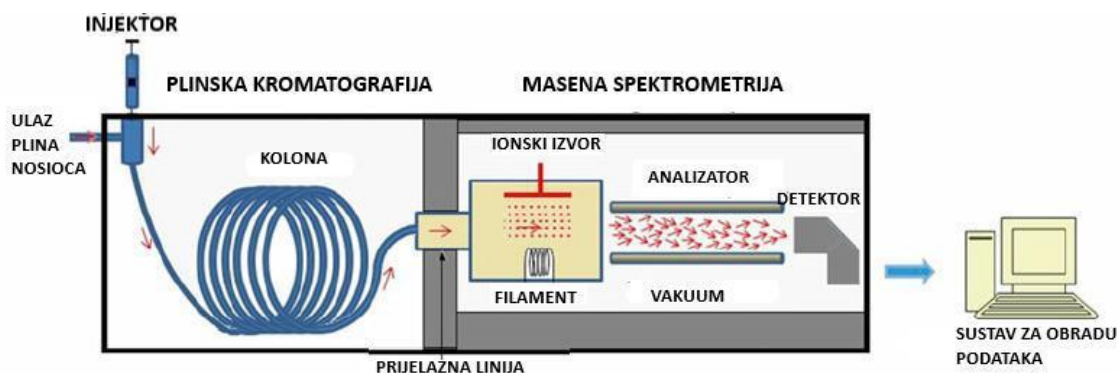
1.8.2.3 Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Kombinirana tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) predstavlja moćnu analitičku metodu koja kombinira izvanrednu moć razdvajanja plinskom kromatografijom s usavršenom identifikacijom temeljenom na preciznom mjerenju mase. (42)

Dugi niz godina plinska kromatografija i spektrometrija masa imale su odvojene, ali bliske uloge u analizi složenih struktura. Plinska se kromatografija razvila kao metoda za odvajanje složenih smjesa, dok se spektrometrija masa unaprijedila u tehniku za strukturnu karakterizaciju složenih spojeva. Međutim, obje tehnike dijele važnu karakteristiku u tome što svaka koristi uzorke u fazi pare. Njihova izravna kombinacija pruža svestran alat za kvantitativno i kvalitativno određivanje strukture komponenata složenih smjesa. (43)

Spajanjem ovih tehnika dobiju se dvije važne informacije za svaku analizu, a to su: vrijeme zadržavanja analiziranog spoja na koloni (retencijsko vrijeme) i informacije o masenom spektru za svaki odvojeni spoj. (41)

Glavne prednosti ove metode su korištenje male količine uzorka, brza analiza i bogatstvo dobivenih informacija o molekularnoj strukturi. (43)



Slika 7. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS (44)

Komponente uzorka se odjeljuju u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa nakon čega ih plin nositelj odnosi u detektor, u ovom slučaju spektrometar masa. Dobiveni spektar masa na računalo se uspoređuje s bazom podataka spektra masa i određuje se postotak slaganja, nakon čega se može identificirati spoj. (45)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 OPĆE KARAKTERISTIKE VRSTE *AILANTHUS ALTISSIMA*

Pajasen je listopadno stablo iz porodice pajasena (lat. *Simaroubaceae*) podrijetlom iz Kine. Brzorastuće je stablo široke i rijetke krošnje, a može narasti i do 30 metara visine.

Latinsko ime roda *ailanthus* dolazi od indonezijske riječi *ailanto* (drvo bogova, nebesko drvo), a ime vrste *altissima* potječe od latinske riječi *altus* (visok). (46)



Slika 8. Pajasen (lat. *Ailanthus altissima*) (46)

U ovom radu korištena su dva uzorka meda od pajsena s područja Kvarnera (Kastav). Autentičnost meda potvrđena je na Odjelu za Biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

2.2 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA MIKROEKSTRAKCIJOM VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Volumen od 5 mL vodene otopine uzorka meda (1 : 1 v/v) i 2 mL zasićene otopine NaCl (Fluka Chemie, p.a.) se stavi u staklenu posudu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C), a sadržaj u njoj se mješa upotrbom magnetske miješalice (Heidolph MR Her-Standard (100-1400 o/min) s termostatom Heidolph EKT 3001, Njemačka). Na slici 9 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).



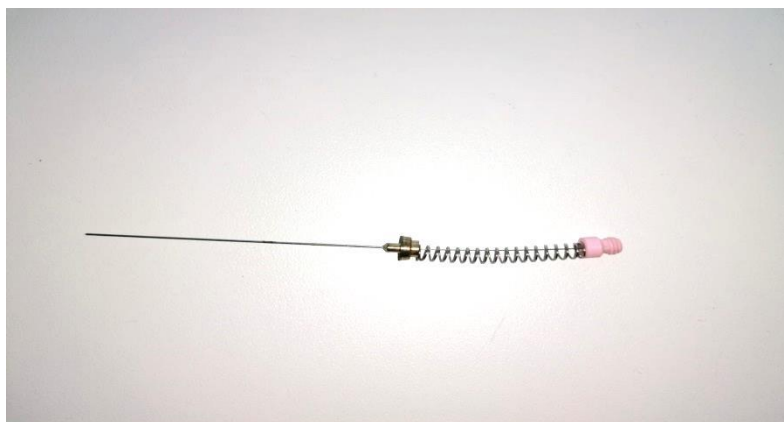
Slika 9. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), vlakna se kondicioniraju. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

