

# Analiza hlapljivih spojeva u procesu patvorenja meda pomoću javorovog sirupa, šećera i cvjetne peludi

---

**Klobučar, Dolores**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:167:563845>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA U PROCESU PATVORENJA MEDA  
POMOĆU JAVOROVOG SIRUPA, ŠEĆERA I CVJETNE PELUDI**

**DIPLOMSKI RAD**

**DOLORES KLOBUČAR**

**Matični broj: 343**

**Split, listopad 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**  
**SMJER MATERIJALI**

**ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA U PROCESU PATVORENJA MEDA  
POMOĆU JAVOROVOG SIRUPA, ŠEĆERA I CVJETNE PELUDI**

**DIPLOMSKI RAD**

**DOLORES KLOBUČAR**

**Matični broj: 343**

**Split, listopad 2023.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**ORIENTATION MATERIALS**

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IN THE PROCESS OF  
COUNTERFEITING HONEY USING MAPLE SYRUP, SUGAR AND  
FLOWER POLLEN**

**DIPLOMA THESIS**

**DOLORES KLOBUČAR**

**Parent number: 343**

**Split, October 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Diplomski studij Kemijske tehnologije: Materijali

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA U PROCESU PATVORENJA MEDA POMOĆU JAVOROVOG SIRUPA, ŠEĆERA I CVJETNE PELUDI DOLORES KLOBUČAR, 343

**Sažetak:** U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva u procesu patvorenja meda. Za analizu su uzeti uzorci cvjetne peludi, meda, javorovog sirupa, saharozne probe te smjesa cvjetne peludi i javorovog sirupa i smjesa cvjetne peludi i saharozne probe. Med i cvjetna pelud koji su bili osnova za istraživanje patvorenja uzeti su s područja Slavenskog Broda. Za patvorenje je korišten komercijalni javorov sirup i komercijalni šećer pomoću kojeg se u laboratoriju napravila saharozna proba. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog vlakna s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS). Dobiveni uzorci analizirani su vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Analizom patvorenog meda načinjenog od smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa te smjese cvjetne peludi i saharozne probe detektiran je niz spojeva koji su analizom detektirani i u medu.

**Ključne riječi:** pelud, med, hlapljivi spojevi, GC-MS, HS-SPME

**Rad sadrži:** 54 stranice, 21 sliku, 6 tablica, 34 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

1. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza
2. Dr. sc. Sanja Radman, znanstveni suradnik
3. Izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović

predsjednik  
član  
mentor

#### Datum obrane:

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate study Chemical Technology: Materials

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IN THE PROCESS OF COUNTERFEITING HONEY  
USING MAPLE SYRUP, SUGAR AND FLOWER POLLEN**  
DOLORES KLOBUČAR, 343

**Abstract:** In this study, the chemical composition of volatile compounds in the process of honey adulteration was analysed. Samples of flower pollen, honey, maple syrup, sucrose and a mixture of flower pollen and maple syrup and a mixture of flower pollen and sucrose were taken for the analysis. The honey and flower pollen, which formed the basis for the adulteration investigation, came from the Slavonski Brod region. Commercial maple syrup and commercial sugar were used for adulteration, and a sucrose sample was prepared in the laboratory. The volatile compounds were isolated by the solidphase microextraction method (HS-SPME), using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) coated fibre. The obtained samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). By analyzing the adulterated honey made from a mixture of flower pollen and maple syrup, as well as a mixture of flower pollen and sucrose, a series of compounds were detected that were also found in the honey analysis.

**Keywords:** pollen, honey, volatile compounds, adulteration of honey, GC-MS, HS-SPME

**Thesis contains:** 54 pages, 21 figures, 6 tables, 34 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:**

1. Danijela Skroza, PhD, Asst. Prof.	chair person
2. Sanja Radman PhD, junior researcher	member
3. Zvonimir Marijanović, PhD, Asst. Prof	supervisor

**Defence date:**

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od srpnja do listopada 2023. godine.*

*„Ja u čuda vjerujem. Posebno onda kada napravim sve što je u mojoj moći da se ona i dogode.“*

*Marko Babić*



## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva u uzorcima cvjetne peludi, poliflornog meda, javorovog sirupa, saharozne probe, smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa te smjese cvjetne peludi i saharozne probe koristeći metodu mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, kako bi se usporedio profil hlapljivih spojeva patvorenog meda i prirodnog meda.

U tu svrhu potrebno je:

- Izolirati hlapljive spojeve uzoraka metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, koristeći sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm
- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS).

## SAŽETAK

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva u procesu patvorenja meda. Za analizu su uzeti uzorci cvjetne peludi, meda, javorovog sirupa, saharozne probe te smjesa cvjetne peludi i javorovog sirupa i smjesa cvjetne peludi i saharozne probe. Med i cvjetna pelud koji su bili osnova za istraživanje patvorenja uzeti su s područja Slavenskog Broda. Za patvorenje je korišten komercijalni javorov sirup i komercijalni šećer pomoću kojeg se u laboratoriju napravila saharozna proba. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog vlakna s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS). Dobiveni uzorci analizirani su vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Analizom patvorenog meda načinjenog od smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa te smjese cvjetne peludi i saharozne probe detektiran je niz spojeva koji su analizom detektirani i u medu.

**Ključne riječi:** pelud, med, hlapljivi spojevi, patvorenje meda, GC-MS, HS-SPME

## **ABSTRACT**

In this study, the chemical composition of volatile compounds in the process of honey adulteration was analysed. Samples of flower pollen, honey, maple syrup, sucrose and a mixture of flower pollen and maple syrup and a mixture of flower pollen and sucrose were taken for the analysis. The honey and flower pollen, which formed the basis for the adulteration investigation, came from the Slavonski Brod region. Commercial maple syrup and commercial sugar were used for adulteration, and a sucrose sample was prepared in the laboratory. The volatile compounds were isolated by the solidphase microextraction method (HS-SPME), using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) coated fibre. The obtained samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). By analyzing the adulterated honey made from a mixture of flower pollen and maple syrup, as well as a mixture of flower pollen and sucrose, a series of compounds were detected that were also found in the honey analysis.

**Key words:** pollen, honey, volatile compounds, adulteration of honey, GC-MS, HS-SPME

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. PELUD .....	2
1.1.1. NASTANAK PELUDA .....	2
1.1.2. GRAĐA I OBLIK PELUDNOG ZRNA .....	3
1.2. MED .....	6
1.2.1. OPĆENITO O MEDU .....	6
1.2.2. VRSTE MEDA .....	6
1.2.2.1. NEKTARNI MED .....	7
1.2.2.2. MED MEDLJIKOVAC .....	8
1.2.2.3. MED PREMA NAČINU DOBIVANJA .....	9
1.2.3. KONTROLA BOTANIČKOG PODRIJETLA MEDA .....	10
1.2.4. KEMIJSKI SASTAV MEDA .....	12
1.2.5. SVOJSTVA MEDA .....	14
1.2.5.1. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA .....	14
1.2.5.1. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA .....	16
1.2.5.2. ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA MEDA .....	17
1.2.5.3. MANE MEDA .....	18
1.2.6. PATVORENJE MEDA .....	20
1.2.6.1. RECEPTURE ZA PROIZVODNJU UMJETNOG MEDA I NJIHOVE SPECIFIČNOSTI .....	21
1.3. METODA IZOLACIJE HLAPLJVIH SPOJEVA .....	22
1.3.1. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI .....	22
1.4. ANALIZA HLAPLJVIH SPOJEVA .....	24
1.4.1. PLINSKA KROMATOGRFIJA .....	24
1.4.2. SPEKTROMETRIJA MASA .....	26
1.4.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA .....	27
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	29
2.3. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU .....	30

2.4.	MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	33
2.5.	GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	35
3.	REZULTATI.....	37
4.	RASPRAVA .....	43
5.	ZAKLJUČAK .....	50
6.	KRATICE .....	51
7.	LITERATURA.....	52

## UVOD

Med je prirodna tvar koju pčele proizvode pomoću nektara iz bilja. Njegov najjednostavniji opis glasi : slatka, aromatična i viskozna tekućina. Gledano sa kemijskog stajališta njegova je definicija ipak malo kompliciranija. U tom slučaju ona može glasiti ovako: prirodna hrana čiji većinski udio u sastavu čine voda i različiti šećeri uz manji udio dodataka poput minerala, vitamina, aminokiselina, flavonoida te aromatičnih tvari.<sup>1</sup>

Popularnost meda seže još u davnine. Još davnih dana bilo je poznato njegovo svojstvo konzerviranja, ali prije svega njegova hranidbena i ljekovita svojstva. Med je svoju svrhu u prošlosti pronašao i u religijskim i magijskim obredima drevnih civilizacija kao i u humanoj i veterinarskoj medicini.

Sa prehranbenog stajališta med je jedna od najprobavljivijih i najiskoristivijih namirnica, a razlog za to je njegov sastav. Naime med se sastoji od jednostavnih ugljikohidrata koji se jako lako koriste za stvaranje energije, a njegov višak se lako pohranjuje u obliku glikogena. Med također sadrži i mnoge tvari sa ljekovitim učinkom. Takve tvari se nazivaju fitokemikalijama i najčešće podgrupe su flavonoidi i fenoli koji imaju antioksidacijsko djelovanje. Zahvaljujući fitokemikalijama med posjeduje brojna ljekovita djelovanja: poboljšava rad metaboličkog sustava, pomaže kod slabokrvnosti, poboljšava otpornost organizma pojačavajući imunološki sustav, djeluje antiseptično i poboljšava apsorpciju pojedinih tvari u organizmu te u konačnici djeluje poput sedativa i djeluje detoksikacijski na organizam.<sup>2</sup>

Neravnoteža između potražnje i ograničene dostupnosti meda visoke kvalitete dovodi do povećanja njegove cijene, a time i do pojave patvorenja meda. Med se patvori pomoću jeftinih zaslađivača poput kukuruznog sirupa, rižinog sirupa ili sirupa od invertnog šećera.<sup>3</sup> Patvorenje meda je postalo globalni problem zbog ekonomskih, komercijalnih i zdravstvenih implikacija. Utvrđeno je da je med treća najčešće patvorena namirnica poslije mlijeka i maslinova ulja.<sup>4</sup>

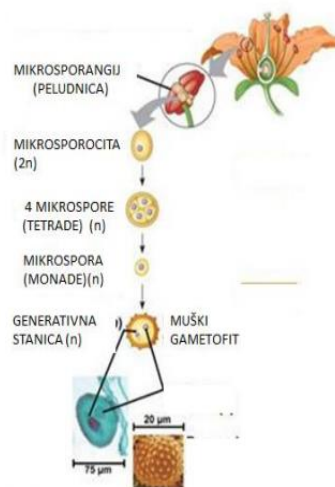
# 1. OPĆI DIO

## 1.1. PELUD

Ako se govori o jedinstvenim proizvodima prirode prva na listi će se vrlo često pronaći pelud. Pelud, odnosno bilje sa pčelama ima simbiotski odnos. Bilje proizvodi pelud koja sama po sebi za bilje ne znači puno ako nema pčela. Pčele sakupljaju pelud i time si osiguravaju hranu, dok je istovremeno prenose na drugu bilje i time potpomažu daljnji rast i rasprostranjivanje. Također potrebno je naglasiti da pelud nije pčelinji proizvod već su to jednostavno muške spolne stanice biljke.<sup>5</sup>

### 1.1.1. NASTANAK PELUDA

Pelud se sastoji od mnoštva peludnih zrnaca, a sam nastanak peluda se odvija u peludnicama prašnika. U početku razvoja peludnih zrnaca peludnice su ispunjene takozvanim arheosporijem, odnosno sporogenim staničjem koje je zaslužno za nastanak matičnih stanica peluda. Iz matičnih stanica procesom redukcijske diobe dolazi do konačnog nastanka peludnih zrnaca (slika 1). Prvotno su peludna zrnca vezana u tetrade koje se u daljnjem procesu raspadaju na monade ili pojedinačna zrnca. Naravno uvijek postoje iznimke pa tako pelud pojedinog bilja ostaje trajno u tetradama ili se vežu u poliade koje podrazumijevaju „pakiranje“ od 8, 16 ili 32 peludna zrnca.<sup>6</sup>



Slika 1. Nastajanje peludnog zrna<sup>7</sup>

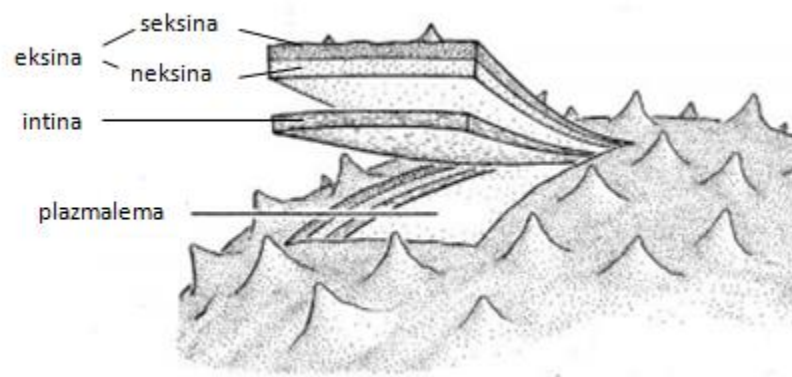
Podjela peludi prema botaničkom podrijetlu biva na anemofilnu i entomofilnu pelud. Glavna karakteristika anemofilne peludi je ta da je prenosi vjetar. Dakako kako bi ju vjetar mogao prenijeti takva vrsta peludi je sitna, glatka i suha, dok u kontekstu značaja za pčelinju zajednicu ova je pelud siromašnijeg kemijskog sastava i nije poželjna u pčelinjoj ishrani. U odnosu sa anemofilnom, entomofilnu pelud prenose kukci, a to se ostvaruje na način da je navedena pelud hrapava čime se lakše prihvaća za tijelo kukaca te je uz to i ljepljiva. <sup>6</sup>

### 1.1.2. GRAĐA I OBLIK PELUDNOG ZRNA

Veličina, oblik i boja su osobine koje potpomažu u identificiranju peludnih zrna. Karakteristike koje određuju peludno zrno su:

1. Broj, veličina i oblik mjesta klijanja (pore klijanja)
2. Građa, boja i oblik vanjske stjenke (eksina)
3. Građa i boja unutrašnjosti stjenke (intina) <sup>5</sup>

Osnovni dijelovi peludnog zrna su vanjski omotač te živi sadržaj u unutrašnjosti. Vanjski omotač se sastoji od dva sloja, vanjskog i unutarnjeg. Vanjski se još naziva eksina, dok je unutarnji intina (slika 2).



