

# Hlapljivi spojevi meda od kadulje

---

**Buzdovačić, Andrea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:169703>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD KADULJE**

**DIPLOMSKI RAD**

**ANDREA BUZDOVAČIĆ**

**Matični broj: 9**

**Split, listopad 2020.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD KADULJE**

**DIPLOMSKI RAD**

**ANDREA BUZDOVAČIĆ**

**Matični broj: 9**

**Split, listopad 2020.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TEHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY**  
**FOOD TEHNOLOGY**

**VOLATILE COMPOUNDS OF SAGE HONEY**

**MASTER'S THESIS**

**ANDREA BUZDOVAČIĆ**

**Parent number: 9**

**Split, october 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**

Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD KADULJE

Andrea Buzdovačić, 9

#### Sažetak:

Hlapljivi spojevi prisutni u medu su pretežito botaničkog podrijetla i često nisu stabilni te se mogu transformirati tijekom sazrijevanja meda, njegova skladištenja i zagrijavanja. U ovom radu su istraživani hlapljivi spojevi meda od kadulje. Hlapljivi spojevi izolirani su hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Pored toga, provedena je i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) iz vode uzete iz središnjeg dijela modificirane aparature po Clevengeru kao i iz tikvice za destilaciju. Uzorci hlapljivih spojeva su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Kao dominantni spojevi identificirani su: 2-fenilacetaldehid, eikosan, trikosan i 2-furankarboksaldehid.

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

**Rad sadrži:** 38 stranica, 20 slika, 9 tablica, 53 literarne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Marina Zekić	član
3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	mentor

**Datum obrane:** 30. listopada 2020.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### MASTER'S THESIS

**University of Split**

**Faculty of Chemistry and Technology Split**

**Graduate study Food Technology**

**Scientific area: Biotechnical sciences**

**Scientific field: Food technology**

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28

**Mentor:** Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.

### VOLATILE COMPOUNDS OF SAGE HONEY

Andrea Buzdovačić, 9

#### **Abstract:**

The volatile compounds present in honey are predominantly of botanical origin and are often not stable and can be transformed during honey maturation, storage and heating. In this paper, volatile compounds of sage honey were investigated. The volatile compounds were isolated by hydrodistillation in a Clevenger modified apparatus. In addition, headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) was performed from water taken from the central part of the Clevenger modified apparatus as well as from a distillation flask. Samples of volatile compounds were analyzed by analytical method gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The dominant compounds were identified as: 2-phenylacetaldehyde, eicosan, tricosan and 2-furancarboxaldehyde.

**Keywords:** volatile compounds, sage honey, HD, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 38pages, 20 figures, 9 tables, 53 references

**Original in: Croatian**

#### **Defence committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Ani Radonić, PhD, assistant prof           | Chair person |
| 2. Marina Zekić, PhD, assistant prof.         | member       |
| 3. Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof. | supervisor   |

**Defence date:** October 30<sup>th</sup> 2020.

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

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju  
Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira  
Marijanovića u razdoblju od svibnja do listopada 2020. godine.*



*Zahvaljujem se profesoru doc.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na prihvaćenom mentorstvu i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja.*

## ZADATAK

Zadatak diplomskog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz 3 uzorka meda od kadulje.

U tu svrhu bilo je potrebno:

- Izvršiti izolaciju hlapljivih spojeva meda od kadulje hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru.
- Izvršiti izolaciju hlapljivih spojeva iz vodenog zaostatka u centralnom dijelu modificirane aparature u Clevengeru, kao i u tikvici, pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).
- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) te usporediti rezultate analiza.

## **SAŽETAK**

Hlapljivi spojevi prisutni u medu su pretežito botaničkog podrijetla i često nisu stabilni te se mogu transformirati tijekom sazrijevanja meda, njegova skladištenja i zagrijavanja. U ovom radu su istraživani hlapljivi spojevi meda od kadulje. Hlapljivi spojevi izolirani su hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Pored toga, provedena je i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) iz vode uzete iz središnjeg dijela modificirane aparature po Clevengeru kao i iz tikvice za destilaciju. Uzorci hlapljivih spojeva su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Kao dominantni spojevi identificirani su: 2-fenilacetaldehid, eikosan, trikosan i 2-furankarboksaldehid.

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

## **SUMMARY**

The volatile compounds present in honey are predominantly of botanical origin and are often not stable and can be transformed during honey maturation, storage and heating. In this paper, volatile compounds of sage honey were investigated. The volatile compounds were isolated by hydrodistillation in a Clevenger modified apparatus. In addition, headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) was performed from water taken from the central part of the Clevenger modified apparatus as well as from a distillation flask. Samples of volatile compounds were analyzed by analytical method gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The dominant compounds were identified as: 2-phenylacetaldehyde, eicosan, tricosan and 2-furancarboxaldehyde.

**Keywords:** volatile compounds, sage honey, HD, HS-SPME, GC-MS

# SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Definicija i povijest meda.....	2
1.2. Vrste i podjela meda .....	3
1.2.1. Nektarni med.....	4
1.2.2. Med medljikovac.....	5
1.3. Kemijski sastav meda .....	6
1.3.1. Ugljikohidrati .....	7
1.3.2. Voda.....	7
1.3.3. Kiseline .....	8
1.3.4. Proteini i aminokiseline .....	8
1.3.5. Enzimi .....	8
1.3.6. Vitamini .....	9
1.3.7. Mineralne tvari.....	9
1.3.8. Fitokemikalije .....	10
1.3.9. 5-Hidroksimetilfurfural .....	10
1.4. Fizikalna svojstav meda.....	11
1.4.1. Viskoznost.....	11
1.4.2. Kristalizacija .....	11
1.4.3. Higroskopnost .....	12
1.4.4. Električna vodljivost .....	12
1.4.5. Optička aktivnost meda.....	12
1.4.6. Specifična masa.....	12
1.4.7. Površinska napetost.....	13

1.5. Senzorska svojstva meda .....	13
1.5.1. Boja meda .....	13
1.5.2. Miris/aroma meda .....	14
1.5.3. Okus meda.....	15
1.6. Hlapljivi spojevi meda.....	15
1.6.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva u medu .....	15
1.6.2. Analiza hlapljivih spojeva.....	16
1.6.3. Plinska kromatografija (GC).....	16
1.6.4. Spektrometrija masa (MS) .....	18
1.6.5.Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa .....	18
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	20
2.1. Med od kadulje ( <i>Salvia officinalis</i> L.) .....	20
2.2. Hidrodestilacija .....	20
2.3. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) .....	22
2.4. Analiza hlapljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija- spektrometrija masa (GC-MS).....	22
3. REZULTATI .....	24
3.1. Prikaz rezultata.....	24
4. RASPRAVA .....	31
5. ZAKLJUČAK.....	34
6. LITERATURA .....	35

## UVOD

Med je prirodno sladak proizvod koji se koristi od pamtivijeka kao hrana, ali i u mnoge druge svrhe kao što su religijski obredi, liječenje raznih bolesti te u kozmetičke svrhe.

Med ima izuzetno složen kemijski sastav pa, unatoč razvoju različitih analitičkih metoda, do danas nije u potpunosti poznat kemijski sastav meda što onemogućuje industrijsku proizvodnju i otežava patvorenje meda. Najvažnije svojstvo kojim se može opisati kemijski sastav meda je varijabilnost i praktički ne postoje dva uzorka meda koja su u potpunosti identična.