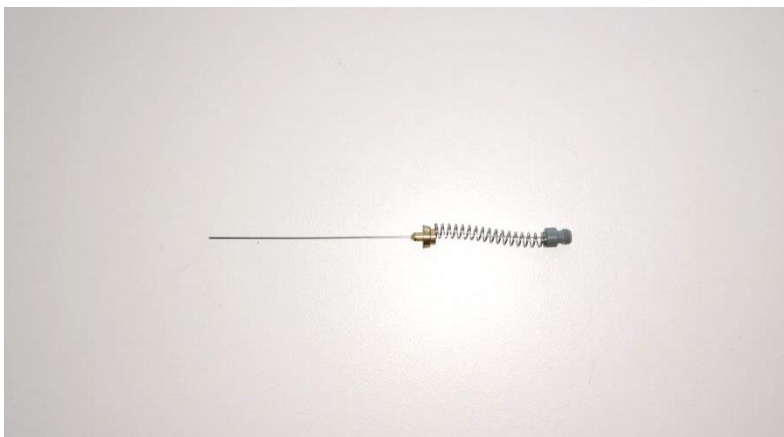
Vlakna za ekstrakciju vršnih para uzoraka meda s obzirom na ukupni broj identificiranih spojeva u vršnim parama:

- Korišteno je ružičasto vlakno s ovojnicom 65 μm polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD), slika 10.

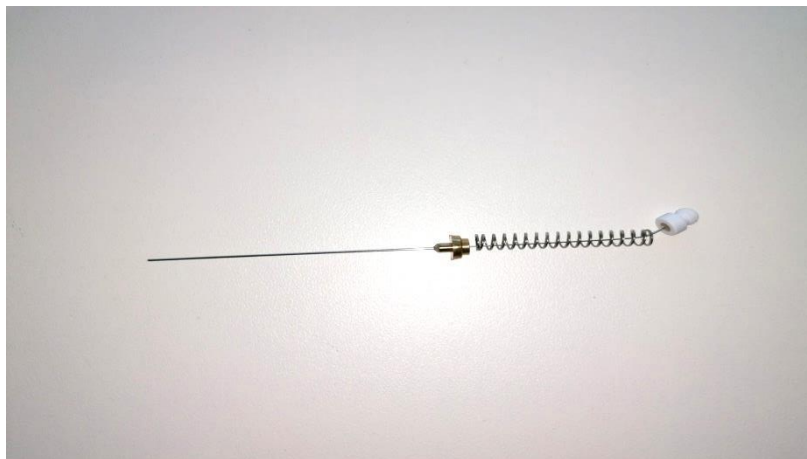
- Korišteno je sivo vlakno s ovojnicom 50/30 μm divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD), slika 11.
- Korišteno je bijelo vlakno s ovojnicom 85 μm Polyacrylate dužine 5 cm (Supelco Co., SAD), slika 12.



Slika 10. Ružišasto vlakno polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB)



Slika 11. Sivo vlakno divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS)



Slika 12. Bijelo vlakno Polyacrylate

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, vlakno se izvlači i provodi se ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min, uz konstantnu brzinu miješanja otopine uzorka meda (1000 o/min). Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu. (47)

2.3 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

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



Slika 13. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Karakteristike kolone HP-5MS:

- stacionarna faza – (5% fenil)-metilpolisiloksan
- promjer – 0,25 mm
- duljina – 30 m
- debljina sloja stacionarne faze – 0,20 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 μ L).

3. REZULTATI

3.1 PRIKAZ REZULTATA

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva meda od pajasena provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija- spektrometrija masa. Rezultati su prikazani tablično i u obliku kromatograma.

Tablica 1. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od pajasena (uzorak 1) izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s PDMS/DVB ovojnicom)

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	2-metilbutanal*	<900	0,12
2.	benzaldehyd ^a	956	0,19
3.	<i>trans</i> -linalool oksid	1076	0,91
4.	<i>cis</i> -linalool oksid	1091	1,30
5.	linalool	1101	1,29
6.	hotrienol	1106	77,84
7.	aldehid jorgovana (izomer I ^{**})	1147	0,53
8.	aldehid jorgovana (izomer I ^{**})	1156	1,17
9.	nerol oksid	1162	3,30
10.	aldehid jorgovana (izomer II ^{**})	1170	0,44
11.	terpinen-4-ol	1179	0,23
12.	3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol	1191	3,48
13.	5-hidroksimetilfurfural	1230	3,86
14.	nonanska kiselina ^a	1272	1,11

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

Tablica 2. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od pajasena (uzorak 1) izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s DVB/CAR/PDMS ovojnicom)

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	2-metilbutanal*	<900	0,39
2.	oktan	<900	0,24
3.	<i>trans</i> -linalool oksid	1076	0,40
4.	linalool	1101	0,71
5.	hotrienol	1106	44,50
6.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1147	0,31
7.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1156	0,69
8.	nerol oksid	1162	1,33
9.	aldehid jorgovana (izomer II**)	1170	0,25
10.	3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol	1191	5,62
11.	dekan-1-ol	1272	1,86
12.	(E)-2,6-dimetilokt-2,7-dien-1,6-diol ((E)-8-hidroksilinalool)	1367	0,63
13.	trikosan ^a	2300	12,61
14.	tetrakosan ^a	2400	24,33

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

Tablica 3. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od pajasena (uzorak 1) izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s Polyacrylat ovojnicom)

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	butanal	<900	1,95
2.	3-metilbutanal*	<900	2,30
3.	<i>trans</i> -linalool oksid	1076	0,31
4.	linalool	1101	0,90
5.	hotrienol	1106	63,88
6.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1156	0,45
7.	1,3-di(1-metiletil)benzen	1157	0,43
8.	nerol oksid	1162	0,90
9.	aldehid jorgovana (izomer II**)	1170	0,25
10.	terpinen-1-ol	1179	0,11
11.	3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol	1191	13,49
12.	5-hidroksimetilfurfural	1230	1,75
13.	nonanska kiselina ^a	1272	1,56
14.	heneikosan ^a	2100	5,12
15.	trikosan ^a	2300	2,35

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

Tablica 4. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od pajasena (uzorak 2) izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s PDMS/DVB ovojnicom)