Slika 2. Shematski presjek stanične stjenke peludnog zrna <sup>8</sup>

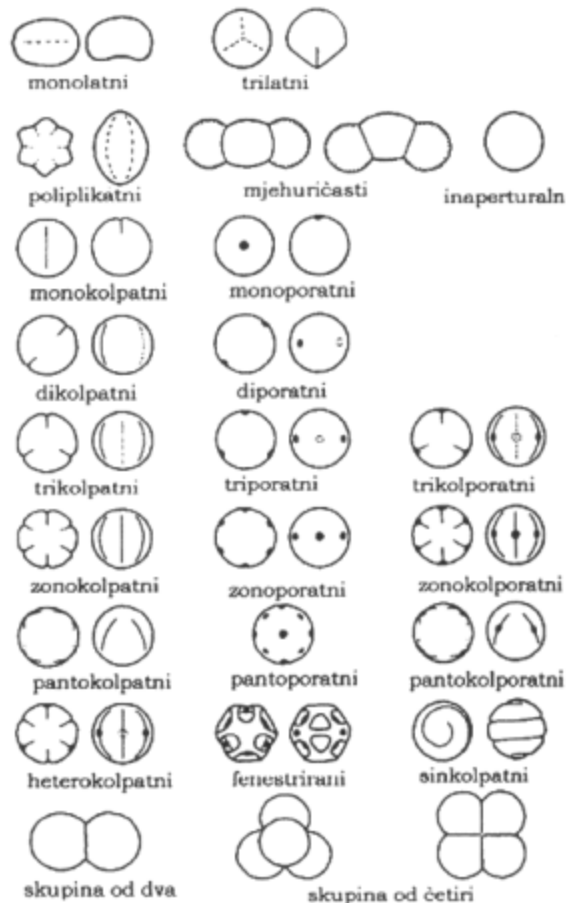


Daljnja podjela eksine se nastavlja na seksinu i neksinu, koji zajedno eksinu čine nepropusnom. Također seksina se ističe po tome što na sebi ima specifične strukturne dijelove koji pomažu peludi da lakše prione na kukce te je iz tog razloga krajnja vanjska opna peludi. Eksina je građena od sporopolenina, koji je veoma rijetka i kemijski otporna tvar, i ponešto polisaharida. Suprotno tome intina se sastoji od celuloze i pektina te je vrlo propusna. Zbog sveg navedenog vidljivo je da se eksina i intina nadopunjuju najbolje moguće. Eksina je zadužena za zaštitu peludnog zrna dok putuje do njuške tučka, ali joj ipak omogućuje da se željeni proces oprašivanja provede u potpunosti jer na sebi ima otvore u obliku izduženih ili okruglih pora koje omogućuju prolaz jezgre muških spolnih stanica do sjemenog zametka. Ukratko s obzirom na specifičnost pora, brazda i izraslina na eksini peludi koje ovise o vrsti bilja čijeg je pelud podrijetla, ovo je jedno od glavnih obilježja koji omogućuju identifikaciju peludi i njegovo botaničko podrijetlo (slika 3).<sup>9</sup>

Ovisno o biljnoj vrsti pelud se po veličini može znatno razlikovati, odnosno veličina peludi je u korelaciji sa biljem od kojeg pelud potječe. Sumarno, pelud se kreće između veličine od 5  $\mu\text{m}$  do 250  $\mu\text{m}$ . Kako je navedeni raspon poprilično velik pelud je prema veličini podijeljena u razrede:

1. Vrlo mala (<10  $\mu\text{m}$ )
2. Mala (10-24  $\mu\text{m}$ )
3. Srednja (25-49  $\mu\text{m}$ )
4. Velika (50-99  $\mu\text{m}$ )
5. Vrlo velika (100-200  $\mu\text{m}$ )
6. Gigantska (>200  $\mu\text{m}$ ) (pčele)

Veličina peludi kao i njen oblik usko su vezani sa načinom oprašivanja. Ako se oprašivanje provodi vjetrom peludna zrna su veoma mala i mnogobrojna kako bi oprašivanje bilo što lakše provedeno. Kad se oprašivanje provodi pomoću kukaca peludna zrna su ponešto veća i u manjem broju.<sup>6</sup>



Slika 3. Prikaz različitih tipova peludnih zrna s obzirom na broj, oblik i položaj<sup>6</sup>

Kod provođenja oprašivanja pčele posjećuju različite biljne vrste pa uz to što je pelud različitih veličina, ona je i različite boje. Pčele prvotno sakupljaju pelud sa biljaka na kojima kupe nektar, a onda u nedostatku istog idu na biljke koje oprašuje vjetar. Boja peludi varira od bijele, sive, preko različitih nijansa žute i narančaste do zelene pa čak do tamnoplave, smeđe i crne. Bijela pelud primjerice potječe od maline, a siva od kupine. Najčešća boja peludi je žuta ili narančasta i to različitog intenziteta. Pelud divljeg kestena tako bude crvene boje i to u nijansi opeke, dok marelica ima tamnocrvenu pelud. Heljda je zadužena za plavu boju peludi, a zelenu omogućuju lipa i glog. Za najtamniju boju peludi odnosno crnu zaslužan je mak. Unatoč navedenom boja peludi ipak može odstupati u ovisnosti od podvrsti bilja. Također boja može odstupati i zbog smjese različitih vrsta peludi kao i zbog vlage ili zbog tvari koje pčele dodaju prilikom sakupljanja ili skladištenja.<sup>9</sup>

## **1.2. MED**

### **1.2.1. OPĆENITO O MEDU**

Prvo sladilo koje su ljudi u prošlosti poznavali je med. Prolaskom vremena i razvojem poljoprivrede prvotno počinje uzgoj šećerne trske, a zatim i šećerne repe. Uzgojem navedenih kultura med gubi na važnosti u ljudskoj prehrani, ali ne zadugo. Vrlo brzo je otkriveno da med ima svojstva koje konzumni šećer ne može ostvariti. Također otkriveno je da se med može koristiti i u kozmetici, kao sredstvo za konzerviranje, a najvažnije od svega, otkriveno je da ima ljekovita svojstva.<sup>5</sup>

Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda med definira kao: „sladak, gust, viskozni, tekući ili kristalizirani proizvod što ga medonosne pčele proizvode od nektara cvjetova medonosnih biljaka ili od medne rose, koje pčele sakupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari i odlažu u stanice saća da sazrije“.<sup>10</sup>

Med je vrlo složena mješavina čija varijacija u sastavu i karakteristikama ovisi o geografskom i botaničkom podrijetlu, odnosno njegove glavne značajke ovise o nektaru kojim se pčele hrane. Sastav i kvaliteta meda također ovise i o okolišnim čimbenicima tijekom proizvodnje kao što su redom: vrijeme i vlaga unutar košnice, stanje nektara, tretiranje meda tijekom vađenja i skladištenja. Određeno je da med sadrži više od 180 vrsta kemijskih spojeva.<sup>2</sup>

### **1.2.2. VRSTE MEDA**

Razvrstavanje meda se provodi na dva načina, prema izvoru iz kojeg je dobiven i prema načinu na koji je dobiven. Prema izvoru med se dijeli na nektarni ili cvjetni te na medljikovac. U podjeli prema načinu dobivanja postoje sljedeće vrste meda: med u saću, med samotok, vrcani med, prešani med, topljeni med i kremasti med.<sup>11</sup>

### 1.2.2.1. NEKTARNI MED

Pčele nektarni med proizvode od nektara. Nektar je slatka tekućina koja nastaje u nektarijima što su prema ulozi, biljne žlijezde. Ovisno o položaju nektarija isti se dijele na cvjetne i izvancvjetne, a količinu izlučenog nektara definiraju dvije vrste čimbenika. Unutarnji čimbenici ovise o fizičkim svojstvima biljke kao što su veličina i faza razvoja cvijeta, veličina nektarija, položaj cvijeta, ali i sama vrsta i sorta biljke. Temperatura, vjetar, vlažnost zraka i doba dana pripadaju drugim, odnosno vanjskim čimbenicima. U konačnici najveća količina nektara se luči u vrijeme oprašivanja jer je osnovna uloga nektara privući kukce i nastaviti svoje daljnje rasprostranjivanje.<sup>11</sup>

Nektarni med također ima još jednu podjelu, podjelu na uniflorni i multiflorni. Kod uniflornog meda prevladava nektar jedne vrste, dok multifloran med sadrži nektare više vrsta biljaka. Premda se kaže unifloran med, takav je izrazito teško ostvariti. Odnosno bilo bi moguće ako bi postojalo naročito veliko područje na kojoj je samo jedna vrsta bilja. Iz tog razloga zakonski je definirano koliki udio peludnih zrna određene vrste, mora sadržavati med kako bi bio proglašen medom određene (jedne) biljne vrste. Primjerice kako bi med bio proglašen unifloran za lavandu (*Lavandula* sp.) mora sadržavati 20% peludnih zrna koji potječu od lavande. Nektarni med ima slabije izraženu boju te miris karakterističan za biljku sa koje je nektar sakupljen. Osim navedenog nektarni med je izrazito slađi od medljikovca.<sup>5</sup>

Gledano prema kemijskom sastavu, nektarni med, je vodena otopina različitih vrsta šećera. Saharoza, glukoza i fruktoza su šećeri koji čine većinski udio šećera u nektarnom medu. Ovisno o vrsti meda, isti može sadržavati određene oligosharide kao što su rafinoza, melecitoza ili melebioza. U kojem odnosu se nalaze navedeni šećeri ovisi o vrsti biljke, klimatskim ili zemljišnim uvjetima. Osim prethodno navedenih šećera, med može sadržavati i spojeve kao što su: dušikovi i fosforni spojevi, organske kiseline, vitamini, enzimi, aminokiseline, pigmenti i aromatski spojevi.<sup>11</sup>

### 1.2.2.2. MED MEDLJKOVAC

Drugi naziv za medljikovac je medna rosa. Medljikovac je slatka tvar koja nastaje u povoljnim godinama na listovima i ostalim dijelovima crnogoričnog i bjelogoričnog drveća. Najčešće biljne vrste na kojima medljikovac nastaje su jela, smreka, bor i ariš iz porodice crnogoričnog drveća te hrast, bukva, lipa i vrba kao predstavnici bjelogoričnog bilja.<sup>5</sup>

Za medljikovac je bitno naglasiti da je on proizvod kukaca iz porodice jednokrila, kao što su lisne i štitaste uši, ali i medeći cvrčak (*Metcalfa pruinosa* Say). Jednokrilci biljkama sišu sokove uz pomoć rila koje je relativno tanko i dugačko te uz pomoć njega prodiru kroz biljno tkivo. Rilo djeluje dvosmjerno odnosno u jednom smjeru se izvlače sokovi, dok u drugom kukci ispuštaju svoju slinu koja se stvrdne i na površini ubodenog mjesta stvara cijev. Kukci izvučene sokove iskorištavaju te ih više ili manje prerađene, ispuštaju kroz analni otvor u obliku kapljica koje padaju na tlo ili se nakupljaju na biljci.

Uvidom u kemijski sastav dokazano je da medljikovac sadrži 10 do 30% suhe tvari koju većinskim dijelom čine ugljikohidrati (5-20%) te u manjim postocima pepeo, bjelančevine, enzimi, vitamini i organske kiseline. Odnosno kako je ljepljivost jedno od izrazitih svojstava medljikovca, u njegovom sedimentu se iz tog razloga nalaze peludna zrnca bilja koje se oprašuje vjetrom kao i spore gljiva i algi.<sup>7</sup>

Usporedno sa nektarnim medom, medljikovac ima veći udio mineralnih tvari kao i veću obojenost. Okusom je manje sladak od nektarnog meda iako ima manji udio viših šećera kao što je primjerice melecitoza.<sup>5</sup>

### 1.2.2.3. MED PREMA NAČINU DOBIVANJA

Primarni način dobivanja meda bio je cijedenjem i muljanjem. Saće sa medom se izreže na dijelove, stavi na sito te se pusti da med iscure djelovanjem gravitacije. Ako se saće sa medom stavi u platnenu vreću te se na neki način provede tiještenje dobiva se muljani med. Razlika ova dva načina dobivanja meda je u tome što je med dobiven muljanjem mutan i neugodna mirisa zbog čega ima i nižu cijenu. Gledano sa zdravstvenog stajališta med dobiven muljanjem je bogatiji iz razloga što u sebi sadrži i pelud.

Napretkom civilizacije nalaze se novi način proizvodnje meda, pa danas poznajemo i način dobivanja meda vrcaljkom. Med se u ovom slučaju stavlja u vrcaljku gdje se vrca. Dobiveni med je identičan onom dobivenom cijedenjem, ali se specifično naziva vrcani med. Kao i cijedeni med, na tržištu je i dalje skuplji i više tražen od muljanog.

Prethodno navedeni načini dobivanja meda su najpoznatiji, ali na tržištu je moguće pronaći i med u saću (slika 4). U tom slučaju saće sa medom se samo izreže i pakira u celofan pri čemu se naravno bira ono oku privlačnije i bjelje saće.<sup>12</sup>



Slika 4. Prikaz meda različitih oblika<sup>13</sup>

### 1.2.3. KONTROLA BOTANIČKOG PODRIJETLA MEDA

Faktori koji utječu na udio nektara i medljike pojedine vrste u medu su: tip vegetacije, razdoblje cvatnje biljne vrste kao i razdoblje proizvodnje medljike, vrijeme kad je pčelar proizveo med. Kao što je već rečeno potpuno uniflorni medovi ne postoje jer pčele lutaju tokom svoje ispaše i nikad ne biraju samo jednu vrstu bilja. Iz tog razloga senzorska svojstva kao i kemijski sastav meda izuzetno variraju. Kako bi se odredilo botaničko podrijetlo meda provode se melisopalinološka (peludna) analiza uz organoleptičku kao i neke fizikalno-kemijske analize. Razlog za to je činjenica da se točni rezultati mogu dobiti samo iz skupnog rezultata navedenih analiza.<sup>5</sup>

Pod pojmom melisopalinologije podrazumijeva se grana palinologije koja je zadužena za proučavanje peluda i ostalih mikroskopskih elemenata koje je moguće pronaći u talogu meda. Talog meda naziv je koji označava netopivi dio meda dobiven centrifugiranjem. Primarno talog se sastoji od peludnih zrna i elemenata medljike, ali može sadržavati i druge elemente kao što su kristali, kvasci te ostale čestice koje nisu uobičajeni sastojci meda (biljni dijelovi i nečistoće).<sup>5</sup>