Različite vrste meda, kao i med unutar pojedine vrste, razlikuju se po svom sastavu u ovisnosti o biljnom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima i pasmini pčela.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Definicija i povijest meda

Med je prirodno sladak proizvod kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) od nektara medonosnih biljaka, sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka. Nektare, sekrete i izlučevine pčele skupljaju i dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju te izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja. (1)

Ljudi koriste med od pamtivijeka prvenstveno kao hranu, ali i kao vjerski simbol i lijek. Jedan od najstarijih dokaza proizvodnje meda datira još prije 8000 godina. U špilji u okolici Valencije pronađen je prikaz čovjeka koji traži med u košnicama pčela. (2)



**Slika 1:** Crtež na kamenu, Bicom, Španjolska, 8000. g. pr. Kr. (3)

Ljudi prije nisu uzgajali pčele, nego ih tražili u šupljinama stijena i drveća. U mlađem kamenom dobu, ljudi su obilježavali drveća sa pčelama tako što bi na njih usijecali svoj znak. Kasnije su spoznali da je praktičnije posjeći drvo i ostaviti panj kako bi se pčele rojile u njemu što se smatra početkom pčelarstva. (4)

Med se stoljećima smatrao svetom hranom. Koristio se u religiozne svrhe pri štovanju bogova i balzamiranju umrlih te u razne medicinske i kozmetičke svrhe.(4)

U starom Egiptu med je bio vrlo važan o čemu svjedoče brojni pisani tragovi i hijeroglifi u hramovima i grobnicama.U medicini su Egipćani med koristili na mnoge načine jer su vjerovali da liječi mnoge bolesti. Koristili su med kao hranu, kozmetiku, u magijskim i religijskim ceremonijama, a propolis su koristili za mumificiranje o čemu svjedoče brojna istraživanja arheologa koji su u grobnicama faraona pronašli pčelinje saće. (4)



U antici med se spominjao kao dar s neba, nektar, ambrozija i hrana bogova. Grci su med koristili i kao hranu i kao lijek. Hipokrat, otac moderne medicine, pisao je o ljekovitim svojstvima meda i vjerovao da med ima pozitivan utjecaj na zdravlje kože. Rimljani su med koristili kao hranu, u kozmetici i medicini. Vojnici su koristili med kao antiseptik za liječenje rana. Prije pronalaska penicilina med je bio vodeći antiseptik za otvorene rane i ozljede. (5)

Prije masovne proizvodnje šećera, med je bio jedini zaslađivač široko dostupan ljudima.

## 1.2. Vrste i podjela meda

Med se prema podrijetlu dijeli na cvjetni ili nektarni med, koji je dobiven od nektara biljaka, te na medljikovac ili medun, koji je dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka. (1)

Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja med dijelimo na:

- **med u saću** - med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća
- **med sa saćem ili med s dijelovima saća**
- **cijedeni med** - med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla
- **vrcani med** - med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla
- **prešani med** - med dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45°C
- **kremasti med** - dobiven kontroliranom kristalizacijom tekućeg meda
- **filtrirani med** - med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi. (1)

Pekarski med je med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se potom prerađuje i može imati strani okus ili miris, ili biti u stanju vrenja ili prevrio, ili biti pregrijan. (1)



**Slika 2:** Med u saću (6)



**Slika 3:** Med sa saćem (7)



**Slika 4:** Kremasti med (8)

### 1.2.1. Nektarni med

Nektarni med pčele proizvode od nektara, slatke tekućine koju izlučuju biljne žlijezde nektarije medonosnih biljaka. Nektarni med može biti monoflorni i poliflorni. Po kemijskom sastavu nektar je vodena otopina različitih šećera s najviše saharoze, glukoze i fruktoze. Neke vrste meda sadrže i oligosaharide (rafinosa, melebioza, melecitoza i dr.) u malim količinama. Uz šećere, nektar sadrži i određene količine dušikovih i fosforovih spojeva, organskih kiselina, vitamina (naročito vitamina C), pigmenta, aromatičnih spojeva, mineralnih tvari, enzima (invertaza, fosfataza) i aminokiselina. (9,10,11)

Monoflorni med u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste s izuzecima pitomog kestena (*Castanea sativa* L.) gdje udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu iznosi najmanje 85%, lucerne (*Medicago* sp.) 30%, ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) 30%, lipe (*Tilia* sp.) 25%, kadulje (*Salvia* sp.) 20%, bagrema (*Robinia pseudacacia* L.) 20% i lavande (*Lavandula* sp.) 20%. (12)

Apsolutni monoflorni med ne postoji jer pčele nikada ne posjećuju samo jednu biljnu vrstu, pa čak i ako ona dominira na tom području. Monoflorni medovi se svrstavaju u vrijedniju kategoriju te time postižu veću cijenu od poliflornih. (12)

Poliflorni med je mješavina meda različitih vrsta, npr. livadni ili voćni med. (12)

### **1.2.2. Med medljikovac**

Med medljikovac pčele proizvode od medne rose (medljike), slatke tvari koja se javlja na listovima i ostalim dijelovima crnogoričnog i bjelogoričnog drveća. Medljika je izlučevina kukaca iz reda jednakokrilaca (*Hemiptera*) od kojih su za pčelarstvo najznačajnije lisne i štitaste uši. One na biljkama sišu sokove kroz tanko i dugačko rilo koje uvuku kroz biljno tkivo, sve do sitastih cijevi kojima kolaju biljni sokovi koje iskorištavaju te više ili manje prerađene izlučuju kroz analni otvor u obliku sitnih kapljica medljike koja se gomila na biljci ili pada na zemlju ili travu.(9,10,11)

Ti sokovi sadrže 10 – 30% suhe tvari od čega veći dio otpada na ugljikohidrate (5 – 20%), dok ostatak čini pepeo (1 – 3%), bjelančevine (0,03 – 3%), organske kiseline, vitamini i enzimi. Uz to medljika sadrži stanice algi i gljiva. Medljikovac se od nektarnog meda razlučuje metodom električne vodljivosti, koja mora biti veća od 1,00 mS/cm. (12)

U odnosu na nektarni med, medljikovac ima veću obojanost, veći sadržaj mineralnih tvari te veću količinu oligosaharida, naročito melecitoze. Također je manje sladak od nektarnog meda, ima manje organskih kiselina te veću pH vrijednost. (9)

Postoji i tzv.miješani med koji je mješavina nektarnog meda i meda medljikovca. (12)



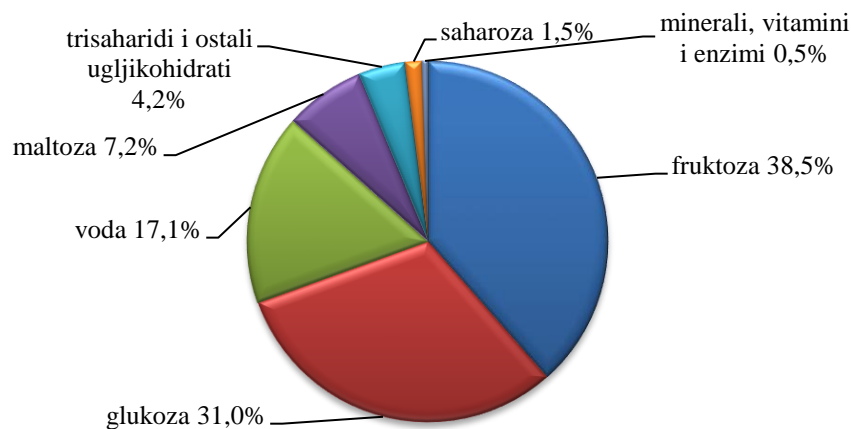
**Slika 5:** Med medljikovac(13)