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	oktan	<900	0,19
2.	<i>trans</i> -linalool oksid	1076	0,69
3.	<i>cis</i> -linalool oksid	1091	0,4
4.	linalool	1101	1,05
5.	hotrienol	1106	66,96
6.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1147	0,53
7.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1156	1,10
8.	nerol oksid	1162	2,10
9.	aldehid jorgovana (izomer II**)	1170	0,41
10.	terpinen-4-ol	1179	2,29
11.	3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol	1191	2,57
12.	dodekan ^a	1200	0,87
13.	5-hidroksimetilfurfural	1230	3,15
14.	nonanska kiselina ^a	1272	1,86
15.	ikosan ^a	2000	0,84
16.	heneikosan ^a	2100	3,34
17.	trikosan ^a	2300	2,46

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

Tablica 5. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od pajasena (uzorak 2) izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s DVB/CAR/PDMS ovojnicom)

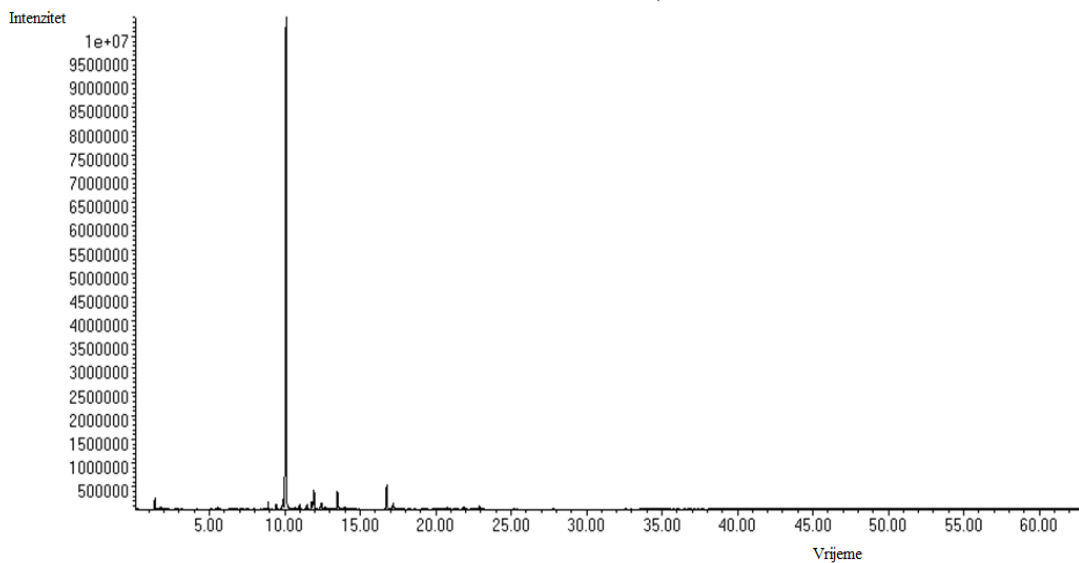
Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	2-metilbutanal*	<900	0,22
2.	oktan	<900	0,25
3.	benzaldehyd ^a	956	0,29
4.	<i>trans</i> -linalool oksid	1076	0,64
5.	<i>cis</i> -linalool oksid	1091	0,44
6.	linalool	1101	0,91
7.	hotrienol	1106	63,13
8.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1147	0,42
9.	aldehid jorgovana (izomer II**)	1156	0,90
10.	nerol oksid	1162	2,70
11.	aldehid jorgovana (izomer II**)	1170	1,97
12.	terpinen-4-ol	1179	1,41
13.	3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol	1191	1,13
14.	decanal	1207	0,72
15.	5-hidroksimetilfurfural	1230	3,61
16.	nonanska kiselina ^a	1272	3,46
17.	dokosan ^a	2200	13,98

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

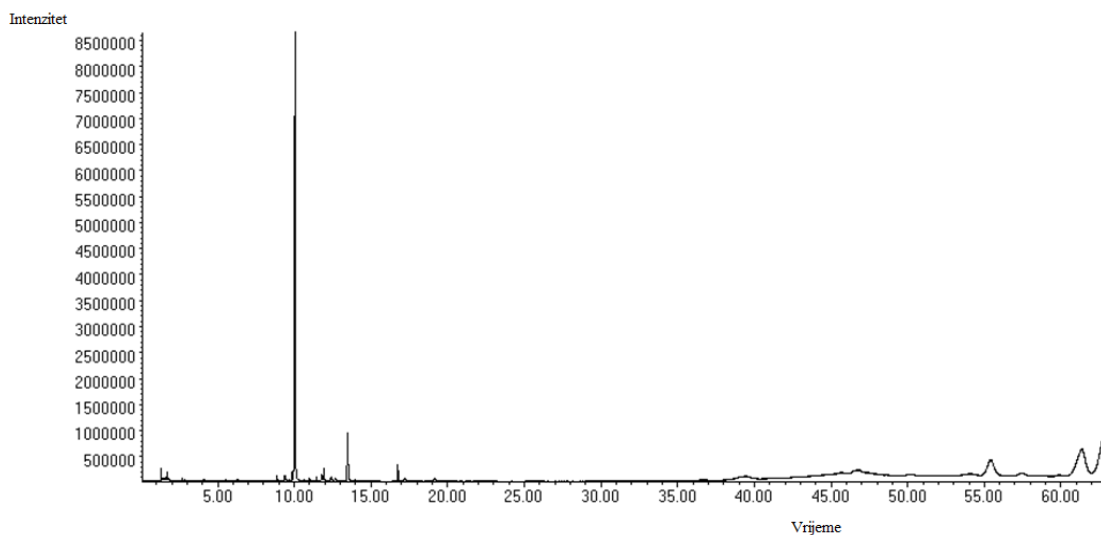
Tablica 6. Udio hlapljivih spojeva u uzorcima uniflornog meda od pajasena (uzorak 2) izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s Polyacrylat ovojnicom)