U procesu prikupljanja nektara pčele dolaze u doticaj sa dijelovima prašnika u kojem se nalazi pelud, takozvanim anterama. Na taj način peludna zrna završavaju u mednom mjehuru pčela te nakon prerade i u samom medu. S obzirom na građu cvijeta i položaj antera u odnosu na nektarije, sadržaj peluda u nektaru može varirati. Ako se antere nalaze iznad samih nektarija veća je vjerojatnost da će pelud upasti u nektar. Osim same građe cvijeta na količinu peluda u nektaru utječu količina proizvedenog peluda, dimenzija peluda, ali i blizina vremena sazrijevanja antera i izlučivanja nektara. Uz navedene utjecaje potrebno je uzet u obzir i činjenice da određene biljne vrste proizvode male količine peluda, ali i da poneke imaju sterilne prašnike. Sterilni prašnici nekih biljnih vrsta u potpunosti ne proizvode pelud, kao primjerice neki kultivari agruma. Količina peluda u nektaru, pa tako i u samom medu ovisi o biljnoj vrsti i opčelama. Pčele tokom sakupljanja nektara i prerade istog pelud izdvajaju u mednom mjehuru. Količina odstranjenog peluda ovisi o vremenu zadržavanja nektara u mednom mjehuru, veličini peluda, kao i o strukturi eksine peluda. Sumarno lakše se izdvajaju veća peludna zrnca te ona sa bodljikavom površinom. S obzirom na navedeno pelud se dijeli na: normalno zastupljenu, podzastupljenu i nadzastupljenu.<sup>5</sup>

Melisopalinološka analiza tradicionalna je metoda pomoću koje se određuje botaničko podrijetlo meda. Metoda se zasniva na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi, točnije na mikroskopskom pregledu peludi koja se nalaza u netopivom sedimentu meda. Sama metoda je u potpunosti definirana od strane International Commission for Bee Botany (ICBB) te je dio standardne analize u većini europskih laboratorija. Metoda se zasniva na relativnoj zastupljenosti različitih vrsta peludi. Prednost same metode je to što je kratkotrajna tj. procijenjeno vrijeme trajanje analize iznosi 30 do 60 min, ali sve ovisi o složenosti spektra peludi. Kao i svaka druga metoda i ova ima određene nedostatke. U slučaju nadzastupljenosti i podzastupljenosti potrebno je provesti i fizikalno-kemijska mjerenja kao i senzorsku procjenu. Također uvijek postoji mogućnost kontaminacije meda drugim vrstama peludi medonosnog bilja koji mogu utjecati na rezultate. Izvjesni problemi mogu se pojaviti i kod određenih vrsta meda kao što su med od kaučukovca, ricinusa ili pamuka jer se oni ne mogu identificirati analizom peludi.<sup>14</sup>

Osim melisopalinološke analize bitan segment analize je i određivanje fizikalno-kemijskih parametara. U fizikalno-kemijske parametre spadaju električna vodljivost, specifična rotacija i sastav šećera. Sastav šećera podrazumijeva određivanje spektra i postotka pojedinih šećera. Ponekad osim glukoze i fruktoze za određivanje botaničkog podrijetla meda mogu se određivati i udjeli vode i glukoze. Određivanje sastava šećera je standardan način analize, ali analiza se može provesti i preko određenih enzima kao što je dijastaza. Razlog za to je činjenica da neke vrste meda imaju prirodno visok ili nizak sadržaj navedenog enzima.<sup>5</sup>

Usprkos navedenim postupcima određivanja botaničkog podrijetla meda, posebno se izdvajaju određena ograničenja melisopalinološke analize zbog složenog kemijskog sastava meda. Kako bi se navedene metode poboljšale fokus je stavljen na metode kemijskog profiliranja sa ciljem određivanja specifičnih spojeva ili specifičnih kombinacija spojeva koji bi nam omogućili lakše određivanje podrijetla meda. Prednost ovakve vrste analize je u tome što omogućuje praćenje i identifikaciju kemikalija koje su izravno vezane za nektar iz kojeg je med dobiven.<sup>14</sup>



#### 1.2.4. KEMIJSKI SASTAV MEDA

Kako je već navedeno, med je koncentrirana otopina šećera glukoze i fruktoze uz primjese još 22 različita šećera. Sve najbitnije odlike meda potječu od šećera, dok se ostatak svojstava pripisuje mirisnim tvarima, kiselinama, pigmentima i mineralima. Tipičan sastav meda čine: 38,5% fruktoze, 31% glukoze, 17,1% vode, 7,2 % maltoze, 4,2% trisaharida i ostalih šećera, 1,5% saharoze, dok ostatak od 0,5% otpada na vitamine, minerale i enzime.<sup>5</sup>

Šećeri čine 95% suhe tvari u medu. Upravo navedena visoka koncentracija šećera utječe na određene fizikalne odlike meda kao što su primjerice viskoznost, gustoća, težnja kristalizaciji, higroskopnost ili biološka stabilnost. Službene podjele šećera se baziraju na veličini i kompleksnosti molekula koje čine njihov sastav. Najzastupljeniji šećeri u sastavu meda su fruktoza i glukoza i čine čak 90% od ukupne količine šećera. Oba spadaju u jednostavne šećere odnosno monosaharide i gradivne su jedinice složenih šećera. Fruktoza i glukoza čine specifičan omjer koji ima oznaku F/G te je karakterističan za određene vrste meda i u većini slučajeva veći od 1. Uz monosaharide u medu je pronađeno i 10 disaharida, 10 trisaharida i 2 polisaharida. Potrebno je naglasiti da se većina složenih šećera ne nalazi u nektaru već nastaju u procesu dozrijevanja ili skladištenja kao posljedica djelovanja pčelinjih enzima i kiselina u medu.<sup>5</sup>

Voda je po zastupljenosti u medu na drugom mjestu. Njen sadržaj utječe na čuvanje i kakvoću meda, dok je njen udio određen botaničkim podrijetlom, klimatskim uvjetima, intenzitetom izlučivanja nektara. Udio vode kreće se u intervalu od 14 do 20%, dok njena niža vrijednost može stvarati probleme prilikom vrcanja meda kao i tokom daljnje obrade. Prevelik udio vode utječe na poticanje fermentacije. Jedan od najočitijih fizikalnih svojstava na koje sadržaj vode utječe je gustoća pa se shodno tome gustoća mijenja u ovisnosti o vodi.<sup>11</sup>

Osim slatkoće, med posjeduje i kiselost. Organske kiseline koje se pronalaze u medu čine tek 0,5% suhe tvari, ali unatoč tome imaju veliku ulogu u regulaciji stabilnosti meda. Izvjesnu količinu vremena pretpostavljalo se da limunska kiselina čini glavninu kiselosti meda, međutim ustanovljeno je da se kiselost meda bazira na glukonskoj kiselini koja je posljedica djelovanja enzima glukoza oksidaze na glukozu.

Osim glukonske kiseline u istraživanjima je ustanovljeno da med sadrži i mliječnu i piroglutaminsku kiselinu. Navedene kiseline uglavnom utječu na okus, dok alifatske i aromatske kiseline, također prisutne u medu, više sudjeluju u mirisu meda i potpomažu otkriću botaničkog podrijetla meda.<sup>5</sup>

Kao i svi navedeni elementi koji čine sastav meda i udio minerala varira, a u prosjeku iznosi 0,17%. Obično tamniji medovi sadrže veći udio minerala u odnosu na svjetlije. Najčešći minerali u medu su: kalij, natrij, kalcij, magnezij, željezo. Iako je udio minerala u medu istaknutiji, sa vitaminima je suprotno. Vitamini se u medu nalaze u tragovima i većinski su to vitamini topivi u vodi poput vitamina B skupine i vitamina C. Smatra se da vitamini potječu iz peludnih zrnaca koji se pronalaze u medu.<sup>11</sup>

Enzimi su glavna tvar prema kojem se med razlikuje od ostalih sladila. Moguće ih je pronaći i u peludu i u nektaru, ali većinski potječu od pčela na način da ih one dodaju u procesu pretvaranja nektara u med. Prema definiciji enzimi su bjelančevinaste tvorevine koje u specifičnim uvjetima i u niskom udjelu potiču kemijske reakcije. Premda se enzimi u medu nalaze u malom udjelu oni su i dalje veoma neotporni prema okolnim uvjetima kao što su toplina, UV zračenje, ali i prema svim ostalim oblicima energije. Najvažniji enzimi su invertaza, dijastaza i glukoza oksidaza. Invertazu u med unose pčele prilikom obrade nektara. Njen zadatak je razlaganje saharoze na osnovne gradivne jedinice. Rad invertaze prestaje sa sazrijevanjem meda, ali se ona i dalje zadržava u medu i održava svoju aktivnost određeni dio vremena. Upravo aktivnost ovog enzima pokazuje kakvoću, stupanj zagrijavanja i čuvanja meda. Dijastaza ili drugim imenom amilaza, važan je enzim koji ima veliku ulogu u analitici meda. Posljednji od navedenih enzima je glukoza oksidaza koja je bitna u procesu nastanka meda. Izvor ovog enzima su pčele i to njihove podždrijelne žlijezde, a dodaju ga u procesu sazrijevanja nektara. Zbog ovog enzima med posjeduje kiselost odnosno glukoza oksidaza oksidira male količine glukoze pri čemu dolazi do nastanka glukonolaktone koji dalje stvara glukonsku kiselinu. Osim navedenog u ovoj reakciji nastaje i vodikov peroksid čijom razgradnjom nastaje voda i slobodni kisik koji ima baktericidna svojstva.<sup>11</sup>

Jedina tvar kojom med ne obiluje su dušične tvari. Njih je u medu moguće pronaći samo u obliku slobodnih aminokiselina i bjelančevina. Bjelančevine mogu imati različito podrijetlo, točnije dijelom mogu već biti prisutne u nektaru i medljici ili su

posljedica peludi prisutne u medu. Aminokiseline su tvari koje se dobivaju cijepanjem bjelančevina koje može biti uzrokovano kemijskim ili probavnim procesima. Premda su aminokiseline esencijalne tvari za život njihova količina u medu je vrlo mala i nije nutricionistički važna. Najznačajnije aminokiseline koje je moguće pronaći u medu su: prolin, glutaminska kiselina i alanin.<sup>5</sup>

Hidroksimetilfurfural je spoj specifičan za med, a nastaje pri zagrijavanju monosaharida. U reakciji zagrijavanja monosaharida dolazi do otpuštanja vode i nastanka prstenaste molekule 5-hidroksimetilfurfurala koja se dalje razlaže na levulinsku i mravlju kiselinu. U svježem medu njegova je količina minorna, dok u slučaju dugotrajnog čuvanja i zagrijavanja njegova se količina povećava te je iz tog razloga glavni pokazatelj oštećenja meda.<sup>11</sup>

## **1.2.5. SVOJSTVA MEDA**

### **1.2.5.1. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA**

Jedno od najizraženijih fizikalnih svojstava meda je kristalizacija. Obzirom da je med prezasićena otopina sa udjelom šećera većim od 70% u odnosu na vodu do pojave kristalizacije dolazi zbog spontanog taloženja šećera. Taloženje je posljedica gubitka vode u glukozi zbog čega ona prelazi u kristalni oblik. Bitna stavka vezana za kristalizaciju je omjer glukoza/voda, ako je taj omjer manji od 1,7 med je više sklon održavanju tekućeg oblika, ali kad isti prijeđe 2,1 kristalizacija je brža. Također na brzinu kristalizacije utječe i omjer glukoze i fruktoze. Ukoliko je udio glukoze veći kristalizacija je brža sa manjim i pravilnijim kristalima. Proces kristalizacije može i prirodno biti potaknut česticama peludi, dijelovima voska ili zračnim mjehurićima u medu. Najčešći vremenski period u kojem dolazi do kristalizacije je par mjeseci. Kako bi se navedeni proces spriječio med je preporučljivo držati na temperaturi ispod 5 °C. Razlog za tu temperaturu je činjenica da je kristalizacija najbrža pri temperaturi od 14 °C, dok se pri temperaturi od 25 °C sam proces usporava i zaustavlja te na samom kraju pri 30 °C dolazi do dekrystalizacije.<sup>12</sup>

Prema općenitoj definiciji viskoznost je otpor koji tvar pruža prema izlivanju. Kao i sva fizikalna svojstva viskoznost uvelike ovisi o sastavu. Prvotna tvar koja je bitna u sastavu je sadržaj vode. Samim time što je udio vode manji, a relativna gustoća veća time je viskoznost veća. Osim vode viskoznost određuju i količina i odnos monosaharida i oligosaharida kao i udio bjelančevina. Iz navedenih utjecaja može se dogoditi da dva meda imaju istu viskoznost iako imaju različite sastave. Na viskoznost veliki utjecaj ima i temperatura, točnije što je temperatura veća to je viskoznost manja. Viskoznost ponekad stvara probleme, osobito kod vrcanja meda jer tijekom ovog procesa prilično velika količina meda zaostaje na stjenkama te ne taj način uzrokuje ekonomske gubitke.<sup>11</sup>

Jedna od odlika meda je i ta da med provodi struju. Provođenje struje se izražava pomoću jedinice mS/cm odnosno milisiemens po centimetru. Med provodi struju jer sadrži disocirane kiseline i minerale u ionskom obliku. Vrijednosti električne provodnosti meda mogu prilično varirati ovisno o botaničkom podrijetlu meda, ali pretežito se nalaze u području između 0,06 i 2,17 mS/cm.<sup>5</sup>

Kako je već rečeno med se sastoji od različitih vrsta šećera, a s obzirom na šećere ima svojstvo skretanja ravnine polarizirane svjetlosti. Poznato je da fruktoza izaziva skretanje polarizirane svjetlosti ulijevo, a glukoza kao i svi drugi oligosaharidi udesno. Iz navedenih razloga ovo svojstvo se koristi u analitici za razlučivanje nektarnog meda od medljikovca. Medljikovac zbog većeg udjela melecitoze i erloze, koji spadaju u oligosaharide, ima pozitivnu optičku aktivnost tj. zakreće svjetlost u desno.<sup>11</sup>

Još jedno od fizikalnih svojstava meda je higroskopnost. Prema definiciji higroskopnost je svojstvo tvari da apsorbira vlagu iz zraka. Ovisno o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode u sastavu meda, med može apsorbirati ili izlučivati vlagu. Kritični udio vlage u skladišnom prostoru iznosi 60%, odnosno ako je vlažnost iznad navedenog med će apsorbirati vlagu, dok će je u suprotnom otpuštati. Kao posljedica povećanja vlage može doći do fermentacije. Budući da higroskopnost ovisi uvelike o koncentraciji šećera, naročito o fruktozi, ona se razlikuje od meda do meda.<sup>12</sup>

### 1.2.5.1. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

Boja meda se kreće od bezbojne, preko različitih nijansa žute do tamno smeđe boje. Boja je izrazito vezana za okus pa često bezbojan med ima blagi okus, dok taman med ima oštriji okus i jaču aromu. Boja meda potječe od karotenoidima, skupine pigmenata crvene i žute boje. Utjecaj na boju ima i zagrijavanje i dugo vrijeme čuvanja. Ukoliko se med zagrijava na 80 °C ili se čuva duže vremena on potamni. Boja meda se također mijenja i procesom kristalizacije, pri čemu med postaje svjetliji. Dodatno, utjecaj na boju ima i veličina kristala pa tako sitniji kristali daju svjetliju boju (slika 5).<sup>5</sup>



Slika 5. Prikaz različitosti boja meda<sup>16</sup>

Vrsta meda se najčešće i najlakše raspoznaje pomoću mirisa i arome koji potječu iz aromatičnih tvari nektara. Određene tvari posjeduju sve vrste meda dok pojedine potječu od specifičnog bilja te na taj način djeluju na posebnost određenih vrsta meda. Zajedničko svojstvo svih aromatičnih tvari je hlapivost zbog čega se ove tvari gube zagrijavanjem. Značajna temperatura u ovom slučaju je 35 °C jer je to temperatura unutar košnice. Iz navedenog razloga svako zagrijavanje iznad te temperature uzrokuje hlapljenje arome. Zasad je utvrđeno preko 200 aromatičnih spojeva koji su prema svom sastavu najčešće ugljikovodici, alkoholi, aldehidi i ketoni.<sup>5</sup>

S obzirom da je med prehrambena namirnica i da se uzima oralno okus je čak najbitnije organoleptičko svojstvo. Isti se mijenja ovisno o biljnoj vrsti i šećerima koje sadrži te sadržaju kiselina. Prema društvenoj definiciji med je slatkog okusa. Sladak je zato što se sastoji od šećera, a naročito fruktoze koja je dva i pol puta slađa od glukoze, a jedan i pol od saharoze. Kako se omjeri šećera u medu mijenjaju tako se mijenja i njegov okus. Na okus još utječu i mineralne i aromatične tvari, potom organske kiseline

i bjelančevine te se na taj način upotpunjuje okus meda. Med koji ima gorak i trpak okus najčešće je kestenov med, dok se po svom specifičnom okusu ističu med od lipe, lavande i citrusa. Kako je već navedeno kod mirisa, i ovdje temperatura ima utjecaja, odnosno prekomjerno izlaganje meda visokoj temperaturi ima negativan utjecaj.<sup>12</sup>

#### **1.2.5.2. ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA MEDA**

Antibakterijsko djelovanje meda temelji se na osmotskom efektu, kiselosti, vodikovom peroksidu i fitokemijskim čimbenicima.