### 1.3. Kemijski sastav meda

Med ima izuzetno složeni kemijski sastav s više od 70 različitih komponenti. Te komponente mogu potjecati od pčela, od medonosne biljke ili mogu nastati tijekom zrenja u saću. (14)

Unatoč razvoju različitih analitičkih metoda sastav meda do danas nije u potpunosti razjašnjen što onemogućuje industrijsku proizvodnju, otežava patvorenje meda te tako on zadržava svojstva prirodne namirnice proizvedene isključivo od strane pčela. Najvažnije svojstvo kojim se može opisati kemijski sastav meda je varijabilnost i praktički ne postoje dva uzorka meda koja su u potpunosti identična. (15)

Različite vrste meda, kao i med unutar pojedine vrste, razlikuju se po svom sastavu u ovisnosti o biljnom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima, pasmini pčela te sposobnostima samog pčelara (način dorade i skladištenje meda). (16)



**Slika 6:**Prosječni kemijski sastav meda

### 1.3.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su glavni sastojak meda i njihov udio iznosi 73-83 %, što med čini prezasićenom otopinom šećera. Najzastupljeniji su fruktoza, s udjelom od 33,3-40,0 % i glukoza s udjelom od 25,2-35,3 %. Ova dva monosaharida čine prosječno 88-95 % ukupnih ugljikohidrata, daju medu slatkoću, energetska vrijednost te najviše utječu na njegova fizikalna svojstva kao što su viskoznost, gustoća, ljepljivost, sklonost kristalizaciji, higroskopnost te mikrobiološku aktivnost (16, 17, 18).

Omjer fruktoze i glukoze (F/G) karakterističan je za pojedine vrste meda i u većini slučajeva je veći od 1,0. Kao bogati fruktozom ističu se med od bagrema i kestena (F/G 1,5-1,7) dok su neke od rijetkih vrsta s većim udjelom glukoze med od uljane repice i maslačka (14,19).

Omjer fruktoze i glukoze te omjer glukoze i vode u medu su vrlo bitni jer se pomoću njih može odrediti i predvidjeti tendencija kristalizacije meda. Glavni šećeri koji medu daju slatkoću su fruktoza, glukoza, saharoza i maltoza. Budući da je fruktoza najzastupljenija u medu, med je u prosjeku 1,5 puta slađi od konzumnog šećera. Približno 95% šećera prisutnih u medu je fermentabilno, što je važno u proizvodnji medovine i pekarskih proizvoda. Međutim, med sa udjelom šećera višim od 83% i udjelom vode ispod 17,1% neće podlijeći fermentaciji ukoliko se pravilno skladišti (15).

Količina i odnos između pojedinih ugljikohidrata u medu ovise prije svega o njegovom botaničkom i geografskom podrijetlu, ali i o sastavu i intenzitetu lučenja nektara, klimatskim uvjetima i fiziološkom stanju i pasmini pčela. (20)

Određivanje saharoze je važno kako bi se utvrdilo eventualno patvorenje meda, hranjenje pčela šećerom (saharozom) ili direktno dodavanje šećera u med. (15)

### 1.3.2. Voda

Voda je drugi najzastupljeniji sastojak meda i njen se udio u medu kreće između 15 i 23%. Udio vode značajno utječe na neka fizikalna svojstva meda (kristalizacija, viskoznost ili specifična težina), a ovisi o klimatskim uvjetima, pasmini pčela, snazi pčelinje zajednice, vlažnosti, temperaturi zraka u košnici, uvjetima pri preradi i čuvanju, kao i o botaničkom podrijetlu meda. Zbog higroskopnosti meda količina vode u njemu nije stalna veličina, već se za vrijeme čuvanja, u ovisnosti o vlažnosti zraka, mijenja. Udio vode je najvažniji parametar kakvoće meda budući da određuje stabilnost meda i otpornost na mikrobiološko kvarenje (fermentaciju) tijekom čuvanja. (21)

### **1.3.3. Kiseline**

Iako su prisutne u malim količinama, kiseline su odgovorne za stabilnost meda te za njegov miris i okus. Najzastupljenija je glukonska kiselina koja nastaje djelovanjem pčelinjeg enzima glukoza-oksidge na glukozu. U medu su prisutne i druge kiseline poput mravlje, octene, maslačne, jabučne i druge. Kiselost meda ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu paje tako pH nektarnog meda u rasponu od 3,3 do 4,6, dok je za medljikovac i med kestena od 4,5 do 6,5. (22)

Bagremov med karakterizira mala količina organskih kiselina dok tamniji medovi imaju veću kiselost. Previsoka kiselost meda uglavnom znači da je med neko vrijeme fermentirao što je rezultiralo pretvorbom alkohola kao produkta fermentacije u organsku kiselinu. (23)

### **1.3.4. Proteini i aminokiseline**

Med sadrži male količine proteina koji većinom potječu od pčele, no dio dopijeva iz biljke tj. nektara i peludi. Proteini se mogu koristiti kao parametar za određivanje botaničkog podrijetla, no bolji pokazatelj su slobodne aminokiseline u medu. Najzastupljenija aminokiselina u medu je prolin te čini od 50 do 85% ukupnih aminokiselina. Uz prolin, identificirano je još 26 esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina. Aminokiseline u med dopijevaju većinom iz nektara, a manjim dijelom iz peludi i od samih pčela. (22,24)

### **1.3.5. Enzimi**

Enzimi koji se nalaze u medu potječu od izlučevina pčela, cvjetnog praha te dijelom iz nektara. Enzimi su biološki katalizatori, a uloga u medu im je ubrzavanje kemijskog procesa pretvaranja nektara u med. Najzastupljeniji enzimi u medu su invertaza, katalaza, dijastaza i kiselna fosfataza. (25,26)

Dijastaze su najznačajniji enzimi u medu koji se sastoje od  $\alpha$ -amilaze, koja razlaže škrob na dekstrine, i od  $\beta$ -amilaze koja ga razlaže na maltozu. Osjetljivi su na toplinu i time ukazuju na pregrijavanje proizvoda i stupanj očuvanosti. Zbog toga se aktivnost dijastaze uz sadržaj hidroksimetilfurfurala koristi kao pokazatelj kvalitete, stupnja zagrijavanja te uvjeta skladištenja meda. Aktivnost dijastaze odgovara aktivnosti enzima prisutih u 1 g meda, koji mogu hidrolizirati 0,01 g škroba u 1 satu pri 40 °C, a prikazuje se u obliku dijastaznog broja u Göthe jedinicama. U tretmanima toplinom, pogotovo onima koji uključuju visoke temperature i kratko vrijeme, ne mora doći do

uništenja enzima već može doći do reverzibilne inaktivacije. Stoga je moguće da med koji je tretiran na visokoj temperaturi ne pokazuje značajno smanjenje količine enzima jer može doći do oporavka aktivnosti diastaze nakon zagrijavanja. (27)

Enzimi su vrlo značajne komponente meda budući da se njihova aktivnost smatra pokazateljem kakvoće, stupnja zagrijavanja i trajnosti te čuvanja meda. Zajedno s proteinima medu daju svojstva koja se umjetnim putem ne mogu proizvesti niti nadomjestiti. (19)