Red.br.	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	butanal	<900	0,67
2.	<i>trans</i> -linalool oksid	1076	0,18
3.	linalool	1101	0,34
4.	hotrienol	1106	28,75
5.	aldehid jorgovana (izomer I ^{**})	1156	0,19
6.	aldehid jorgovana (izomer II ^{**})	1170	0,36
7.	terpinen-1-ol	1179	0,38
8.	3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol	1191	0,79
9.	5-hidroksimetilfurfural	1230	0,60
10.	nonanska kiselina ^a	1272	3,42
11.	heksadekan-1-ol	1882	57,33

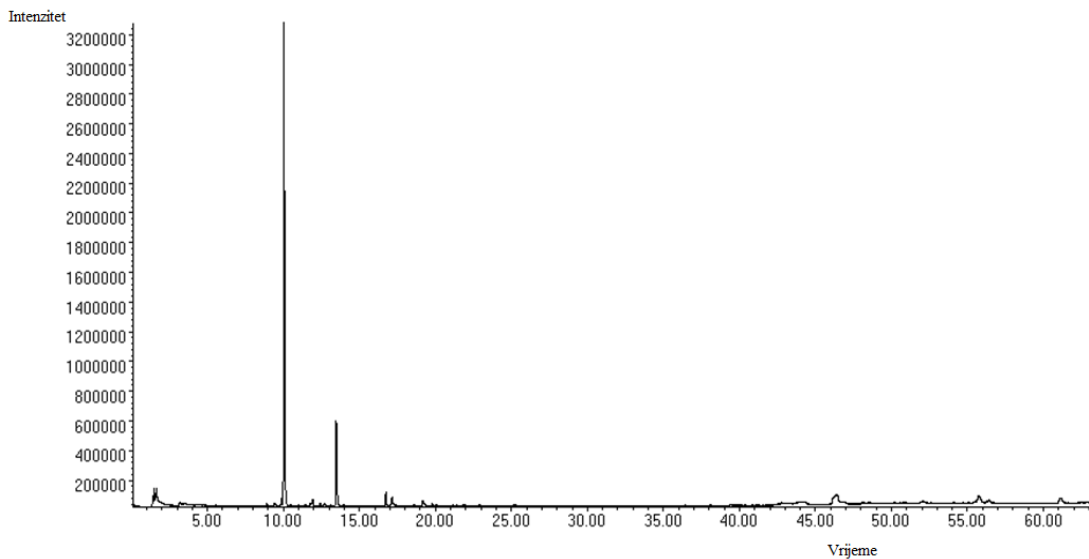
RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni; ^a = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja; * = spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); ** = točan izomer nije identificiran



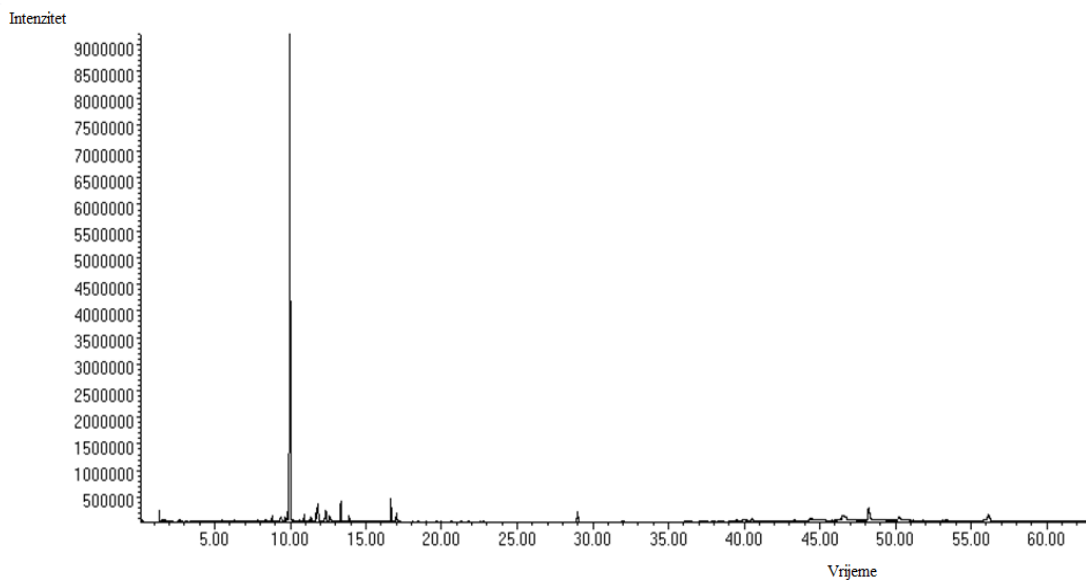
Slika 14. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od pajasena (uzorak 1) izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen PDMS/DVB (ružičasto vlakno)