Prema brojnim definicijama, med se smatra zasićenom ili prezasićenom otopinom šećera zbog čega vladaju jake interakcije između molekula vode i šećera, pa tako malo vode ostaje na raspolaganju za druge interakcije, naročito za mikroorganizme. Aktivitet vode meda ima vrijednost od 0,56 do 0,62 što posebno ide u prilog kad je riječ o bakterijama za koje je poznato da rastu pri većem iznosu aktiviteta vode (0,94-0,99). Navedeno djelovanje meda na bakterije posljedica je osmotskog efekta. Ako se osvrne na gljive, one mogu podnijeti i niže vrijednosti sadržaja aktiviteta vode te je iz tog razloga za zaustavljanje njihovog rasta potrebno uključiti i druge čimbenike koji utječu na antibakterijsko djelovanje.<sup>15</sup>

Za antibakterijsko djelovanje zaslužna je i kiselost meda, odnosno njegov pH se kreće između 3,2 i 4,5. Inhibitor za većinu patogena je nizak pH pa je tako primjerice za bakteriju *Escherichia coli* 4,3 dok je za bakteriju *Salmonella* sp. 4,0. Protubakterijsko djelovanje meda se pripisuje vodikovom peroksidu koji nastaje kao sporedni spoj djelovanja glukoza oksidaze i glukonske kiseline. Osim vodikovog peroksida u medu je potvrđena prisutnost fitokemikalija, biološki aktivnih molekula koje također imaju antibakterijsko djelovanje. Ustanovljeno da suncokretov med sadrži flavonoide, a pronađeni su sljedeći: pinocembrin, pinobanksin, hrisin, tektohrisin, kempferol i galangin. Pinocembrin je pronađen još i u uzorcima nektarnog meda kao i u medljikovcu i to u razini od 2 do 3 ppm.<sup>5</sup>

Smatra se da osim koncentracije vodikova peroksida i djelovanja fitokemikalija, na antibakterijsko djelovanje utječe i biljna vrsta od koje potječe med. Tako npr. enzim katalaza utječe na razaranje vodikova peroksida, a nalazi se u peludu i nektaru

određenih biljnih vrsta pa medovi sa visokom razinom katalaze imaju nisku razinu vodikova peroksida. Na antibakterijsko djelovanje meda utjecaj imaju još i tehnološki procesi dorade meda, uvjeti skladištenja i svjetlost.

Drugo važno biološko svojstvo uz antibakterijsko djelovanje je antioksidacijsko djelovanje. Antioksidansi djeluju na način da reagiraju sa slobodnim radikalima te zaustavljaju cijeli niz reakcija koje bi inače dovele do oksidacijskog oštećenja. Najistaknutiji spojevi meda sa antioksidacijskim djelovanjem su polifenoli, a najzastupljeniji od navedenih su flavonoidi. Iako uz navedene polifenole antioksidacijsko djelovanje imaju još i spojevi kao što su: enzimi, karotenoidi, vitamin C i drugi, na ukupno antioksidacijsko djelovanje meda ipak najveći utjecaj ima količina polifenola. Zanimljivo je napomenuti da se antioksidacijsko djelovanje meda nalazi u korelaciji sa bojom meda, točnije što je med tamniji to ima jača antioksidacijska svojstva.<sup>5</sup>

### **1.2.5.3. MANE MEDA**

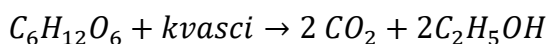
Odvajanje meda u slojeve i nejednolika kristalizacija meda su negativne promjene koje spadaju u zajedničku skupinu pod nazivom mane kristalizacije. Odvajanje meda događa se kod medova sa labilnom kristalnom strukturom. U procesu razdvajanja kristali se spuštaju na dno dok na površini ostaje tekući sloj koji je sklon fermentaciji zbog suviška vode. Na početku je tekući sloj tanak dok vremenom postaje sve deblji. Ova pojava je uobičajena kod medova sa povećanim udjelom vlage, ali se može pojaviti i kod onih sa normalnim udjelom vlage ako su predugo skladišteni ili nisu skladišteni na optimalnoj temperaturi (slika 6). Ovom pojavom opada kvaliteta meda i vizualno med nije privlačan. Svaki med je osuđen na ovaj proces, samo je upitan vremenski period u kojem će se isti odviti. Ako se vrijeme kristalizacije odulji dolazi do nastanka nejednolike kristalizacije. U ovom slučaju nastali kristali bivaju nepravilni, hrapavi i oštri. Prvotni razlog za ovaj proces je činjenica da med ima previše vode ili je siromašan glukozom. Također razlog ovog proces može biti čuvanje na neprikladnoj temperaturi ili ako dođe do prethodne potpune dekrystalizacije kojom su uklonjene sve jezgre kristalizacije.<sup>12</sup>



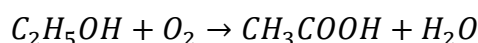
Slika 6. Prikaz različito kristaliziranih slojeva meda

Ponekad ako kristalizacija meda nije homogena može doći i do nastanka bijelih prevlaka kao posljedica nedovoljno istaloženog meda. Uslijed svega u medu ostaju zarobljeni mjehurići zraka koji mogu izbiti na površinu ili na stjenku tegle. Također bijele mrlje se mogu pojaviti i kod meda sa kompaktnom kristalnom strukturom. Osim na stjenkama tegle bijele mrlje se mogu protezati i u unutrašnjost meda što se očituje kao mramorni izgled. Opisane mrlje nemaju utjecaj na kvalitetu meda jer zagrijavanjem na temperaturu do 40 °C mrlje nestaju, ali imaju utjecaj na njegovu privlačnost ljudskom oku.<sup>5</sup>

Iduća na listi mana meda je njegova fermentacija. Fermentaciju izazivaju šećerno-tolerantni kvasci čiji su izvor cvijeće i tlo. Analizom je utvrđeno da tlo oko košnica, kao i uređaji u vrcaoni, mogu biti kontaminirani kvascima. Također potencijalni izvor kvasaca je i saće u košnici i to osobito ono koje sadrži med od prošle sezone. Svojstva ovih kvasaca je da su otporni na visoku razinu šećera, a u procesu fermentacije daju alkohol i ugljikov dioksid:



Nastali alkohol potom u prisutnosti kisika prelazi u octenu kiselinu i vodu:



Kao posljedica ovih dviju reakcija je kiseli okus meda. Procesu fermentacije uvijek je od „pomoći“ kristalizacija, jer kristalizacijom meda dolazi do oslobodjenja molekula vode koje povećavaju sadržaj vlage. Ustanovljeno je i da malo povećanje vlage može uvelike povećati sklonost fermentaciji.<sup>5,12</sup>



### 1.2.6. PATVORENJE MEDA

EMA, ili u produženoj hrvatskoj verziji: ekonomski motivirano krivotvorenje, je počinjeno svaki put kada netko namjerno izostavi, ukloni ili zamijeni vrijedan sastojak ili dio hrane. U istu kategoriju spadaju i djela u kojima netko dodaje tvari u hranu te joj na taj način mijenja svojstva. U skladu sa temom primjer za to je kad se u med dodaju različita sladila, a isti se prodaje kao 100% čisti med. Problem patvorenja meta je toliko uznapredovao da je trenutno treći na listi problema prijevara sa hranom. Osim što je patvorenje meda etički i trgovačko-ekonomski problem određene studije su pokazale da postoji i mogućnost štetnih učinaka na zdravlje kao što su: povećana razina šećera u krvi, oslobađanje hormona inzulina i dijabetes tipa II, pretilost i povišeni krvni tlak.<sup>4</sup>

Razlog zbog kojeg se sve više javlja patvorenje meda je pojava neravnoteže između potražnje i ograničene dostupnosti visokokvalitetnog meda što je dovelo do povećanja njegove cijene. Patvorenje meda se provodi na dva načina. Prvi način je da se med „razrjeđuje“ vodom ili se dodaju različita sladila. Dru način patvorenja meda je pomoću jeftinih zaslađivača kao što su kukuruzni sirup i sirup sa visokim udjelom fruktoze, sirup od invertnog šećera, rižin sirup kao i javorov sirup. Pčele u kontroliranim uvjetima mogu dobivati dodatnu ishranu osim samog biljnog nektara, odnosno daju im se određena sladila. Ali ako se pčele hrane šećernom pastom u vrijeme ispaše, također se i to računa kao patvorenje meda.<sup>1,5</sup>

U početku je patvoreni med bilo prilično lako identificirati pomoć običnih analiza, no nakon upotrebe visoko fruktoznog kukuruznog sirupa, koji je po svom sastavu veoma sličan medu, potrebno je bilo inovirati metode određivanja ispravnosti meda.<sup>5</sup> Nove metode su tako temelje na korištenju višestrukih analitičkih tehnika od kojih se najčešće koriste: tankoslojna kromatografija, plinska kromatografija s fotoionizacijskim detektorom (GC-FID) ili u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GC-MS), tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC), infracrvena spektroskopija sa Furierovom transformacijom (FTIR).<sup>4</sup>

### 1.2.6.1. RECEPTURE ZA PROIZVODNJU UMJETNOG MEDA I NJIHOVE SPECIFIČNOSTI

Najjednostavniji način patvorenja meda je da se uobičajeni šećer otopi u vodi i pomiješa sa medom. Na kraju se dobije gust sirup kojim se u pravilu poveća količina meda. Umjesto otapanja šećera moguće je uzeti i glukozni sirup. Med dobiven na ova dva načina lako je otkriti pomoću polariskopa. Običan med je optički lijevo aktivan. Ako se medu doda otopina šećera polarizacija skreće udesno te lako otkriva umjetno proizveden med.<sup>12</sup>

Za falsificiranje meda moguće je upotrijebiti i invertni šećer. Invertni šećer kao šećere sadrži i glukozu i fruktozu, isto kao i saharozu. Razlika saharoze i invertnog šećera je u tom što je invertni šećer ljepljiv poput meda i higroskopan. Osim toga invertni šećer je slađi od saharoze pa ima čestu upotrebu u slastičarskoj industriji. Gledano sa kemijskog stajališta saharozu ima vezu između glukoze i fruktoze, dok invertni šećer nema. Kod njega je to samo mješavina glukoze i fruktoze koja nema kemijskih veza.<sup>17</sup> Otkrivanje korištenja invertnog šećera se provodi pomoću kemikalije koja se naziva anilinski klorid. U reakciji sa tom kemikalijom prirodni med ne mijenja boju dok onaj načinjen pomoću invertnog šećera poprimi crvenu boju.<sup>12</sup>

Med se danas krivotvori i uz pomoć priličnog broja sirupa. Jedan od mogućih sirupa je i javorov sirup. Glavna sličnost meda i javorova sirupa je u tome što su oba sačinjeni od šećera. Med je prvenstveno sačinjen od fruktoze, glukoza i ponešto saharoze. Slijed šećera u javorovom sirupu je saharozu sa malim udjelom glukoze i fruktoze. Nutritivno gledano oboje imaju slične vrijednosti. Također bitno je u svemu razlikovati i pravi, prirodni javorov sirup od onog dobivenog umjetno. Umjetni javorov sirup je samo kukuruzni sirup sa visokim udjelom fruktoze i ponešto bojila. Najjednostavniji recept za patvorenje meda na ovaj način je u suštini samo miješanje istih gdje je potrebno skrenuti pozornost na okuse jer dok med u većini ima cvjetnu aromu javorov sirup ipak biva slađi i ima više drvenasti okus.<sup>18</sup>

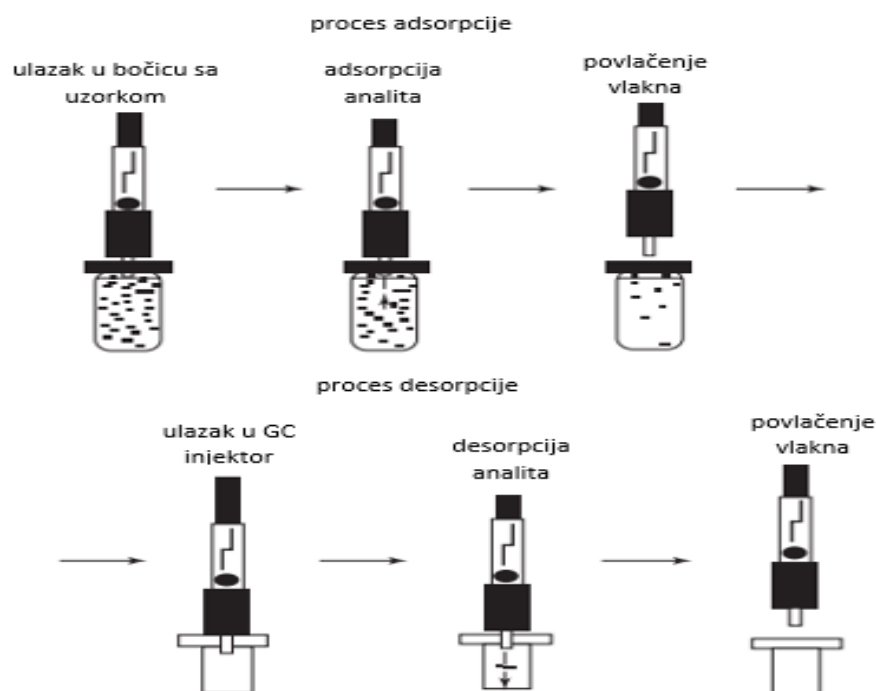
Ako se krene od patvorenja u samoj košnici to je najčešće obilna prihrana pčela šećernim sirupima. Pčele uzeti šećer invertiraju i spremaju u saće. Analitički se takav med lako raspoznaje zbog neuobičajeno velikog udjela saharoze, ili zbog neimanja minerala svojstvenih medu.<sup>12</sup>