### **1.3.6. Vitamini**

Vitamina u medu ima u malim količinama koje su nedovoljne za potrebe ljudskog organizma. Zastupljeni su vitamin C i neki vitamini B kompleksa (riboflavin, pantotenska kiselina, piridoksin, biotin, nikotinska kiselina) te mala količina K i E vitamina. Količina vitamina u medu ovisi o biljci s koje pčele sakupljaju nektar, zrelosti meda, peludi i uvjetima skladištenja. Najveći izvor vitamina su peludna zrnca. Filtracijom dolazi do smanjenja sadržaja vitamina zbog skoro potpunog uklanjanja peludi. Još jedan faktor koji uzrokuje gubitak vitamina je oksidacija askorbinske kiseline sa vodikovim peroksidom (nastalim iz glukoza oksidaze). (28)

### **1.3.7. Mineralne tvari**

Med sadrži čitav niz mineralnih tvari od kojih su neke vrlo važne za pravilan rad ljudskog organizma iako su količinski slabo zastupljene (prosječno 0,1-0,2 % u nektarnom medu i do 1,5 % u medljikovcu izraženo kao udio pepela). Prevladavaju kalij, natrij, kalcij, fosfor, sumpor, klor, magnezij, željezo i aluminij, a u malim količinama prisutni su još i bakar, mangan, krom, cink, olovo, arsen, titan, selen i dr. Najzastupljeniji mineral je kalij koji zajedno s natrijem, kalcijem i fosforom čini najmanje 50 % ukupnog udjela mineralnih tvari. (15,16)

Udio mineralnih tvari u medu ponajviše ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu, ali također i o klimatskim uvjetima i sastavu tla na kojem je rasla medonosna biljka. Karakterističan sastav tla određene regije očituje se i u mineralnom sastavu medonosne biljke odnosno mineralnom sastavu njenog nektara i peludi. (27,29)

### 1.3.8. Fitokemikalije

U kemijskom sastavu meda nalaze se fitokemikalije koje potječu iz biljaka s kojih su pčele skupljale nektar ili mednu rosu. Dokazano je da mnogi spojevi iz skupine fitokemikalija pozitivno utječu na zdravlje čovjeka. U fitokemikalije se ubrajaju antioksidansi i flavonoidi. (30)

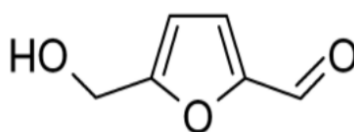
Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Ti slobodni radikali mijenjaju strukturu drugih biomolekula čime izazivaju razne zdravstvene probleme, starenje organizma i oštećenja stanica. Antioksidansi mogu biti enzimske i neenzimske prirode. Bitni su i kod očuvanja meda jer svojim djelovanjem sprječavaju kvarenja koja su uzrokovana oksidativnim promjenama koje nastaju zbog djelovanja svjetlosti, topline i nekih metala. (30)

Flavonoidi imaju antioksidativni učinak, nalaze se u biljkama i vezani su uz proces fotosinteze pa su tako prisutni u voću, povrću, sjemenkama, cvijeću, ali i u čaju, vinu, medu i propolisu. Također, oni djeluju antimikrobno, inhibiraju razne enzime, imaju citotoksični i antitumorni učinak te djeluju kao estrogeni. (30)

### 1.3.9. 5-Hidroksimetilfurfural

Karbonilni spoj 5-hidroksimetilfurfural (HMF) je tipični parametar za određivanje uvjeta skladištenja namirnica. Nastaje tijekom razgradnje šećera iz 3-deoksiglukozona (3-DG) ciklizacijom i odvajanjem vode. Jedan je od najpoznatijih međuprodukata Maillardove reakcije. HMF može nastati pod utjecajem topline ili u kiselim uvjetima iz glukoze ili fruktoze. Stoga se HMF može naći u namirnicama bogatim šećerom i blago kiselim, posebice ako su bile izložene povišenoj temperaturi. (31)

Sadržaj HMF-a u medu varira od 1 do 75 mg/kg te je parametar kvalitete. Koncentracije HMF iznad 40 mg/kg su neodgovarajuće, mogu ukazivati na predugo skladištenje ili zagrijavanje meda. Svježi med uglavnom ne sadrži HMF. Iz navedenih razloga HMF je indikator za utjecaj skladištenja i topline. (32)



**Slika 7.**Struktura 5-hidroksimetilfurfurala (33)



## 1.4. Fizikalna svojstva meda

Fizikalna svojstva meda su usko povezana sa kemijskim sastavom meda. Zbog razlika u sastavu meda vrijednosti ovih parametara mogu biti specifične i različite. Pojedini sastojci meda utječu na određeno svojstvo ili istovremeno na nekoliko njih. Dokazano je da o udjelu vode ovisi viskoznost, indeks refrakcije i specifična masa. Optička aktivnost je povezana sa sastavom i udjelom pojedinih ugljikohidrata, dok električna vodljivost prije svega ovisi o udjelu mineralnih tvari. (16,34)

### 1.4.1. Viskoznost

Viskoznost označava stupanj tekućeg stanja meda. Na viskoznost utječe više faktora od kojih su najznačajniji udio vode i temperatura. Porastom temperature viskoznost meda se smanjuje, a taj utjecaj najizraženiji je na temperaturi ispod 15 °C. Ostali faktori koji utječu na viskoznost su medonosno bilje od kojeg potječe nektar, broj i veličina kristala u medu te sastav ugljikohidrata (veći udio di- i trisaharida doprinosi većoj viskoznosti). (35)

### 1.4.2. Kristalizacija

Mnogi kupci misle da je kristalizirani med pokvaren ili mu je naknadno dodan šećer, što je netočno. Kristalizacija je prirodno svojstvo meda. Med je prezasićena otopina glukoze i spontano prelazi u stanje ravnoteže kristalizacijom suvišne količine glukoze u otopini. (27)

Glavni uzročnik kristalizacije je sadržaj vode u medu no neizostavni faktor je i temperatura. Med ne kristalizira iznad 25 °C niti ispod 5 °C. Kristalizacija je proces oslobađanja vode i kao rezultat dobije se veći sadržaj vode u medu te se time povećava opasnost od fermentacije i kvarenja. Stoga je vrlo bitno med ostaviti da u potpunosti kristalizira jer se time med konzervira. Bitno je naglasiti da kristalizacija ne utječe na promjenu kvalitete meda. (36)



**Slika 8.** Kristalizirani med (37)

### **1.4.3. Higroskopnost**

Higroskopnost je svojstvo meda da u ovisnosti o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode na sebe privlači ili otpušta vodu. Proces je uvjetovan velikom količinom šećera. Taj proces traje do nastanka ravnoteže (58% vlažnosti zraka i 17,4% vode u medu). Fruktaza je higroskopnija od glukoze pa visok udio fruktoze med čini higroskopnijim. Čuvanjem meda u vlažnim prostorijama izaziva povećavanje masenog udjela vode te kao posljedica nastaje med podložni fermentaciji i kvarenju. (36)

### **1.4.4. Električna vodljivost**

Električna vodljivost je svojstvo koje uvelike ovisi o udjelu mineralnih tvari i kiselina u medu; što je on veći, veća je i električna vodljivost meda. Danas se kontroli kakvoće meda zbog jednostavnosti i brzine umjesto određivanja udjela pepela provodi mjerenje električne vodljivosti. Ono služi kao dobar kriterij za određivanje botaničkog podrijetla meda tj. za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca.