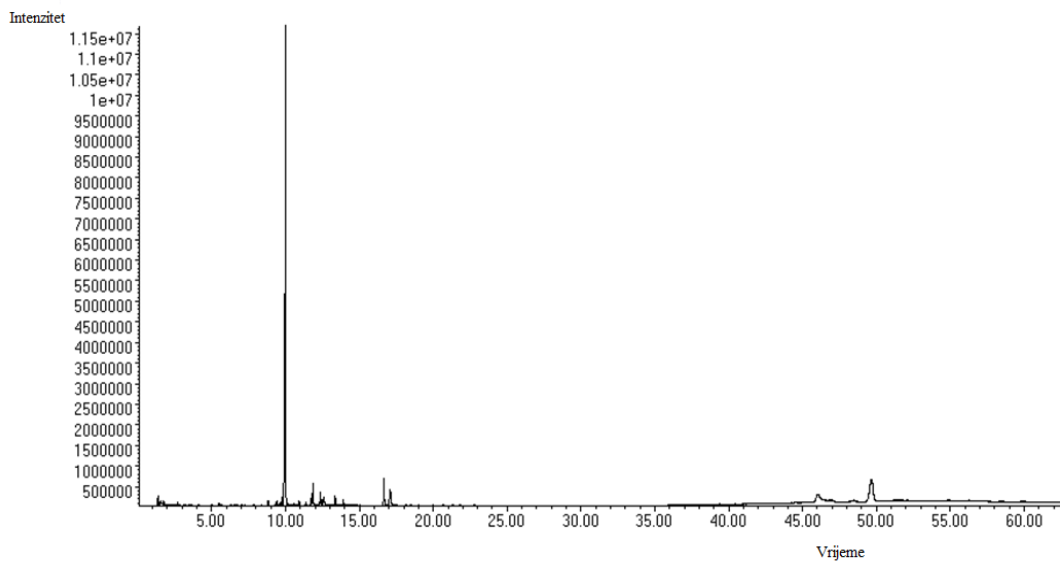
Slika 15. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od pajasena (uzorak 1) izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno)



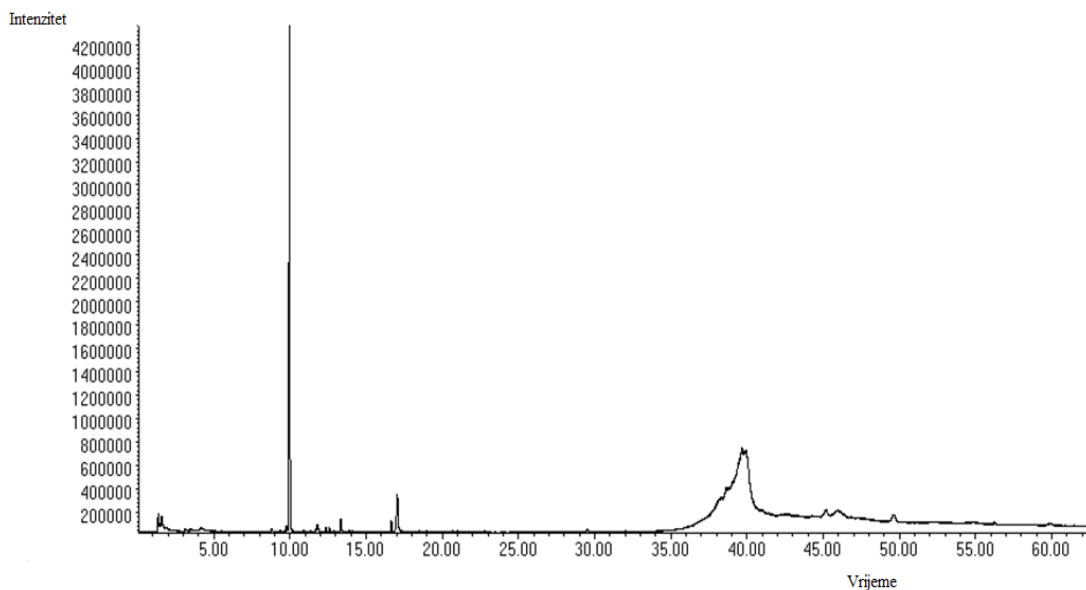
Slika 16. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od pajasena (uzorak 1) izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom Polyacrylate (bijelo vlakno)



Slika 17. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od pajasena (uzorak 2) izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen PDMS/DVB (ružičasto vlakno)



Slika 18. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od pajasena (uzorak 2) izoliranih HS-SPME metodom s ovojnomicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno)



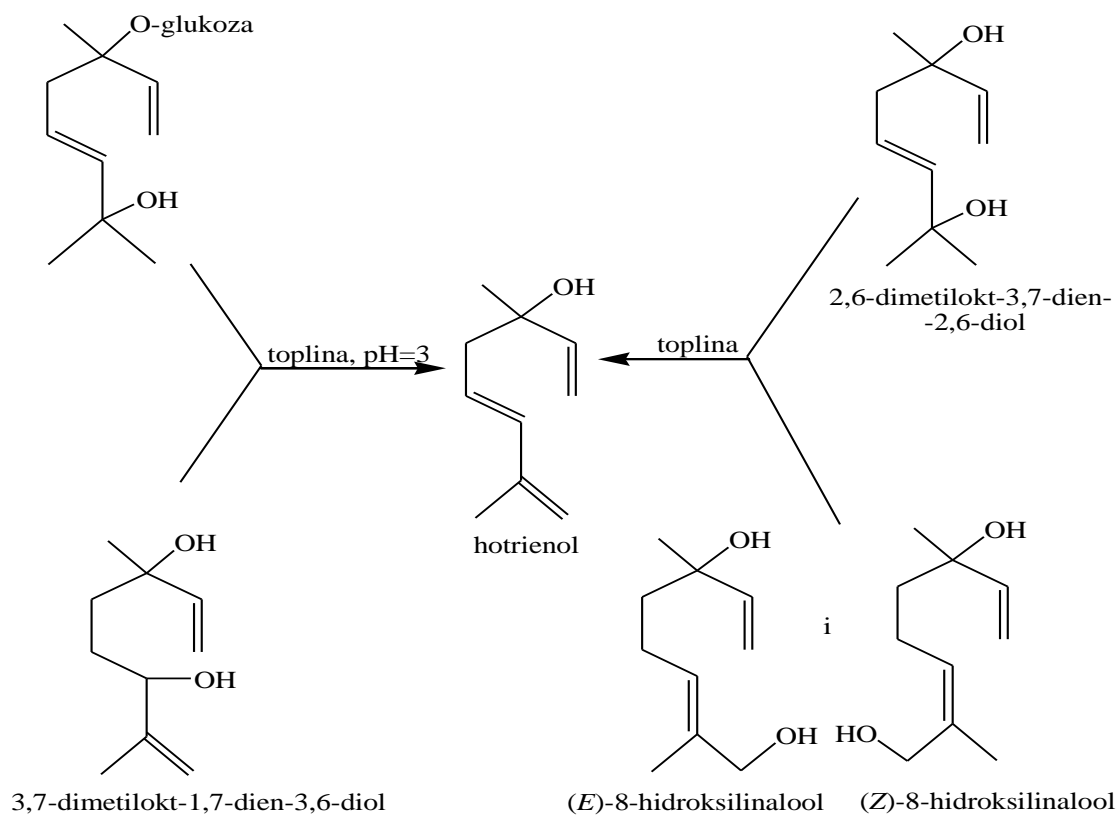
Slika 19. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od pajasena (uzorak 2) izoliranih HS-SPME metodom s ovojnomicom Polyacrylate (bijelo vlakno)