### 1.3. METODA IZOLACIJE HLAPLJVIH SPOJEVA

Svaka analitička metoda se sastoji od 5 glavnih koraka: uzorkovanja, pripreme uzorka, izolacije željenih spjeva, detekcije odnosno karakterizacije i analize dobivenih rezultata. Priprema uzorka se provodi na različite načine, a najčešće obuhvaća procese poput: izolacije iz matrice, predkoncentriranja ili koncentriranja te frakcioniranje. Prednost današnjih metoda analize je u tome što mogu osigurati odvajanje visoke razlučivosti pri vrlo niskim granicama detekcije uz uvjet da se uzorak pripremi odgovarajućim i učinkovitim metodama. Naravno u svemu treba uzeti u obzir da se čak 80% vremena potrebnog za analizu uzorka troši upravo na samu pripremu uzorka jer većina analitičke opreme ne može izravno obraditi matricu uzorka. Cilj svake analize je doći do rezultata, ali je istovremeno potrebno osigurati ponovljivost, točnost kao i selektivnost rezultata te uz to financijske troškove kao i uloženo vrijeme svesti na minimum. Kako bi se sve navedeno ostvarilo definitivno je bitno dobro odabrati metodu pripreme kao i metodu analize uzorka. Ukupni rezultat dobro provedenih metoda završava time da je moguće iz izrazito složenih uzoraka detektirati hlapljive, poluhlapljive i nehlapljive spojeve unatoč njihovim niskim granicama detekcije.<sup>19</sup>

#### 1.3.1. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI

SPME ili točnom definicijom mikroekstrakcija na krutoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*) je jednostavna, brzina i učinkovita metoda za analizu meda koja uz sve navedeno također ne koristi otapala.<sup>25</sup> Kao dodatne karakteristike ističe se i činjenica da metoda štedi vrijeme pripreme uzorka, da su troškovi kupnje i zbrinjavanja otapala gotovo nepostojeći te poboljšava granice detekcije. Metodu su 1990. godine razvili Pawliszyn i suradnici. Mikroekstrakcija na krutoj fazi se rutinski koristi u kombinaciji sa vezanom tehnikom plinske kromatografije – spektrometrije masa (engl. *gas chromatography- mass spectrometry, GC-MS*). Metoda se uspješno primjenjuje za detekciju širokog raspona spojeva, a naročito za ekstrakciju hlapljivih i poluhlapljivih organskih spojeva iz okoliša kao i bioloških uzoraka i uzoraka hrane.<sup>20</sup>



Slika 7. Prikaz mikroekstrakcije na krutoj fazi <sup>22</sup>

Mikroekstrakcija na krutoj fazi se općenito može svesti na tri koraka: adsorpcija otopljenih tvari iz matrice uzorka na sloj adsorpcijskog materijala na vlaknu, postizanje ravnoteže adsorbiranih tvari i prevlake vlakna te prijenos analita u kromatografski ulazni sustav plinovitim ili tekućim putem (slika 7). Upravo tehnika adsorpcije/desorpcije eliminira potrebu za otapalima i kompliciranom aparaturom. Osnovi koncept mikroekstrakcije na krutoj fazi počiva na ideji o uronjenoj koloni za plinsku kromatografiju. Ukratko uređaj za mikroekstrakciju na krutoj fazi je vrlo jednostavan. Zasniva se na ideji modificirane štrcaljke koja je sačinjena od nosača, igle i sklopa vlakana, pri čemu je vlakno izvlačivo centimetar ili dva. SPME vlakno je vrlo tanko, modificirano optičko vlakno koje je načinjeno od taljenog silicijevog dioksida te potom obloženo sa tankim polimernim filmom. Svrha polimernog filma je izolacija i koncentriranje organskih spojeva koji se istražuju. Najbitnija stavka u svemu je odabrati valjanu vrstu polimernog filma jer se ona bira na temelju kemijskih svojstava kao što je polaritet analita. Najčešći polimerni film je polidimetiloksan (PDMS), nepolaran spoj koji je pogodan za analizu nepolarnih spojeva te ima široku primjenu u analizi okoliša. Suprotno od polimetiloksana je poliakrilat (PA), koji se koristi za analizu polarnih spojeva pa se tako najčešće koristi za opću upotrebu i ekstrakciju fenola. Selektivnost

vlakna ovisi o vrsti polimernog filma, ali i o debljini filma. Hlapljive otopljene tvari zahtijevaju deblji film, dok je poluhlapljivim spojevima potreban tanji film.<sup>19</sup> Prilikom analize iglom se prolazi kroz tanku opnu na vrhu zatvorene bočice sa uzorkom. Potom se pomoću nosača djeluje na vlakno koje se izvlači u bočicu sa uzorkom. Vlakno biva izloženo uzorku u razdoblju od 2 do 30 min pri čemu dolazi do adsorpcije odnosno do uspostave ravnoteže između analita i prevlake na vlaknu. Slijedi uvlačenje vlakna pomoću nosača te se igla uvodi u GC injektor prilikom čega dolazi do desorpcije analita i njegove analize.<sup>20</sup>

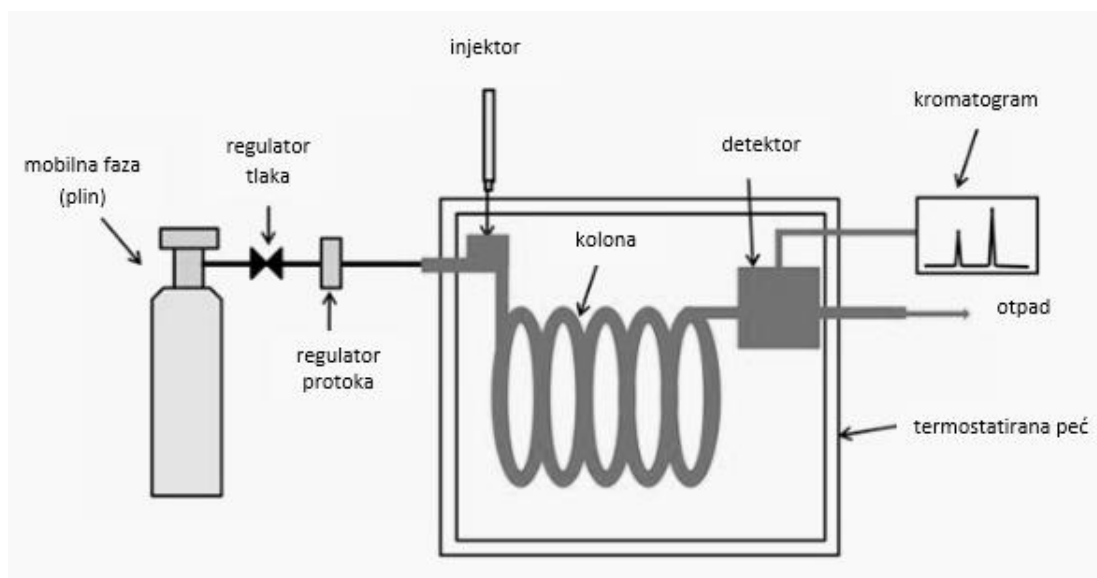
#### **1.4. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Mikroekstrakcija na krutoj fazi je široko primjenjiva tehnika koja se koristi u različitim granama znanosti, uključujući kemijsku analizu, bioanalizu i farmakologiju. Ova tehnika omogućuje učinkovitu pripremu uzorka za daljnju analizu. Iako sama mikroekstrakcija na krutoj fazi ne daje dublji uvid, njen je primarni cilj prikupiti ciljane spojeve iz kompleksnih mješavina kako bi se nastavila njihova daljnja karakterizacija. Kako bi se osigurala daljnja interpretacija dobivenih rezultata, identifikacija izdvojenih spojeva najčešće se vrši kroz vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa.

##### **1.4.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA**

Kromatografija je fizikalna metoda separacije koja temelji na razdjeljivanju sastojaka između dvije faze. Jedna faza je nepokretna odnosno stacionarna, dok je druga mobilna i giba se u određenom smjeru. Mobilna faza može biti plin ili tekućina odnosno fluid pri superkritičnim uvjetima.<sup>21</sup> Modernu plinsku kromatografiju su razvili Martin i James 1952. godine, te je ova metoda ubrzo postala jedna od najvažnijih i najprimjenjivanih analitičkih metoda. Plinska kromatografija je danas standardna analitička metoda koja se koristi u istraživanju, razvoju ali i kontroli kvalitete u mnogim industrijama, ali naročito u petrokemijskoj kao i u prehrambenoj industriji.<sup>22</sup>

Princip plinske kromatografije se temelji na separaciji komponenata između stacionarne i mobilne faze. Mobilna faza je u ovom slučaju inertan plin poput helija ili dušika, dok je stacionarna faza selektivna tekućina visoke viskoznosti ili kruti adsorbent.<sup>21</sup> Uređaj u kojem se provodi plinska kromatografija se naziva plinski kromatograf, a sastoji se od: injektora, kolone, opreme za kontrolu protoka nosača, termostatisirane peći, detektora i pisara koji ispisuje kromatograme (slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz plinske kromatografije<sup>22</sup>

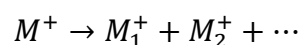
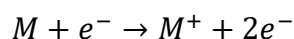
Metoda započinje tima da se uzorak isparava, bilo u grijanom ulazu ili u samom injektoru. Iz tog razloga potrebni su uzorci koji se mogu ispariti bez razgradnje. Primjeri takvih uzoraka su većina otapala i pesticida, arome i esencijalna ulja. Ako su uzorci primjerice amini, amidi, kiseline onda je mora ispuniti njihov zahtjev prethodne kemijske pretvorbe kako bi im se povećala hlapljivost.<sup>24</sup> Daljnja analiza se nastavlja u termostatisiranoj peći čiji je cilj održati temperaturu injektora i kolone. U injektoru ispareni uzorak pomoću plina nosioca ulazi u kolonu. U koloni dolazi do odjeljivanja spojeva. Na izlasku kolone dobiva se plin nosioc sa analitom koji potom ulaze u detektor. Detektor ima dva dijela, prvi koji prikuplja uzorke i drugi koji je elektronička komponenta. Odnosno detektor daje odziv na neko fizikalno-kemijsko svojstvo analita pri čemu nastaje analogni signal koji elektronička oprema pretvara u digitalni. Kao krajnji rezultat analize dobivamo ispisani kromatogram<sup>22</sup>

### 1.4.2. SPEKTROMETRIJA MASA

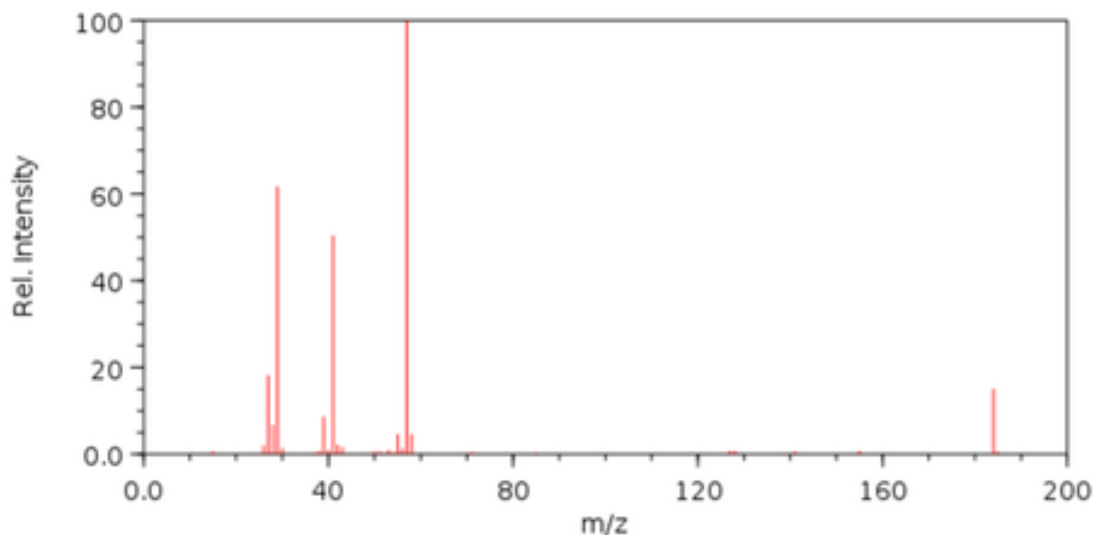
Spektrometrija masa je široko primjenjiva analitička metoda čiji principi počivaju na ionizaciji i fragmentaciji molekula uzorka koji se nalazi u plinovitom stanju gdje se dobiveni ioni u konačnici razdvajaju prema masi. Ovom metodom se identificiraju nepoznati spojevi prema molekulskoj masi. Osim navedenog posebnost ove metode je u tome što zbog posebnog fragmentiranja molekula ista omogućuje i određivanje samih molekulskih formula spojeva.