Prema Pravilniku nektarni i miješani med moraju imati električnu provodnost manju od 0,8 mS/cm, a medljikovac i med kestena veću od 0,8 mS/cm. Iznimke su medovi eukaliptusa, vrijeska, planike, manuke, čajevca i lipe, zbog prirodno velikih varijacija u električnoj provodnosti. (1)

### **1.4.5. Optička aktivnost meda**

Optička aktivnost meda je funkcija udjela pojedinih ugljikohidrata u medu. Vodena otopina meda je optički aktivna, tj. ima sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti. Fruktaza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo, a glukoza, svi disaharidi, trisaharidi i viši oligosaharidi udesno. Nektarni med zbog većeg udjela fruktoze zakreće svjetlost u lijevo, odnosno pokazuje negativnu optičku aktivnost dok medljikovac zbog većeg udjela oligosaharida, ponajviše melecitoze i erloze, zakreće svjetlost udesno, tj. pokazuje pozitivnu optičku aktivnost. (16)

### **1.4.6. Specifična masa**

Specifična masa meda predstavlja omjer mase meda prema masi iste količine vode i ovisi prvenstveno o udjelu vode u medu. Specifična masa kvalitetnih vrsta meda veća je od 1,42. Medonosno bilje od kojeg potječe nektar može utjecati na specifičnu masu meda. (39)

#### **1.4.7. Površinska napetost**

Mala površinska napetost čini med izvrsnim sredstvom za zadržavanje vlažnosti u kozmetičkim proizvodima. Površinska napetost ovisi o podrijetlu meda, a vjerojatno je povezana s koloidnim česticama. Zajedno s velikom viskoznošću odgovorna je za stvaranje pjene u medu. (27)

#### **1.5. Senzorska svojstva meda**

Boja, okus i miris su najvažnija senzorska svojstva meda i najviše ovise o biljnom podrijetlu meda te o uvjetima prerade i čuvanja, a njihova analiza ima značajnu ulogu u definiranju ukupnih svojstava meda. (15)

Rezultati senzorske analize mogu ukazati i na neka patvorenja meda kao što su patvorenje dodavanjem šećera, dobivanje meda hranjenjem pčela šećerom te deklariranje neodgovarajuće vrste meda obzirom na botaničko podrijetlo. Također je moguće utvrditi i kontaminaciju stranim tvarima kao što su sredstva protiv moljaca (naftalen, etilen-dibromid, *p*-diklorbenzen), repelenti (benzaldehyd), miris i okus dima itd. Na sveukupnu senzorsku procjenu utječe i grijanje meda te dulje skladištenje pri višim temperaturama. (14,15).

##### **1.5.1. Boja meda**

Boja meda može biti različita, od svijetložute, žute, smeđe do tamnosmeđe, u ovisnosti o botaničkom podrijetlu meda. Izrazito svijetle boje je bagremov med, a tamnosmeđe boje je kestenov med. Boja ostalih medova kreće se između te dvije krajnosti. Med postaje svjetliji poslije kristalizacije (jer su kristali glukoze bijeli), ali potamni tijekom čuvanja. Intenzivnije potamni ako se čuva pri višoj temperaturi. (27)

Boja je određena i kemijskim sastavom, tj. udjelom karotenoida, karotena i ksantofila (žuta boja), flavonoida, klorofila, antocijana (ružičasta boja), tanina (tamna boja). Med postaje tamniji pri kondenzaciji proteina i aminokiselina s reducirajućim šećerima (Maillardove reakcije), pri čemu se stvaraju melanoidi kao i uslijed prisustva produkata dobivenih razgradnjom fruktoze. Osim toga, u Maillardove reakcije mogu ući i polifenoli, askorbinska kiselina te karbonilni spojevi koji se mogu naći u medu ovisno o njegovom botaničkom podrijetlu. Boja meda je povezana i sa količinom pepela, pogotovo željeza, bakra i mangana. Med tamnije boje sadrži više mineralnih tvari.

Prozirnost i jasnoća ovisi o količini čestica kao što je pelud. Općenito proljetni je med svjetliji, a kasni ljetni tamniji. (27)



**Slika 9.** Različite boje meda (40)

### 1.5.2. Miris/aroma meda

Med sadrži preko pedeset mirisnih spojeva. Kod monoflornog meda, miris i okus su svojstveni određenoj biljnoj vrsti dok poliflorni med ima neodređen okus i miris. Miris meda u većini slučajeva ovisi o biljci od koje je dobiven. Mirisne tvari su lakohlapljive pa čuvanjem ili zagrijavanjem miris slabi ili nestaje. Neke vrste meda nemaju specifičan miris, dok neke poput kestena i lavande karakterizira miris po medonosnoj biljci. (27)

Mirisne tvari mogu se podijeliti u tri skupine:

1. karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni) - acetaldehid, propilaldehid, aceton, metiletilketon i dr.
2. alkoholi - propanol, izopropanol, etanol, butanol, izobutanol, fenol i dr.
3. esteri - metilni i etilni esteri mravlje, octene, propionske, benzojeve i drugih kiselina. (27)

Aroma meda potječe od eteričnih ulja, aromatičnih aldehida, diacetila, metilacetilkarbamata, hlapljivih i nehlapljivih kiselina. Svježi med je aromatičniji. Aroma slabi čim med kristalizira jer se eterična ulja uklapaju u kristale. U Maillardovim reakcijama kao produkti razgradnje fenolnih kiselina nastaju aromatski karbonili (vanilin, anisaldehyd, benzaldehid, fenilacetilaldehid i acetofenon). Oni snažno pridonose aromi meda, a nađeni su u vrlo malim količinama u medu od suncokreta, kestena, naranče, bagrema i eukaliptusa. Istraživanjima hlapljivih sastojaka u medu i nektaru i međusobnim usporedbama, dokazano je da hlapljive komponente meda potječe pretežito iz biljke iako neke potječu i od samih pčela. Do sada je u medu otkriveno više od šesto različitih hlapljivih komponenata no mnoge od njih još nisu identificirane i kvantificirane. (27)

### **1.5.3. Okus meda**

Okus meda povezan je s mirisom, a slatkoća meda ovisi o udjelu i omjeru glukoze, fruktoze, aminokiselina, eteričnih ulja i organskih kiselina. Med može biti slatkog do gorkog okusa. Nakon fermentacije med poprima kiseli okus. (27)

### **1.6. Hlapljivi spojevi meda**

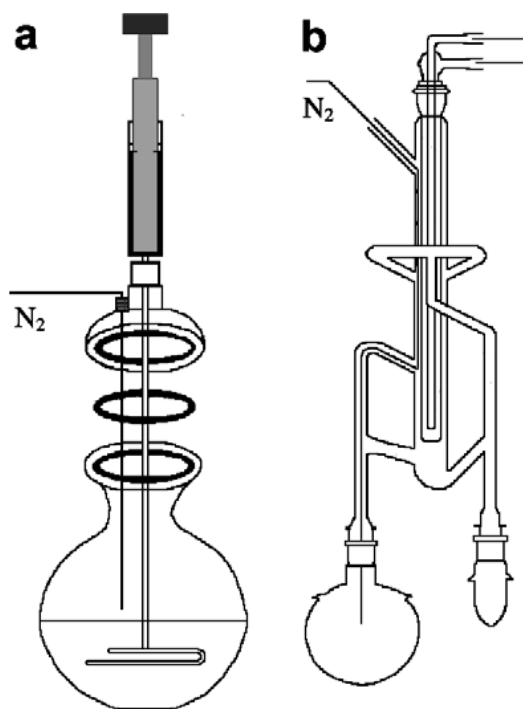
Hlapljivi spojevi koji su odgovorni za aromu meda prisutni su u medu u vrlo niskim koncentracijama i čine složenu smjesu spojeva relativno malih molekulskih masa.