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti hlapljive spojeve meda od pajasena. Hlapljivi spojevi meda od pajasena izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći tri različita vlakna.

Upotrebom ružičastog vlakna mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi izolirano je 19 različitih spojeva koji su prikazani u tablicama 1 i 4. Vidljivo je da je među hlapljivim spojevima izoliranim pomoću ružičastog vlakna najzastupljeniji spoj hotrienol (66,96-77,84%). Ostali količinski zastupljeniji spojevi su 5-hidroksimetilfurfural (3,15-3,86), 3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol (2,57-3,48%), nerol oksid (2,10-3,30). Kod uzorka 2 identificirani su i spojevi ikosan, heneikosan i trikosan, koji nisu identificirani u uzorku 1.

Budući da uzorci prilikom izolacije nisu bili termički tretirani, hotrienol (slika 20) je vjerojatno nastao tijekom zrenja meda. (48)



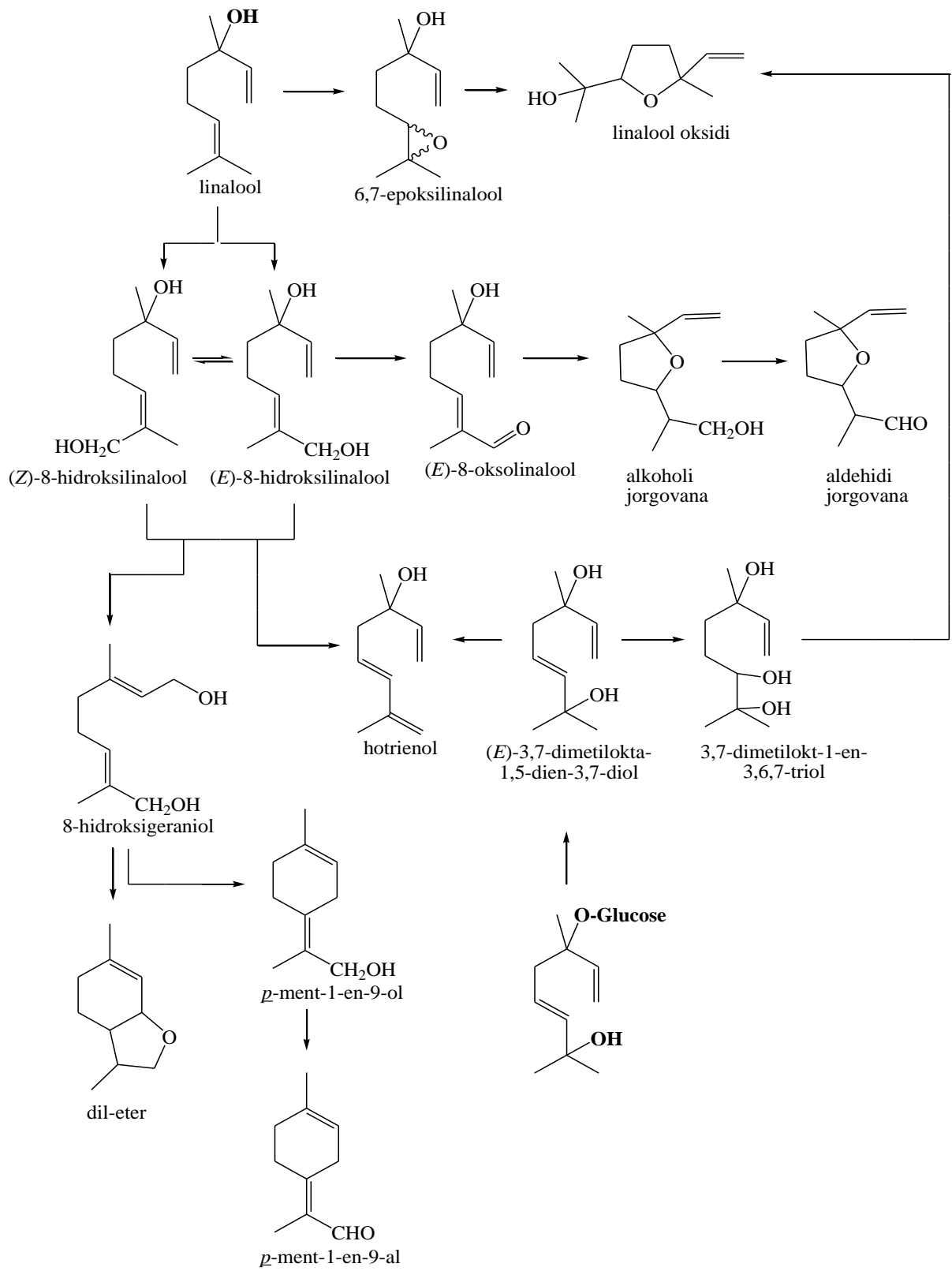
Slika 20. Nastajanje hotrienola (48)

Terpeni, pogotovo derivati linaloola, identificirani su u većem postotku i to: *trans*-linalool oksid (0,69-0,91), *cis*-linalool oksid (0,44-1,30) i izomer aldehida jorgovana (0,41-1,17).