Uređaj u kojem se provodi spektrometrija masa se naziva spektrometar masa, a sačinjavaju ga: vakuumski sustav, izvor iona, analizator mase, detektor iona i sustav za snimanje podataka. Bitno je naglasiti kako je cijeli sustav pod vakuumom. Potreba za vakuumom se javlja kako ne bi došlo do sudara nastalih iona sa neutralnim molekulama unutar sustava. Posljedica sudara bi bilo smanjenje osjetljivosti odnosno gubitak naboja ili bi u krajnjem slučaju rezultiralo složenosti spektra što bi otežalo krajnju interpretaciju.<sup>25</sup>

Kako je već navedeno u samom početku potrebno je provesti ionizaciju. Ista je potrebna kako bi se ion mogao kretati unutar elektrostatskog i magnetskog polja u uređaju. Nakon unošenja uzorka u sustav on biva bombardiran snopom elektrona visoke energije pri čemu dolazi do sljedećeg raspada:



Vidljivo je da osim ionizacije slijedi i daljnje cijepanje molekule na fragmente, tj. ione manje molekulske mase. Nastala smjesa iona se ubrzava i nastavlja kroz magnetsko polje. Magnetsko polje djeluje na ione te dolazi do otklanjanja putanje iona na temelju mase, točnije s obzirom na omjer mase i naboja  $m/z$ . U ovisnosti o jakosti magnetskog polja u analizatoru masa se otklanja se određeni  $m/z$ . Sve u konačnici dolazi na detektor. Detektor dobivene omjere  $m/z$  pretvara u električne signale gdje se pomoću računala sve ostvaruje kao spektar masa (slika 9). Tako je dobiveni spektar masa linijski dijagram koji sadržava odnos relativnog intenziteta i omjera mase i naboja fragmenta.<sup>26</sup>



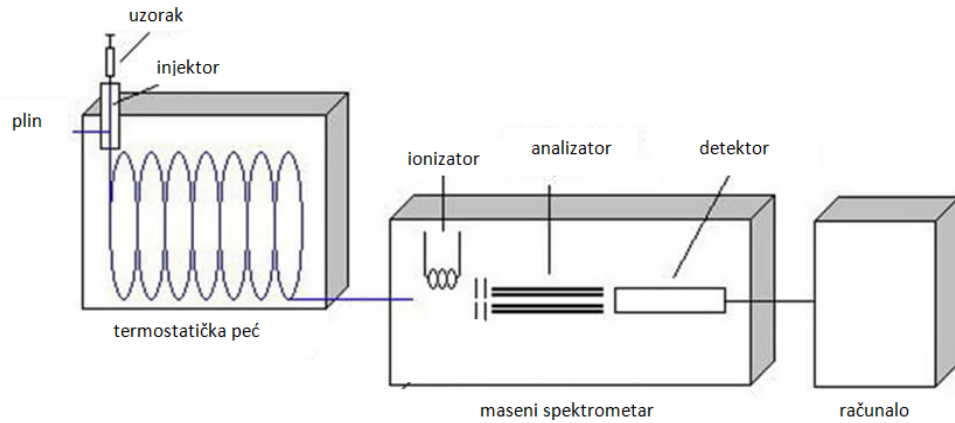
Slika 9. Spektar masa <sup>22</sup>

### 1.4.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. *gas chromatography – mass spectrometry*, GC-MS) je analitička tehnika koja obuhvaća plinsku kromatografiju i masenu spektrometriju u jedan postupak. U današnje vrijeme prepoznata je kao odabrano prva tehnika kad se radi o određivanju hlapljivih spojeva premda se njegoa upotreba može proširiti i na nehlapljive spojeve. Ova tehnika se ističe po svojstvima kao što su osjetljivost na malu količinu uzorka, velike je razlučivosti pa tako razdvaja spojeve i već na temelju sitnih specifičnosti, a dobiveni rezultati su naročito ponovljivi i točni.<sup>27</sup>

Metoda se pokazala kao jako uspješna kad se govori o separaciji i kvantifikaciji. Njene manjkavosti se ističu kad se pojavi kvalitativno određivanje, ali se u tom slučaju uvijek može nadomjestiti sa spektrometrijom masa.<sup>22</sup>





Slika 10. Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija- spektrometrija masa<sup>22</sup>

Ukupna analiza počinje injektiranjem uzorka. Uzorak se u tom procesu isparava te miješa sa inertnim plinom. Analiza se nastavlja ulaskom analita u kolonu koja je pod vakuumom. U koloni dolazi do odjeljivanja komponenata. Daljnja analiza se provodi u spektrometru masa. Unutar spektrometra dolazi dio ionizacije te pomoću krajnjeg detektora dobivamo spektar masa. U ovom slučaju vrši se usporedba dobivenog spektrometra sa bazom spektara te se na taj način vrši identifikacija spojeva. Posebnost spektrometra masa u vezanom sustavu sa plinskom kromatografijom je u tome što ima mogućnost snimanja svih iona prisutnih u nekom  $m/z$  intervalu, ili snimanja samo odabranih iona omjera  $m/z$  (slika 10).<sup>28</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. UZORCI

U eksperimentu je provedeno patvorenje meda pomoću cvjetne peludi, javorovog sirupa i saharozne probe. Kao uzorci korišteni su cvjetna pelud i poliflorni med sa područja Slavenskog Broda. Melisopalinološka analiza je provedena na Agronomskom fakultetu Sveučilištu u Zagrebu. (slika 11.).



Slika 11. Cvjetna pelud (lijevo) i poliflorni med (desno) korišteni u eksperimentu  
(vlastita fotografija)

Za uzorak javorovog sirupa uzet je komercijalni sirup. Saharozna proba je za potrebe eksperimentalnog rada izrađena u laboratoriju pomoću komercijalnog šećera.

## 2.2. APARATURA

- Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi
- Magnetska miješalica (Heidolph MR Her-Standard (100-1400 o/min))
- Termostat (Heidolph EKT 3001, Njemačka)
- Sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD)
- Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)
  - plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890A
  - maseni detektor (Agilent Technologies, SAD), model 5975C
- Kapilarna kolona HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan, J&W, SAD),

## 2.3. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

Ovaj eksperiment se bazira na hlapljivim spojevima i njihovoj analizi. Kako je već prije objašnjeno boja peludi varira ovisno o bilju od koje pelud potječe. Dakako različito podrijetlo označava i različite hlapljive spojeve te peludi. Radi dobivanja reprezentativnijih rezultata u analizi pelud je podijeljena u 6 skupina. Boja peludi po skupinama varira od svijetlo žute do gotovo crne. Tokom uzimanja uzorka peludi iz svake od 6 skupina peludi su uzeta po 2 zrna (slika 12).



Slika 12. Prikaz peludnih zrna separiranih po skupinama u ovisnosti o boji

Patvorenje meda, kao što je već navedeno, najčešće se provodi pomoću šećernih sirupa. U ovom eksperimentu ulogu šećernih sirupa su preuzeli komercijalni javorov sirup (slika 13), te saharozna proba napravljena u laboratoriju (slika 14).



Slika 13. Javorov sirup korišten u eksperimentu (vlastita fotografija)

Saharozna proba je bila drugi šećerni sirup i napravljena je uz pomoć komercijalnog šećera, sode bikarbone, limunske kiseline te vode. Postupak proizvodnje saharozne probe odrađen je prema sljedećem receptu:

Potrebni sastojci:

- 70 g šećera
- 30 ml kipuće vode
- 1 g limunske kiseline
- 0,8 g sode bikarbone

Postupak:

U posudu dodati šećer i razrijediti kipućom vodom. Dobivena viskozna masa zagrijava se u vodenoj kupelji na 80 °C. Za ubrzavanje postupka dodaje se kiselina. Smjesa se drži na konstantnu temperaturu 2 sata uz stalno miješanje sirupa kako se šećer ne bi nakupio. Da bi se kiselina neutralizirala, dodaje se soda bikarbona. Na kraju je potrebno ohladiti gotov sirup-saharoznu probu (slika 14).



Slika 14. Saharozna proba napravljena u laboratoriju (vlastita fotografija)

Patvorenje meda je provedeno na način da se cvjetna pelud otapala u šećernim sirupima. Stoga su ispitivani uzorci smjesa cvjetne peludi i javorovog sirupa te smjesa cvjetne peludi i saharozne probe. Dakako kako bi se utvrdilo podrijetlo tih spojeva potrebni su i uzorci početnih tvari što su cvjetna pelud, javorov sirup i saharozna proba. U konačnici kako se patvoreni med uspoređuje sa prirodnim medom potrebna je i njegova analiza. Zaključno, uzorci su: cvjetna pelud, med, javorov sirup, smjesa cvjetne peludi i javorovog sirupa, saharozna proba te smjesa cvjetne peludi i saharozne probe. Na slici 15 usporedno su prikazani uzorci cvjetne peludi, javorovog sirupa, smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa te saharozne probe i smjese cvjetne peludi i saharozne probe.



Slika 15. Prikaz uzoraka sa javorovim sirupom (lijevo) i uzoraka sa saharoznom probom (desno) (vlastita fotografija)

## 2.4. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

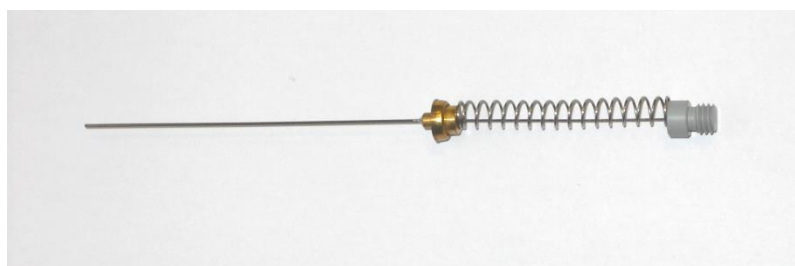
1g od svakog uzorka (šest uzoraka) se stavi u staklenu posudu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (40 °C). Na slici 16 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).<sup>30</sup>



Slika 16. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) (vlastita fotografija)

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, sivo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 min na 270 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja, vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzoraka.<sup>30</sup>

Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je najpogodnije vlakno za ekstrakciju vršnih para uzoraka peluda s obzirom na ukupni broj identificiranih spojeva u vršnim parama sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (slika 17).



Slika 17. Vlakno sa ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno)<sup>30</sup>

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno se izvlači te se provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 45 min, uz konstantnu brzinu miješanja otopine uzorka peluda (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.<sup>30</sup>

## 2.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf u kombinaciji s masenim detektorom spojenim na računalo (slika 18). Separacija komponenti provedena je na kapilarnoj koloni: HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm).



Slika 18. Vezani sustav plinska kromatografija- spektrometrija masa (GC-MS) (vlastita fotografija)



Uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °C min<sup>-1</sup>,
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin<sup>-1</sup>.

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:

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

Injektiranje uzorka provedeno je ručno pomoću držača za SPME vlakno (slika 19).



Slika 19. Uređaj za mikroekstrakciju (vlastita fotografija)

### 3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi uzoraka cvjetne peludi, poliflornog meda, javorovog sirupa, saharozne probe, smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa te smjese cvjetne peludi i saharozne probe analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa GC-MS na koloni HP-5MS. Dobiveni rezultati ispitivanja prikazani su u tablicama 1-6.

Tablica 1. Kemijski sastav hlapljivih spojeva cvjetne peludi izoliran pomoću sivog vlakna s ovojnicom (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm)

red. broj	spoj	RI	površina pika (%)
1.	octena kiselina	<900	56,51
2.	3-metilbutanal*	<900	1,56
3.	dimetil-sulfid*	<900	3,63
4.	etil-acetat	<900	3,45
5.	pentanal	<900	1,85
6.	butanska kiselina	<900	2,46
7.	butan-2,3-diol	<900	1,11
8.	heksanal	<900	1,62
9.	(E)-heks-2-enal	<900	5,00
10.	2-furankarboksaldehid (furfural)*	<900	0,97
11.	heksen-1-ol	<900	5,11
12.	benzaldehyd <sup>a</sup>	965	1,59
13.	heksanska kiselina	985	2,54
14.	6-metil-hept-5-en-2-on	989	1,43
15.	1,8-cineol	1038	1,12
16.	(E,E)-okta-3,5-dien-2-on	1075	0,21
17.	oktan-1-ol	1080	0,78
18.	(E,Z)-okta-3,5-dien-2-on	1093	0,36
19.	nonanal	1105	1,26
20.	aldehid jorgovana (izomer I <sup>**</sup> )	1156	0,80

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

Tablica 2. Kemijski sastav hlapljivih spojeva poliflornog meda izoliran pomoću sivog vlakna s ovojnicom (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm)

red. broj	spoj	RI	površina pika (%)
1.	3-metilbutanal*	<900	2,48
2.	2-metilbutanal*	<900	2,61
3.	dimetil-sulfid*	<900	2,53
4.	etil-acetat	<900	2,38
5.	2,5-dimetilfuran	<900	2,26
6.	oktan	<900	5,00
7.	dimetil-disulfid*	<900	1,12
8.	2-furankarboksaldehid (furfural)*	<900	4,54
9.	heksen-1-ol	<900	5,11
10.	heptanal	901	0,47
11.	$\alpha$ -pinen	942	1,62
12.	benzaldehyd <sup>a</sup>	965	16,03
13.	oktanal	1006	1,13
14.	pent-1-in-4-en-3-ol	1010	2,51
15.	limonen	1035	0,56
16.	benzil-alkohol	1037	0,96
17.	2-fenilacetaldehyd	1048	1,31
18.	<i>trans</i> -linalool oksid (furanski tip)	1076	1,46
19.	<i>cis</i> -linalool oksid (furanski tip)	1091	8,63
20.	linalool	1101	2,96
21.	hotrienol	1106	7,46
22.	2-feniletanola	1116	0,6
23.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1156	1,21
24.	aldehid jorgovana (izomer II**)	1170	1,2
25.	3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol	1191	0,47
26.	dekanal	1207	0,66
27.	nonanska kiselina	1273	0,59

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. Kemijski sastav hlapljivih spojeva javorovog sirupa izoliran pomoću sivog vlakna s ovojnicom (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm)

red.broj	spoj	RI	površina pika(%)
1.	3-metil-3-buten-2-on	<900	3,00
2.	2-furankarboksaldehid (furfural)*	<900	3,15
3.	2-furanmetanol	<900	20,78
4.	2-metil-2-ciklopenten-1-on	908	1,07
5.	2-etil-heks-1-ol	1035	3,32
6.	2-hidroksi-3-metil-2-ciklopenten-1-on	1036	1,67
7.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on*	1144	8,79
8.	5-hidroksimetilfurfural	1230	19,72
9.	nonanska kiselina	1273	2,21
10.	dekanska kiselina	1371	5,80
11.	sirinaldehid	1665	1,06

**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. Kemijski sastav hlapljivih spojeva javorovog sirupa i cvjetne peludi izoliran pomoću sivog vlakna s ovojnicom (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm)

red.broj	spoj	RI	površina pika(%)
1.	octena kiselina	<900	8,51
2.	etil-acetat	<900	5,54
3.	2-furankarboksaldehid (furfural)*	<900	4,02
4.	2-furanmetanol	<900	17,53
5.	(E,E)-okta-3,5-dien-2-on	1075	2,39
6.	metil-oktanoat	1128	3,55
7.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on*	1144	8,32
8.	5-hidroksimetilfurfural	1230	25,72
9.	nonanska kiselina	1273	1,81
10.	dekanska kiselina	1371	4,22
11.	sirinaldehid	1665	1,58

**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. Kemijski sastav hlapljivih spojeva saharozne probe izoliran pomoću sivog vlakna s ovojnicom (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm)

red. broj	spoj	RI	površina pika(%)
1.	2-furankarboksaldehid (furfural)*	<900	47,8
2.	2-furanmetanol	<900	11,97
3.	nonanal	1105	3,54
4.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on*	1144	5,01
5.	5-hidroksimetilfurfural	1230	4,25
6.	nonanska kiselina <sup>a</sup>	1273	2,64
<p><b>RI</b> = retencijski indeks na HP-5MS koloni; <sup>a</sup> = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja; * = spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); ** = točan izomer nije identificiran</p>			

Tablica 6 Kemijski sastav hlapljivih spojeva saharozne probe i cvjetne peludi izoliran pomoću sivog vlakna s ovojnicom (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm)

red. broj	spoj	RI	površina pika (%)
1.	octena kiselina	<900	23,35
2.	dimetil-sulfid*	<900	4,97
3.	etil-acetat	<900	4,67
4.	pentanal	<900	7,56
5.	dimetil-disulfid*	<900	0,95
6.	2-furankarboksaldehid (furfural)*	<900	8,67
7.	2-furanmetanol	<900	7,97
8.	benzaldehida	985	1,27
9.	6-metil-hept-5-en-2-on	989	6,03
10.	1,8-cineol	1038	1,80
11.	(E,E)-okta-3,5-dien-2-on	1075	1,22
12.	(E,Z)-okta-3,5-dien-2-on	1093	0,94
13.	nonanal	1105	3,04
14.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on*	1144	4,14
15.	aldehid jorgovana (izomer I**)	1156	1,18
16.	5-hidroksimetilfurfural	1230	1,52
17.	nonanska kiselina	1273	2,64

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

## 4. RASPRAVA

Proizvodnja meda danas u svijetu iznosi oko 1 400 000 t godišnje, a kao najveći proizvođači izdvajaju se: Rusija, SAD, Kina, Meksiko, Argentina. Podaci o potrošnji meda ukazuju na velike potrošnje. Primjerice prosječna potrošnja meda po stanovniku, u Grčkoj iznos 1,7 kg dok je u Njemačkoj 1,2 kg. Kako to obično biva došlo je do povećane potrošnje i sve manje proizvodnje. Iz tog razloga med je postao treća najviše patvorena namirnica na svijetu. Patvorenje se najčešće provodi razrjeđivanjem ili miješanjem sa slatkim sirupima<sup>1,5</sup>

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u uzorku cvjetne peludi, poliflornog meda, javorovog sirupa, smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa, saharozne probe, smjese saharozne probe i cvjetne peludi. Kako bi se izolirali spojevi korištena je metoda ekstrakcije vršnih para na krutoj fazi. Dobiveni spojevi su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa na HP-5MS koloni.