Hlapljivi spojevi u medu mogu nastati:

- direktnim prijenosom iz biljke,
- pretvorbom biljnih sastojaka od strane pčela,
- proizvodnjom od strane pčela,
- pretvorbama spojeva prisutnih u nezrelom medu,
- dodatnim postupcima obrade. (42)

#### **1.6.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva u medu**

Izolacija hlapljivih spojeva iz kompleksne smjese kao što je med je vrlo zahtjevna. Metode izolacije mogu pokazivati različiti stupanj selektivnosti i učinkovitosti, ovisno o vrsti spojeva te uvjetima izolacije. Nadalje, zagrijavanjem meda već pri temperaturi od 50 °C stvaraju se novi hlapljivi spojevi kao što su produkti Streckerove degradacije i Maillardove reakcije koji nastaju zagrijavanjem ugljikohidrata i aminokiselina prisutnih u medu. U cilju dobivanja reprezentativnog profila hlapljivih spojeva (tzv. „fingerprinta“) potrebno je odabrati prikladnu metodu izolacije. Najčešće metode izolacije su: hidrodestilacija (HD), mikrosimultana destilacija – ekstrakcija (MSDE) (Slika 10), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (USE) i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME). (41)



**Slika 10.a** – preekstrakcija meda s diklormetanom; **b** - simultana destilacija - ekstrakcija otapalom (41)

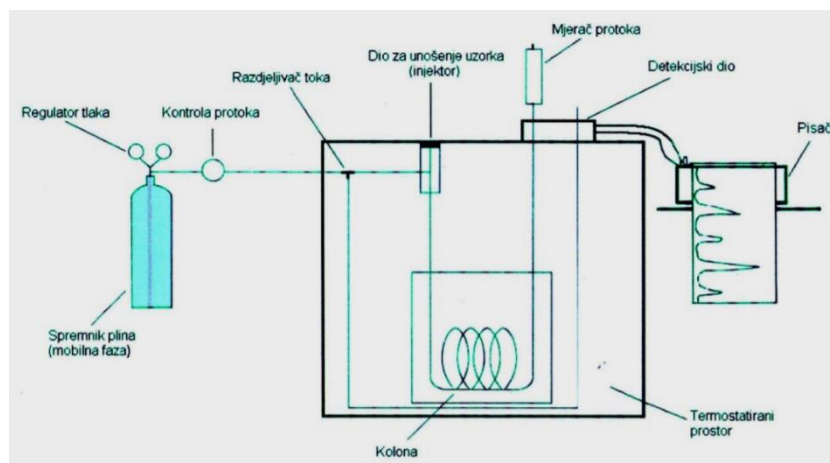
### 1.6.2. Analiza hlapljivih spojeva

Analiza hlapljivih spojeva se pretežno provodi vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Pod analizom hlapljivih spojeva podrazumijeva se identifikacija pojedinih sastojaka smjese, odnosno kvalitativna analiza te određivanje udjela identificiranih sastojaka u smjesi, odnosno kvantitativna analiza.

### 1.6.3. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija omogućava razdvajanje različitih komponenti iz smjese u kojoj se nalaze. Osnovne prednosti ove metode su brzina, jednostavnost i visoka osjetljivost. Uređaj za plinsku kromatografiju se sastoji od sljedećih dijelova:

- injekcijski blok
- kromatografska kolona
- termostat
- detektor
- pisač. (44)



**Slika 11.** Shematski prikaz plinskog kromatografa (43)

Uzorak se injektira pomoću injekcijske šprice, a samo injektiranje mora biti provedeno brzo te uzorak mora brzo i potpuno ispariti. Mobilna faza kod plinske kromatografije je inertni plin kojem je zadaća odjeljivanje hlapljivih spojeva te njihovo iznošenje iz kolone. Vrlo je bitno da je mobilna faza u potpunosti inertna kako ne bi došlo do reakcije s uzorkom ili stacionarnom fazom. Najčešće korišteni plinovi za mobilnu fazu su helij, dušik, vodik ili argon. Stacionarna faza je nehlapljiva tekućina koja je vezana za stijenke ili sorbens. (44)

Kromatografske kolone su smještene u termostatu kojem se ovisno o prirodi uzorka kontrolira temperatura, a mogu biti izrađene od metala, stakla ili plastike. Plinska kromatografija zahvaljujući svojoj visokoj osjetljivosti omogućava razdvajanje spojeva koji su u smjesi prisutni u vrlo malim koncentracijama. Ovom metodom se može odvajati veliki broj tvari, uključujući širok raspon njihovih vrelišta. Za primjenu plinske kromatografije u obradi uzorka jedini je uvjet odgovarajući tlak para pri temperaturi pogodnoj za odvajanje komponenti uzorka te njegova stabilnost pri istoj. Međutim, postoje i neki nedostaci ove metode:

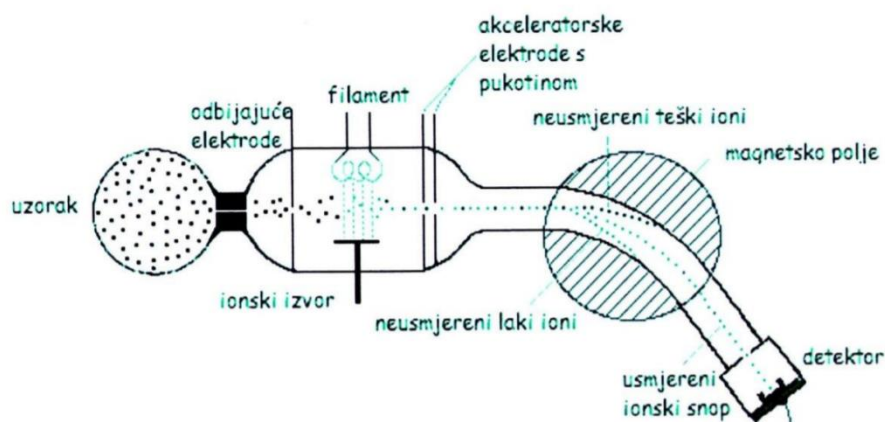
- 1) Razdvajanje komponenti smjese može biti nepotpuno.
- 2) Prilikom injektiranja uzorka, smjese hlapljivih spojeva, potrebno je voditi računa o razrijeđenosti. Naime, pri visokoj razrijeđenosti konstituyente prisutne u uzorku u manjoj koncentraciji nije moguće detektirati, a visoka koncentriranost uzorka dovodi do preplavlivanja kolone glavnim konstituentima što uzrokuje maskiranje pikova manjih konstituenata te njihovu otežanu identifikaciju.
- 3) Može biti vremenski duga ukoliko je cilj postupka izolacija svih hlapljivih spojeva.

4) Ako uzorak sadrži komponente visokog vrelišta potrebno je više vremena na postavljenoj temperaturi da bi došlo do njihovog eluiranja s kolone. Često se dogodi da se visoko vrijuće tvari dugo zadržavaju u koloni te je na taj način oštete.