Biogenetske studije su pokazale da aldehyd jorgovana nastaje iz linaloola izravnom hidroksilacijom na C₈ atomu do (*E*)-8-hidroksilinaloola i dalje do (*E*)-8-oksolinaloola koji se pretvara u alkohol jorgovana koji oksidacijom prelazi u aldehyd jorgovana. (49)

Izravna hidroksilacija linaloola vodi do dva izomera 8-hidroksilinaloola (slika 21). Osim toga, epoksidacija linaloola daje 6,7-epoksilinalool koji zagrijavanjem ili u kiselim uvjetima, daje linalool okside. Aldehydi jorgovana nastaju iz linaloola preko (*E*)-8-hidroksilinaloola i (*E*)-8-oksolinaloola. Uzimajući u obzir kiselu prirodu meda, redukcijske reakcije nisu poželjne te je vjerojatno za pretpostaviti da oksidacija alkohola jorgovana vodi do aldehida jorgovana. (49)

Razgradnja (*E*)-3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diola ili njegovog glukozida može stvoriti i hotrienol. (50)



Slika 21. Biogenetski odnosi derivata linaloola (49)

U tablicama 2 i 5 prikazan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih pomoću sivog vlakna i pronađeno je 20 spojeva od kojih je najznačajniji hotrienol (44,50-63,13%), nakon čega slijede 3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol (1,13-5,62%), nerol oksid (1,33-2,70). U uzorku 1 u većim količinama pronađeni su trikosan (12,61) i tetrakosan (24,33), dok je u uzorku 2 pronađen 5-hidroksimetilfurfural (3,61%), nonanska kiselina (3,46%) i dokosan (13,98%).

Upotrebom bijelog vlakna mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi izolirano je 16 različitih spojeva prikazanih u tablicama 3 i 6. U tablicama je vidljiv profil isparljivih spojeva izoliranih pomoću bijelog vlakna u kojem je došlo do većih razlika. U uzorku 1 najzastupljeniji spoj je hotrienol sa 63,88%, čiji udio u uzorku II iznosi 28,75%. Dominantni spoj u uzorku 2 je heksadekan-1-ol sa udjelom od 57,33%.

U tablicama je vidljiva razlika u udjelu spoja 3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol koji je u prvom uzorku zastupljen sa 13,49%, dok u uzorku 2 njegov udio iznosi 0,79%. U obadva uzorka pronađena je nonanska kiselina (1,56-3,42%), dok su u uzorku 2 u većim količinama pronađeni heneikosan (5,12%) i trikosan (2,35%).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata i uzimajući u obzir raspravu ovog diplomskog rada može se zaključiti sljedeće:

- Upotrebom ružišastog vlakna mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi izolirano je 18 spojeva, od kojih je najzastupljeniji hotrienol.
- Upotrebom sivog vlakna mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi izolirano je 20 spojeva, od kojih je dominantan hotrienol.
- Upotrebom bijelog vlakna mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi izolirano je 16 spojeva, od kojih je najzastupljeniji hotrienol u jednom uzorku meda i heksadekan-1-ol u drugom uzorku meda.
- U 5 uzoraka najzastupljeniji spoj bio je hotrienol, dok je u jednom uzorku dominantan spoj bio heksadekan-1-ol.
- S obzirom na to da metoda HS-SPME ne koristi tehničku obradu, pretpostavlja se da je hotrienol nastao tijekom zrenja meda.
- Spojevi *E*-2,6-dimetilokt-2,7-dien-1,6-diol (*E*-8-hidroksilinalool), decan i dokosan izolirani su samo pomoću sivog vlakna.
- Spojevi terpen-1-ol, 1,3-di(1-metiletil)benzen i heksadekan-1-ol izolirani su samo pomoću bijelog vlakna.
- Pomoću ružišastog vlakna izolirani su spojevi dodekan i ikosan.

6. LITERATURA

1. Belčić J., Katalinić J., Loc D., Lončarević S., Peradin L., Sulimanović Đ., Šimić F., Tomašec I., Pčelarstvo, Nakladni zavod znanje, Zagreb; 1985: 15 - 20
2. Udruga pčelara Bujštine. Dostupno na:
<http://pcelari-bujstine.com/povijest-pcelarenja/> (pristupljeno: 2.7.2022.)
3. <https://auladehistoria.org/comentario-cueva-la-arana-bicorp/> (pristupljeno: 2.7.2022.)
4. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z., Dražić M., Barišić D., Filipi J., Jakopović I., Krakar D., Palčić-Jakopović K., Ševar M., Tretinjak V., Konvencionalno i ekološko pčelarenje, interna skripta, Zagreb: 2011
5. Batinić K, Palinić D. Priručnik o medu, Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru, Federalni agromediteranski zavod Mostar; 2014.
6. Vesković B., Praktično pčelarstvo sa radovima po mesecima, Beograd; 1988: 17 - 30
7. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 20/2000)
8. https://www.google.com/search?q=med&sxsrf=ALiCzsYgdgYUPS-QNfnJZpCuJIz_dnXiA:1665151610553&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiEovmRpc76AhXL-ioKHTnNDQkQ_AUoAXoECAEQAw#imgrc=9GIKdmxNCPWbrM (pristupljeno: 3.7.2022.)
9. Abadžić N., Tajne pčelinjeg meda, *Novinsko izdavačko preduzeće Zadrugar*, Sarajevo; 1967
10. Eteraf-Oskouei T, Najafi M., Traditional and modern uses of natural honey in human diseases, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16 (6) 2013: 731 - 742
11. Pita-Calvo C., Vázquez M., Differences between honeydew and blossom honeys, *Trends in Food Science & Technology*, 59 2017: 79–87.
12. Villanueva-Gutiérrez, R., Moguel-Ordóñez, Y.B., Echazarreta-González, C.M., Arana-López, G. Monofloral honeys in the Yucatán Peninsula, *Grana*, Mexico, 48 2009: 214 - 223
13. Jerković I., Predavanja iz kolegija Med i drugi pčelinji proizvodi, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet sveučilišta u Splitu
14. Pravilnik o medu (NN 53/2015)
15. <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pfos:231/preview> (pristupljeno: 7.7.2022.)