Hlapljivi spojevi cvjetne peludi, odnosno kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih pomoću metode mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi sa sivim vlaknom (DVB/CAR/PDMS) prikazan je u Tablici 1. Izolirano je ukupno 20 spojeva. U uzorku dominira octena kiselina (56,51%), a slijedi je heksen-1-ol sa udjelom od 5,11%. Niz nastavlja dimetil- sulfid sa udjelom od 3,63% i etil-acetat sa udjelom od 3,45%. Ostali spojevi se nalaze u udjelima manjim od 3%.

Kod analize podataka za samu cvjetnu pelud uočljivo je da najveći udio posjeduje octena kiselina. Octena kiselina ne čini standardni sastav meda te se smatra da je posljedica oksidacije. Odnosno kako je u eksperimentu provedeno separiranje peludnih zrna prema boji i veličini, peludna zrna su duži period bila izložena atmosferskim uvjetima što je dovelo do sušenja peludi te do mogućeg početka fermentacije. Spojevi koji se u Tablici 1. redom nalaze od jedanaestog do dvadesetog mjesta su tipični spojevi peludi te se u većem ili manjem udjelu mogu pronaći u rezultatima analize peludi bilo koje biljne vrste.

Tablica 2 prikazuje kemijski sastav hlapljivih spojeva poliflornog meda. Analizom je uspješno identificirano 27 spojeva. Okvirno se da primijetiti da rijetki spojevi prelaze udio veći od 3%. Najveći udio posjeduje benzaldehid, točnije 16,03%.



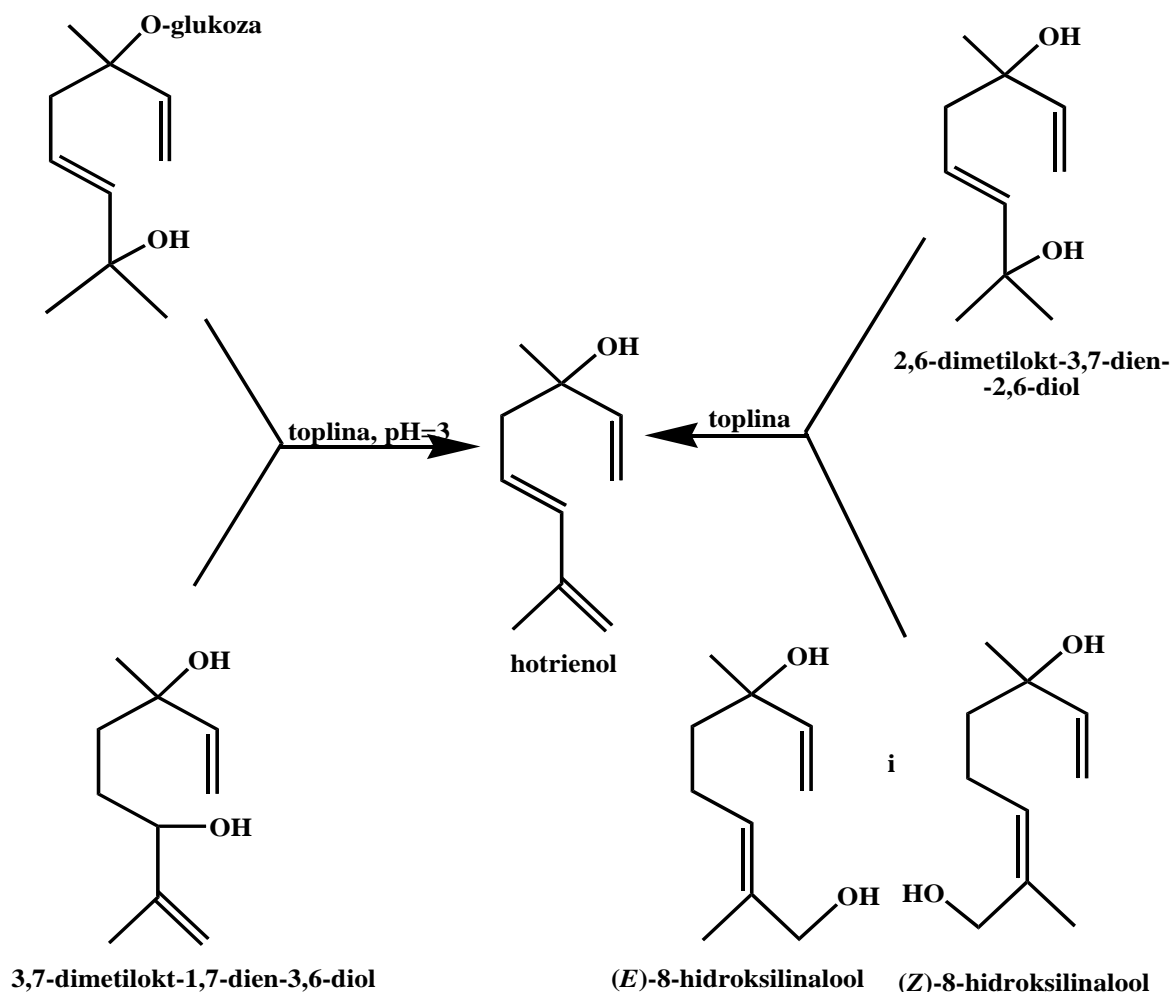
Spoj *cis*-linalool oksid (furanski tip) zastupljen je udjelom od 8,63%, dok ponešto manje ima hotrienola (7,46 %). Bliske udjele imaju heksen-1-ol (5,11%) te oktan (5%). Posljednji u nizu spojeva koji ima udio veći od 3% je 2-furankarboksaldehid (furfural)\* sa točnim udjelom od 4,54%.

Analizom uzorka poliflornog meda potvrđeno je prisustvo spojeva 3-metilbutanal i 2-metilbutanal, kako je prikazano u Tablici 2. Oba spoja su posljedica izlaganja uzorka toplinskoj obradi i procesima oksidacije, odnosno oba su Streckerovi aldehidi. Spoj 3-metilbutanal se nalazi i u uzorku cvjetne peludi, ali u nešto manjem udjelu. Osim 3-metilbutanala, postoji još nekoliko spojeva koji su detektirani u uzorku cvjetne peludi, ali i u uzorku meda. To su redom: heksen-1-ol, benzaldehid i aldehid jorgovana.<sup>31,32</sup>

Isto kako pelud ima standardne spojeve koje je moguće pronaći u gotovo svakom uzorku peludi isto je i sa medom. Standardni spojevi za med su: limonen, nonanal, fenilacetaldehid, dekanal i bezaldehid. Ispitivani uzorak meda sadrži: limonen, 2-fenilacetaldehid te benzaldehid. Najveći udio od navedenih ima bezaldehid i to u iznosu od 16,03%. Benzaldehid se nalazi i u uzorku peludi samo u značajno nižem udjelu, točnije 1,59%.<sup>31</sup>

U Tablici 2. se mogu uočiti dva izomera aldehida jorgovana, ali i linalool. Aldehidi jorgovana nastaju iz linalola pomoću izravne hidroksilacije na C<sub>8</sub> atomu gdje ponajprije nastaje (*E*)-8-hidroksilanol, a dalje se (*E*)-8-oksolinalool pretvara u alkohol jorgovana te potom oksidira u aldehid jorgovana.. Također epoksidacijom iz linalola nastaje 6,7-epoksilinalool koji oksidacijom daje dva tipa furanskih linalool oksida, točnije *cis*- i *trans*-linalool oksid. Oba se nalaze u Tablici 2. u gotovo jednakim udjelima, dok je udio aldehida jorgovana u uzorku cvjetne peludi nešto manji nego u medu i pojavljuje su u obliku samo jednog izomera.<sup>30</sup>

Udio hotrienola pri analizi hlapljivih spojeva meda iznosi 7,46%. Hotrienol je spoj koji nastaje toplinskom razgradnjom 2,6-dimetil-3,7-oktadien-2,6-diola ili (*E*)-i-(*Z*)-8-hidroksilinalola (slika 20). Navedeni prekursori hotrienola nisu pronađeni u analiziranom uzorku poliflornog meda. Budući da uzorak meda nije prilikom izolacije termički tretiran, hotrienol je vjerojatno nastao tijekom zrenja meda.<sup>31</sup>

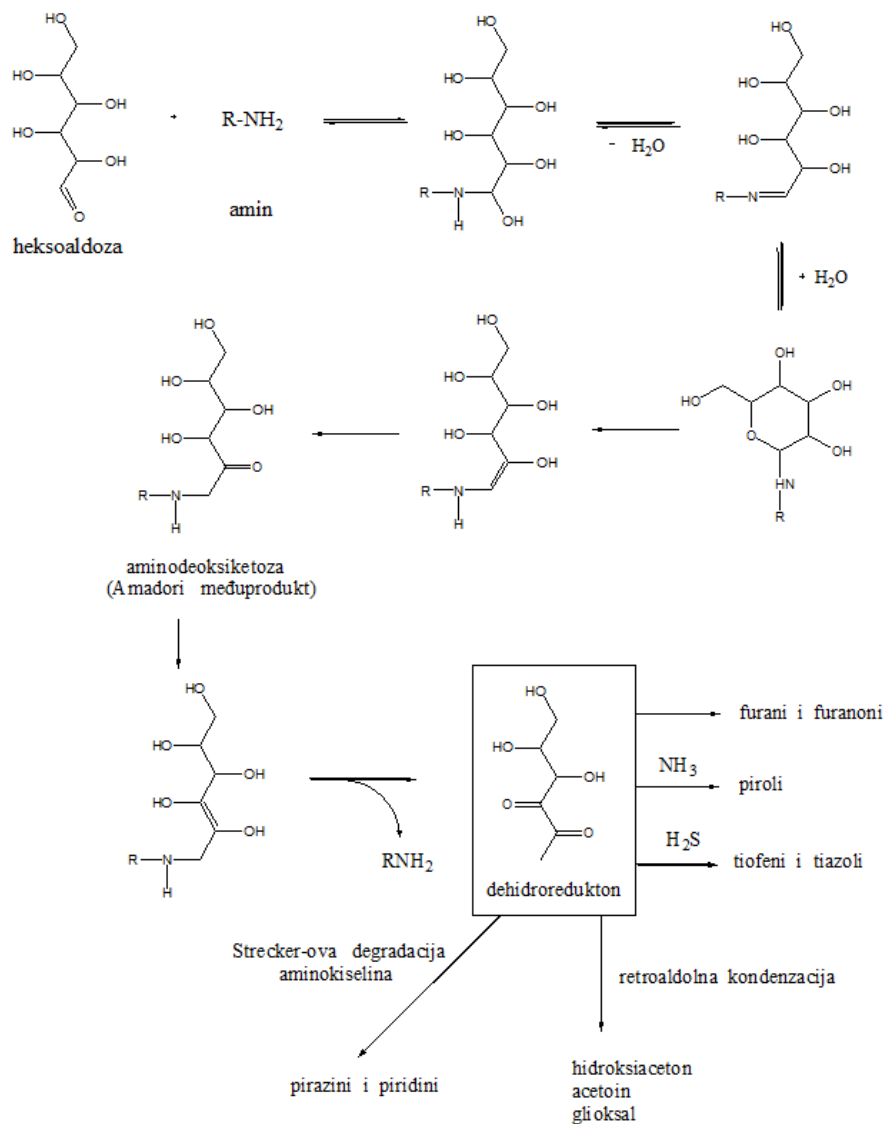


Slika 20. Nastajanje hotrienola<sup>30</sup>

Tablica 3. sadrži sastav hlapljivih spojeva javorovog sirupa koji su analizirani na isti način kao i spojevi cvjetne peludi. Analizom je izolirano 11 spojeva. Spoj koji je prisutan u najvećem postotku je 2-furanmetanol (20,78%), dok ga u nešto nižem udjelu slijedi 5-hidroksimetilfurfural (19,72%). Osim navedenih spojeva kvantitativno značajni spojevi su i 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on\* (8,79%), 2-etil-heks-1-ol (3,32%), 2-furankarboksaldehid (furfural)\* (3,15%) te na kraju niza 3-metil-3-buten-2-on (3%). Kao i u prethodnom slučaju ostali spojevi se nalaze u udjelima manjim od 3%.