Detektor za identifikaciju izoliranih spojeva kod plinske kromatografije može biti bilo koji uređaj koji na osnovu određenog fizikalnog ili kemijskog svojstva detektira prisutnost određene komponente. (44)

#### 1.6.4. Spektrometrija masa (MS)

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda kojom se može odrediti relativna molekulska masa spoja. MS je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari jer je spektar masa karakterističan za pojedinu tvar. Princip rada uređaja je da se molekule uzorka bombardiraju elektronima visoke energije koji uzrokuju izbijanje elektrona iz molekule te nastajanje molekulskog iona visoke energije sklonog cijepanju u fragmente. Nabijeni fragmenti, kationi, dolaze do detektora masa, gdje se razdvajaju prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja. Rezultati MS analize, maseni spektri, se prikazuju u obliku dijagrama. (45)



Slika 12. Schematski prikaz spektrometra masa (46)

Prednost spektrometrije masa je njena visoka osjetljivost i točnost. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se usporedbom masenog spektra tog spoja s masenim spektrom iz baza spektara poznatih tvari, tako da se nađe identičan maseni spektar. (45)

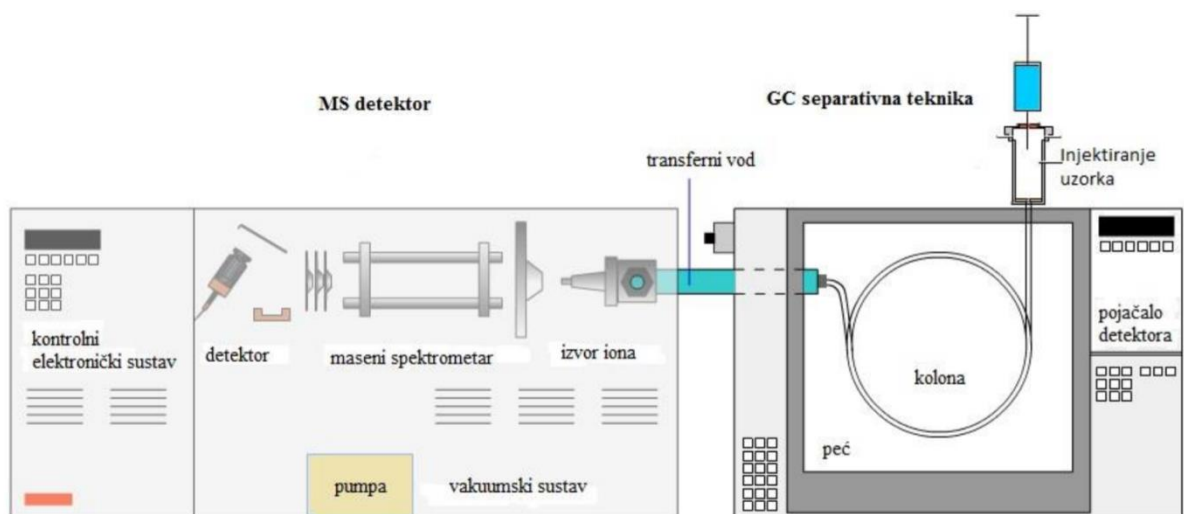
#### 1.6.5. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Kombinirana tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) omogućava dobivanje velikog broja



podataka uz korištenje minimalne količine materijala. Plinska kromatografija je izvrsna tehnika za separaciju i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje te se zato koristi u kombinaciji s masenom spektrometrijom koja anulira taj nedostatak. Kombinacijom dviju metoda postiže se visoka osjetljivost (reda veličine  $10^{-12}$  -  $10^{-15}$  g) te omogućava analiza smjese s velikim brojem komponenata relativno velikom brzinom. Četveropolni analizator masa omogućava snimanje spektra u nekoliko milisekundi. Iako je GC-MS tehnika vrlo osjetljiva poteškoće u analizi može izazvati slaba hlapljivost nekih spojeva ili njihova nestabilnost pri povišenim temperaturama (47).

Komponente smjese odjeljuju se u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa i kao takve odlaze plinom nositeljem u detektor (spektrometar masa). Dobiveni spektar masa uspoređuje se s računalnom bazom spektra masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega se može identificirati spoj. Međutim, GC-MS metoda daje još jedan važan podatak za identifikaciju spoja, a to je vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni odnosno retencijsko vrijeme (47).



**Slika 13.** Shematski prikaz GC-MS-a (48)

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Med od kadulje (*Salvia officinalis* L.)

Med od kadulje najčešće je svijetložute ili zelenkaste boje. Ugodnog je, pomalo gorkog okusa i jakog mirisa po kadulji.

Dobiva se iz cvijeta biljke kadulje koja je zbog svoje ljekovitosti stekla status svete biljke. Ova biljka je vrlo osjetljiva na zimu te zbog toga najviše raste na mediteranskom području, a cvate od svibnja do lipnja. U kontroliranim uvjetima može se uzgajati i u drugim dijelovima zemlje. Med od kadulje ima miris po cvijetu kadulje te je vrlo ljekovit sa snažnim antiseptičkim, umirujućim i antivirusnim djelovanjem. Posebno je dobar za bolesti dišnih organa kao što su bronhitis i suhi kašalj jer potiče izbacivanje sluzi iz organizma. Pospješuje mokrenje te se stoga preporučuje kao dodatak u biljnim čajevima protiv gihta i raznih reumatskih problema. Zbog svog umirujućeg djelovanja, brzo utječe na stanja nervoze i straha. Smanjuje napetost i stres, povećava energiju i poboljšava raspoloženje. (49)

Medu od kadulje treba duže vremena da se kristalizira jer sadrži više fruktoze od većine drugih vrsta meda te bi zbog toga mogli pomisliti da je zato slađi, ali nije. Okus mu je blag, a viši udio fruktoze doprinosi smanjenju glikemijskog indeksa. Većina kuhara preferira med od kadulje kod zaslađivanja jela jer je blagog okusa (49). Med od kadulje se još koristi u raznim kozmetičkim preparatima kao što su kreme, losioni i balzami.

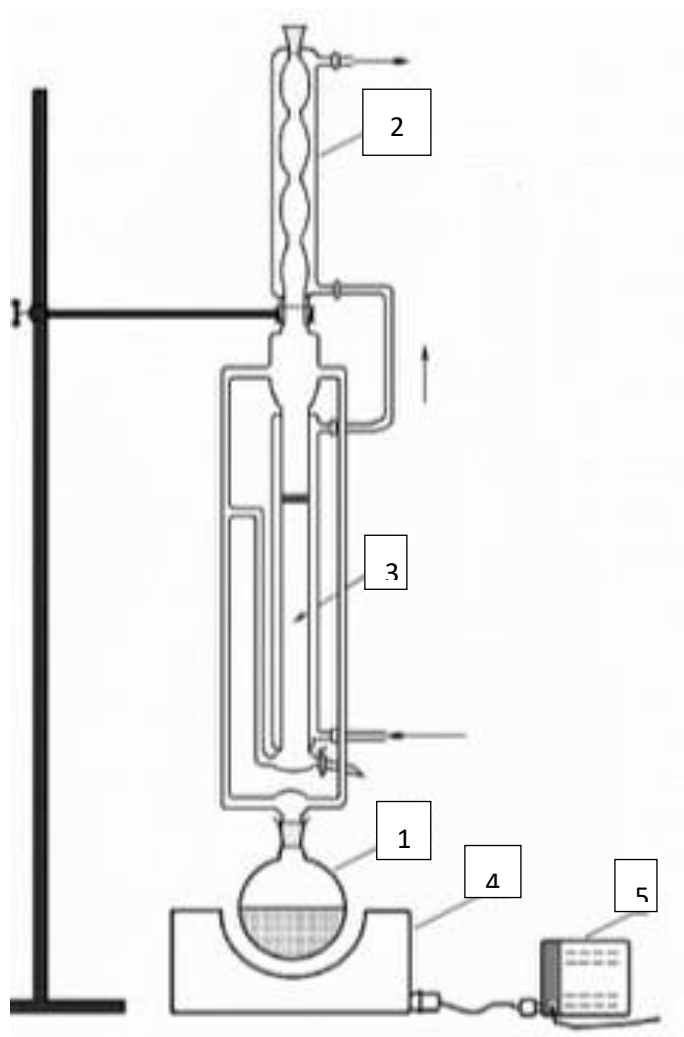
U ovom radu su korištena tri meda od kadulje pribavljena sa sajma "Dalmatina" iz 2018. godine, a njihova monoflornost je potvrđena u Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 2.2. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je provedena u modificiranoj aparaturi prema Clevengeru (slika 14). Masa od otprilike 50 g meda (3 uzorka) stavljena je u tikvicu od 500 mL te je dodano 100 mL destilirane vode. U središnju cijev aparature prema Clevengeru stavljena je destilirana voda i 2 mL organskog otapala, pentana koji predstavlja tzv. trap. Hidrodestilacija je provedena u trajanju od 2,5 h. Nakon završetka hidrodestilacije,

organski trap s hlapljivim spojevima je prebačen pipetom u staklenu bočicu od 5 mL te je otapalo upareno laganom strujom dušika do volumena 0,05 mL. Injekcijom je izvršeno ručno injektiranje u GC injektor (5  $\mu$ L) (50).