16. da Silva P. M., Gauche C., Gonzaga L. V., Costa A. C., Fett R., Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, 196 2016: 309 - 323
17. Wang J., Li Q. X., Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins, *Advances in food and nutrition research*, 2011, 62: 89 - 137.
18. Cavia M. M., Fernández-Muiño M. A., Alonso-Torre S. R., Huidobro J. F., Sancho M. T., Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation, *Food Chemistry*, 100 (4) 2007: 1728–1733
19. https://www.researchgate.net/figure/5-Hydroxymethylfurfural-HMF-structure-5-Hydroxymethylfurfural-HMF-structure_fig1_327354263 (pristupljeno: 11.7.2022.)
20. Shapla U.M., Solayman M., Alam, N., Khalil M.I., Hua Gan S., 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health, *Chemistry Central Journal* 12 (1) 2018: 35
21. Schramm D. D., Karim M., Schrader H. R., Holt R. R., Cardetti M., Keen C. L., Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6) 2003: 1732–1735
22. Amariei S., Norocel L., Scripcă L. A. (2020). An innovative method for preventing honey crystallization, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66 2020
23. Primorac L., Flanjak I., Kenjerić D., Bubalo D., Topolnjak Z., Specific rotation and carbohydrate profile of Croatian unifloral honeys, *Czech journal of food sciences*, **29** 2011: 515 -519
24. Piana M. L., Persano Oddo L., Bentabol A., Bruneau E., Bogdanov S., Guyot Declerck C., Sensory analysis applied to honey: state of the art, *Apidologie*, 35 2014: 26 - 37
25. Vahčić N., Matković D., *Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda*, 2009
<https://www.scribd.com/document/130527525/Kemijske-Fizikalne-i-Senzorske-Karakteristike-Meda> (pristupljeno: 10.7.2022.)
26. Marcazzan G. L., Mucignat-Caretta C., Marina Marchese C., Piana M. L., A review of methods for honey sensory analysis, *Journal of Apicultural Research*, 57 (1) 2017: 75–87
27. Machado A. M., Miguel M. G., Vilas-Boas M., Figueiredo A. C., Honey Volatiles as a Fingerprint for Botanical Origin—A Review on their Occurrence on Monofloral Honeys, *Molecules*, 25(2), 2020: 374

28. Manyi-Loh C.E., Ndip R.N., Clarke A.M., Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities, *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (12) 2020: 9514–9532
29. Chin N. L., Sowndhararajan, K. (2020). A Review on Analytical Methods for Honey Classification, Identification and Authentication, 2020
30. Jerković I, Mastelić J., Marijanović Z., Klein Ž., Jelić M., Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14 (6) 2007: 750–756.
31. Alissandrakis E., Tarantilis P. A., Harizanis P. C., Polissiou M., Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (1) 2004: 91 - 97
32. Risticovic S., Niri V. H., Vuckovic D., Pawliszyn J., Recent developments in solid-phase microextraction, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393 (3) 2009: 781 - 795
33. Ormsby M., Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction, *Journal of the American Institute for Conservation*, 44 (1) 2005: 13 - 26
34. https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-analysis-with-solid-phase-microextraction-gas-chromatography-mass-spectrometry_fig2_274709453 (pristupljeno: 11.8.2022.)
35. Jerković I., Radonić A., Praktikum iz organske kemije, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet sveučilišta u Splitu, 2009
36. Hrvatska enciklopedija. Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34154> (pristupljeno: 11.8.2022.)
37. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm (pristupljeno: 12.8.2022.)
38. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R., Principles of Instrumental Analysis, Seventh Edition, 2016
39. Matanović M., Primjena separacijskih metoda u analitičkoj kemiji, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2020
40. Hrvatska enciklopedija. Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=39268> (pristupljeno: 12.8.2022.)
41. Smith R. W., Mass Spectrometry, *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 2013: 603 – 608

42. Špánik I., Machyňáková A. Recent applications of gas chromatography with high-resolution mass spectrometry, *Journal of Separation Science*, 41 (1) 2017: 163 - 179
43. Leemans F. A. J. M., McCloskey J. A., Combination gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44 (1) 1967: 11 – 17
44. <https://docplayer.rs/223253456-Hlapljivi-spojevi-piva.html> (pristupljeno: 16.8.2022.)
45. Budzovačić A., Hlapljivi spojevi meda od kadulje, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2020
46. <https://www.plantea.com.hr/pajasen/> (pristupljeno 23.10.2022.)
47. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek. 2014; 34-35.
48. Alissandrakis E, Tarantilis PA, Harizanis PC, Polissiou M: Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic–mass spectrometric analysis, *Food Chemistry* 100: 396–404, 2007.
49. Kreck M, Püschel S, Wüst M, Mosandl A: Biogenetic studies in *Syringa vulgaris* L: Synthesis and bioconversion of deuterium-labeled precursors into lilac aldehydes and lilac alcohols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 463-469, 2003.
50. Wintoeh H, Morales A, Duque C, Schreier P: (R)-(-)-(E)-Dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol-6-O- β -D-glucopyranoside: Natural Precursor Hotrienol from Lulo Fruit (*Solanum vestissimum* D.) Peelings, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1311-1314, 1993