Spoj koji se posebno ističe u analizi hlapljivih spojeva javorovog sirupa je 5-hidroksimetilfurfural. To je spoj koji nastaje zagrijavanjem šećera i amina te uzrokuje promjenu arome i boje samog uzorka. Uglavnom je produkt Maillardovih reakcija i

Streckerovih degradacija. Put nastanka 5-hidroksimetilfurfurala dijele i 2-furankarboksaldehid te 2-furanmetanol. Oba su detektirana u analiziranom uzorku javorovog sirupa.<sup>30</sup>



Slika 21 Opća shema Maillardove reakcije<sup>30</sup>

Temelj Maillardovih reakcija (slika 21) je kondenzacija uglavnom reducirajućih ugljikohidrata s  $\alpha$ -amino skupinom slobodnih aminokiselina pri čemu nastaju nestabilne aminodekstroze. One se dalje deaminiraju i dehidratiziraju dajući različite reaktivne produkte kao što su: hidroksiketoni, dikarbonilni spojevi, derivati furfurala i furanona i drugo, a koji dalje mogu biti reaktanti kod Strecker-ovih degradacija aminokiselina. Strecker-ova degradacija aminokiselina temelji se na dekarboksilaciji i deaminaciji

aminokselina u prisutnosti dikarbonilnih spojeva pri čemu nastaje Strecker-ov aldehid i aminoketon. S obzirom na činjenicu da se javorov sirup dobiva ukuhavanjem prisustvo spojeva kao što su 5-hidroksimetilfurfural, 2-furankarboksaldehid i 2-furanmetanol je najvjerojatnije posljedica navedenog procesa dobivanja.

Spojevi specifični za javor su sirinaldehid i 2-hidroksi-3-metil-2-ciklopenten-1-on. Sirinaldehid je spoj koji se dobiva kao produkt degradacije lignina. Odnosno javorov sirup ima takav način sakupljanja da se u drvo zabijaju posebni lijevci te tako degradiraju lignin koji se nalazi u kori drveta. Spoj koji je definicija okusa javora je 2-hidroksi-3-metil-2-ciklopenten-1-on, odnosno on daje onu aromu zbog koje svi prepoznaju javorov sirup. Osim prethodnih, literaturno definiranih, spojeva postoje i određeni spojevi koje je često moguće pronaći u javorovom sirupu, a ne potječu izvorno iz sirupa. To su 2-etil-heks-1-ol kojeg sirup sadrži 3,32% i nonanska kiselina sa 2,21%. Dokazano je da su ti spojevi posljedica dodataka koji sprječavaju pjenjenje tijekom ukuhavanja sirupa.<sup>33</sup>

U tablici 4 prikazani su rezultati analize smjese javorovog sirupa i cvjetne peludi. U smjesi je identificirano ukupno 11 spojeva, od kojih su najzastupljeniji 5-hidroksimetilfurfural (25,72%) i 2-furanmetanol (17,53%). U udjelu manjem od 10% prisutni su slijedeći spojevi: octena kiselina (8,51%), 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on\* (8,32%), etil-acetat (5,54%), dekanska kiselina(4,22%), 2-furankarboksaldehid (furfural)\* (4,02%), metil-oktanoat (3,05%). Ostali detektirani spojevi su prisutni u udjelu manjem od 3%.

Prema literaturnim podacima spoj 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on, ili derivat furana, koji je identificiran u analiziranoj smjesi prisutan je u samom javorovom sirupu te u smjesi javorovog sirupa i cvjetne peludi. Obzirom da je u ovom radu spoj detektiran u javorom sirupu i smjesi javorovog sirupa i cvjetne peludi u približno jednakom udjelu može se pretpostaviti da je razlog njegovog prisustva pri toplinskoj proizvodnji javorovog sirupa i nastajanje derivata furana.<sup>35</sup>

Usporedbom podataka dobivenih analizom cvjetne peludi te smjese javorovog sirupa i cvjetne peludi vidljivo je da su određeni spojevi detektirani u obje analize. Tako je octenu kiselinu i etil-acetat moguće pronaći u analizi spojeva cvjetne peludi, ali i u analizi smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa. Octena kiselina se pojavljuje kod analize cvjetne peludi u udjelu od 56,51%, dok u smjesi cvjetne peludi i javorovog

sirupa njen sadržaj iznosi 8,51 %. Osim navedenih spojeva u obje je analize detektiran i spoj (*E,E*)-okta-3,5-dien-2-on. Njegov udio kod analize cvjetne peludi iznosi 0,36% dok se je u slučaju analize smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa taj udio veći, točnije 2,39%.

Hlapljivi spojevi saharozne probe, točnije kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi sa sivim vlaknom (DVB/CAR/PDMS) iskazan je u Tablici 5. Vidljivo je izolirano samo 6 spojeva. Prema udjelu, ispred svih, uvelike prednjači 2-furankarboksaldehid (furfural)\* sa udjelom od 47,8%. Udio iznad 10%, točnije udio od 11,97% ima 2-furanmetanol dok sve ostale komponente imaju manji udio. Slijedom su to spojevi: 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on\* (5,01%), 5-hidroksimetilfurfural (4,25%), nonanal (3,54%) te naposljetku nonanska kiselina (2,64%).

Analizom uzorka saharozne probe detektirani su spojevi: 2-furankarboksialdehid, 2-furanmetanol, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on, 5-hidroksimetilfurfural. Uzorak saharozne probe izrađen je u laboratoriju i to tako što je provedeno višesatno ukuhavanje sastojaka. S obzirom na način priređivanja uzorka smatra se da su navedeni spojevi posljedica Maillardovih reakcija. Spojevi koji su identificirani u uzorku saharozne probe, a ne potječu iz Maillardovih reakcija su nonanal i nonanska kiselina.

Posljednji analizirani uzorak činila je smjesa saharozne probe i cvjetne peludi. Rezultati analize prikazani su u Tablici 6. Identificirano je ukupno 17 spojeva. Kao i kod prethodne analize smjese javorovog sirupa i cvjetne peludi, najveći udio se pripisuje octenoj kiselini (23,25%). Nešto istaknutiji spojevi prema udjelu su 2-furankarboksaldehid (furfural)\* (8,67%), 2-furanmetanol (7,97%), pentanal (7,56%) te 6-metil-hept-5-en-2-on (6,03%). Preostali spojevi se nalaze u udjelima manjim od 5%, a niz započinju dimetil-sulfid i etil-acetat čiji su udjeli vrlo bliski. Odnosno dimetil-sulfid ima udio od 4,97%, dok etil-acetat ima udio od 4,67%. Nešto manji udio ima 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on\*, točnije 4,14. Posljednji spoj u nizu sa istaknutijim udjelom je nonanal i to u udjelu od 3,04 %.

Usporedbom spojeva dobivenih analizom uzorka saharozne probe i uzorka smjese cvjetne peludi i saharozne probe vidljivo je da se svih 6 spojeva pronađenih kod uzorka saharozne probe nalazi i u sastavu uzorka smjese cvjetne peludi i saharozne

probe. Ostatak spojeva detektiranih analizom smjese cvjetne peludi i saharozne probe podudara se sa spojevima pronađenim tijekom analize uzorka cvjetne peludi. Sumarno se da zaključiti da stvaranjem smjese cvjetne peludi i saharozne probe nije došlo do nastanka novih spojeva već je samo došlo do promjena udjela spojeva s obzirom na uzorke cvjetne peludi i uzorke saharozne probe.

## 5. ZAKLJUČAK

Razmatrajući dobivene rezultate analize može se izvesti sljedeće zaključke:

- uzorak cvjetne peludi sadrži visoki udio octene kiseline (56,51%) kao posljedicu sušenja uzorka te isto svojstvo prenosi na ispitivane uzorke smjese cvjetne peludi i javorovog sirupa te smjese cvjetne peludi i saharozne probe,
- uzorak poliflornog meda sadrži karakteristične spojeve (hotrienol, 3,7-dimetilokt-1,5-dien-3,7-diol,..) kao i drugi medovi koji su ispitivani na ovakav način a nisu nađeni u uzorcima javorovog sirupa i saharozne probe,
- uzorci javorovog sirupa i saharozne probe sadrže veći udio spojeva Maillardovih reakcija što ukazuje na zagrijavanje i patvorenje,
- spoj koji se pojavljuje u svim analiziranim uzorcima je 2-furankarboksialdehid,
- uzorci javorovog sirupa sadrže spojeve koji su posljedica načina proizvodnje javorovog sirupa,
- u patvorenom medu načinjenom od smjese cvjetnog peluda i javorovog sirupa te smjese cvjetnog peluda i saharozne probe detektirani su spojevi koji su produkt Maillardove reakcije.

## 6. KRATICE

HS-SPME = mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace- solid phase microextraction*)

GC-MS = vezana tehnika plinske kromatografije- spektrometrije masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*)

GC-FID = plinska kromatografija s fotoionizacijskim detektorom (engl. *gas chromatography with flame-ionization detection*)

HPLC = tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *high performace liquid chromatography*)

FTIR = infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectoscopy*)

SPME = mikroekstrakcija na krutoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*)

GC = plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

DVB/CAR/PDMS = divinilbenzen/karboksen/polidimetiloksan (engl. *Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane*)

PDMS = polidimetiloksan (engl. *polydimetilsiloxane*)

PA = poliakrilat (engl. *polyacrylate*)

EMA- ekonomski motivirano krivotvorenje (engl. *economically motivated adulteration*)

µm = mikrometar

°C = stupanj Celsius

mS = miliSiemens

cm = centimetar

ppm= dijelovi po milijunu

m/z = omjer mase i naboja

kg = kilograam

mL = mililitar

min = minuta

o/min = okretaja po minuti

m = metar

mm = milimetar

mL/min = mililitar po minuti

eV = elektronvolt



## 7. LITERATURA

1. *P. Ciursa, D. Pauliuc, F. Dranca, S. Ropciuc, M. Oroian*, Detection of honey adulterated with agave, corn, inverted sugar, maple and rice syrups using FTIR alaysis, *Food Control*. **130** (2021) 108266, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108266>.
2. *D. A. Tafere*, Chemical Composition and uses of Honey, *J. Food Nutr. Res.* **4** (3) (2021) 194-201, doi :10.26502/jfsnr.2642-11000072.
3. URL: <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/1808/Med-nektar-bogova.html> (21.8.2023.)
4. *J. Cardenase- Escudero, D. Galan- Madruga, J. O. Caceres*, Rapid, reliable and easy-to-perform chemometric-less method for rice syrup adulterated honey detection using FTIR-ATR, *Talanta*. **253** (2023) 123961, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123961>.
5. *N. Kezić, D. Bubalo, Z. Grgić, M. Dražić, D. Barišić, J. Filipi, M. Ševar*, Konvencionalno i ekološko pčelarenje Interna skripta. Agronomski fakultet u Zagrebu, Zagreb, 2011.
6. *M. Levaković*, Pelud-ljekovita svojstva i primjena. Diplomski rad. Poljoprivredni fakultet, Osijek. 2014.
7. URL: <https://shorturl.at/gvK48> (1.9.2023.)
8. URL: <https://shorturl.at/mEY56> (5.9.2023.)
9. *S. Prđun*, Važnost peluda za pčelinju zajednicu, *Hrvatska pčela*. **5** (137) (2018) 161-163.
10. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda, *Narodne novine*. **20** (NN 20/00) (2000).
11. URL: <https://www.scribd.com/document/130527525/Kemijske-Fizikalne-i-Senzorske-Karakteristike-Meda> (17.7.2023.)
12. *J. Katalinić*, Pčelarstvo, Nakladni zavod Znanje, Zagreb, 1968, str. 374-389.
13. URL: <https://www.honeysource.com/wp-content/uploads/2021/08/HoneySource-111235-Different-Varieties-Honey-blogbanner1.jpg> (17.8.2023.)
14. *M. Kranjac*, Bioorgansko istraživanje kemijskih profila i markera odabranih vrsta meda. Disertacija. Kemijsko-tehnološki fakultet. Split. 2018.
15. *I. Gobin, D. Vučković, D. Lukšić*, Antibakterijska svojstva meda, *Medicina fluminensis*, **5** (2) (2014) 150-157.

16. URL: <https://www.bharathoney.com/wp-content/uploads/2020/05/honey-varieties.jpg> (3.7.2023.)
17. URL: <https://www.gourmandise.hr/invertni-secer>. (10.7.2023)
18. URL:<https://health.usnews.com/wellness/food/articles/honey-vs-maple-syrup> (16.7.2023)
19. *M. Abdul Mottaleb, M.J. Mezirani, M. Rafiq Islam*, Solid-phase Microextraction and Its Application to Natural Products and Biological Samples, Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9905.pub2>.
20. *H. Kataoka, H.L.Lord, J.Pawliszyn*, Application of solid-phase microextraction in food analysis, Journal of Chromatography. (800) (2000) 35-62, doi: 10.1016/s0021-9673(00)00309-5.
21. *D. Jurić*, Primjena plinske kromatografije za određivanje sastava i udjela hlapivih komponenti različitih vrsta rakija sa područja Hercegovine. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet. Osijek. 2018.
22. *D. Klobučar*, Hlapljivi spojevi peluda. Završni rad. Kemijsko tehnološki fakultet. Split. 2021.
23. *K.D.Barrtle, P. Myers*, History of gas chromatography, Trends in analytical chemistry. 21 (9+10) (2002) 547-557, doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00806-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00806-3).
24. *J. Kassab*, Primjena plinske kromatografije (GC) za određivanje ostatnog otapala u melatoninu. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Odjel za kemiju. Osijek. 2021.
25. *R. Waddell Smith*, Mass Spectrometry, Encyclopedia of Forensic Sciences. 2 (2013) 603-608, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00250-6>.
26. *K. Gusić*, Kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata i nitrila pomoću GC-MS/MS tehnike. Završni rad. Kemijsko tehnološki fakultet. Split. 2021.
27. *J. Piechocka, M. Wiczorek, R. Glowacki*, Gas Chromatography-Mass Spectrometry Based Approach for the Determination of Methionine- Related Sulfur- Containing Compounds in Human Saliva, International Journal of Science 21 (2020) 9252, doi:10.3390/ijms21239252.
28. *P. Kišić*, Optimizacija i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha. Diplomski rad. Prehrambeno tehnološki fakultet. Zagreb. 2016.

29. URL: <https://land.decorexpro.com/hr/prochee/iskusstvennyj-med.html> (16.7.2023.)
30. Z. *Marijanović*, Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet. Osijek. 2014.
31. E. *Alissandrakis*, P.A. *Tarantilis*, P.C. *Hraizanis*, M. *Polissiou*, Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometric analysis, *Food Chemistry*. **100** (2007) 396-404, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.015.
32. S. *Prđun*, L. *Svečnjak*, M. *Valentić*, Z. *Marijanović*, I. *Jerković*, Characterization of Bee Pollen: Physico-Chemical Properties, Headspace Composition and FTIR Spectral Profiles, *Foods*. **10** (2021), doi:<https://doi.org/10.3390/foods10092103>.
33. I. *Alli*, E. *Akochi-K*, S. *Kermasha*, Flavor Compounds in Maple Syrup, *Development in Food Science*. **29** (1992) 131-140, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88834-1.50014-4>.
34. I. *Jerković*, A. *Kasum*, Z. *Marijanović*, C.I.G. *Tuberoso*, Contribution to the characterisation of honey-based Sardinian product abbamele: Volatule aroma composition, honey marker compounds and antioxidant activity, *Food Chemistry*. **124** (2011) 401-410, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.06.047.