Iz vodenog dijela u središnjem dijelu aparature po Clevengeru, kao i vodeneotopine u tikvici za destilaciju uzeto je 2mL uzorka za daljnju izolaciju pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi koristeći automatski sustav PAL RSI.



- 1.tikvica s okruglim dnom
- 2. povratno hladilo
- 3.prostor za prihvat destilata
- 4.kalota za zagrijavanje
- 5.reostat

**Slika 14.** Shematski prikaz modificirane aparature prema Clevengeru (43).

### **2.3. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME)**

Vodene uzorak (2 mL), uzet iz centralnog dijela aparature po Clevengerukao i iz tikvice za destilaciju je stavljen u bočicu (20 mL) koja je hermetički zatvorena čepom na navoj koji sadrži PTFE / silikonsku septu.

Za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) korišten je automatizirani PAL RSI SPME držač s tipom vlakna s ovojnicom DVB / CAR / PDMS (divinilbenzen / karboksen / polidimetilsiloksan). Automatizirani PAL RSI eksperimentalni postupak sastojao se od sljedećih koraka:

- kondicioniranje SPME vlakna prema uputama Supelco Co.,
- miješanje uzorka (brzina miješanja: 250 okr / min; vrijeme miješanja: 5 sec.; vrijeme isključenja miješalice: 2 sec),
- ravnoteža tijekom 30 min na 60 °C,
- ekstrakcija isparljivih tvari 40 minuta bez miješanja i
- uvođenje SPME vlakna u GC injektor za desorpciju spojeva (7 min).

Kod statičke analize vršnih para koristi se automatska igla za rad PAL RSI sustava kojom se uzorkuju vršne pare iznad uzorka i izravno injektiraju u GC injektor (50).

### **2.4. Analiza hlapljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija spektrometrija masa (GC-MS)**

Analiza hlapljivih spojeva uzorka izvršena je plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa (GC-MS). Korišten je vezani sustav GC-MS proizvođača Agilent Technologies koji se sastoji od plinskog kromatografa 7820A, spektrometra masa 5977E te računala.



**Slika 15.** Vezani sustav plinska kromatografija i spektrometrija masa (50)

Analize su provedene na koloni sa nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS) gdje je stacionarna faza 5% difenil – 95% dimetilpolisiloksan; dimenzije kolone 30 m x 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,20  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj bio je helij protoka 1 mL/min dok su temperature injektora i detektora bile 250 °C i 280 °C, a energija ionizacije 70 eV.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja poznatih tvari prethodno analiziranih GC-MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju. Identifikacija je provedena i usporedbom spektara masa analiziranih spojeva sa spektrima masa iz literature ili komercijalne biblioteke spektara masa (Wiley i NIST).

Za svaki uzorak analiziran vezanim sustavom GC-MS dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima (udio površine pika u ukupnoj površini)
- vrijeme zadržavanja svake komponente
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente (sličnost je izražena u postocima). (50)

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Prikaz rezultata

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

Tablica 1. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzork I) izolirani metodom HD (hidrodestilacija).

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	0,99
2.	RI, MS	$\alpha$ -pinen	0,15
3.	RI, MS	benzaldehyd	1,27
4.	RI, MS	1,8-cineol	0,29
5.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	62,74
6.	RI, MS	$\gamma$ -terpinen	0,22
7.	RI, MS	linaloloksid*	0,47
8.	RI, MS	$\alpha$ -terpinolen	0,29
9.	RI, MS	aldehid jorgovana (izomer I)*	0,13
10.	RI, MS	aldehid jorgovana (izomer II)*	0,34
11.	RI, MS	nonanska kiselina	0,18
12.	RI, MS	karvakrol	1,18
13.	RI, MS	$\delta$ -3-karen	0,22
14.	RI, MS	heksanska kiselina	3,08
15.	RI, MS	heneikosan	0,45
16.	RI, MS	(Z)-oktadek-9-enska kiselina	8,22
17.	RI, MS	trikosan	13,24
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>93,01</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar, \*=točan izomer nije identificiran

Tablica 2. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzorak I) izolirani HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz centralnog dijela Clevenger aparature

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	0,65
2.	RI, MS	benzaldehid	3,90
3.	RI, MS	2-fenilacetaldehid	35,36
4.	RI, MS	eikosan	52,83
<i>Ukupno identificirano</i>			<b>92,74</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar

Tablica 3. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzorak I) izolirani HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz tikvice Clevenger aparature

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	0,16
2.	RI, MS	benzaldehyd	1,59
3.	RI, MS	benzil-alkohol	0,26
4.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	21,67
5.	RI, MS	2-feniletanol	0,83
6.	RI, MS	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,35
7.	RI, MS	eikosan	72,93
<i>Ukupno identificirano</i>			<b>92,74</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar

Tablica 4. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzork II) izolirani metodom HD (hidrodestilacija)

<b>Redni broj</b>	<b>Identifikacija</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	MS	2-furankarboksaldehid	0,80
2.	RI, MS	benzaldehyd	1,41
3.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	56,00
4.	RI, MS	$\gamma$ -terpinen	0,22
5.	RI, MS	oksid*	0,50
6.	RI, MS	nonanal	0,63
7.	RI, MS	aldehid jorgovana (izomer I)*	0,76
8.	RI, MS	aldehid jorgovana (izomer II)*	0,37
9.	RI, MS	nonanska kiselina	0,16
10.	RI, MS	timol	0,40
11.	RI, MS	heksanska kiselina	5,73
12.	RI, MS	heneikosan	0,67
13.	RI, MS	(Z)-oktadek-9-enska kiselina	9,57
14.	RI, MS	trikosan	19,20
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>96,24</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar, \*=točan isomer nije identificiran



Tablica 5. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzorak II) izolirani HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz središnjeg dijela Clevenger aparature

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	0,44
2.	RI, MS	benzaldehyd	3,99
3.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	28,40
4.	RI, MS	2-feniletanol	0,50
5.	RI, MS	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,21
6.	RI, MS	eikosan	60,13
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>93,67</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar

Tablica 6. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzorak II) izolirani HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz tikvice Clevenger aparature

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	0,31
2.	RI, MS	benzaldehyd	3,05
3.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	42,22
4.	RI, MS	2-feniletanol	0,17
5.	RI, MS	nonanska kiselina	0,83
6.	RI, MS	eikosan	44,66
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>91,24</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar

Tablica 7. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzork III) izolirani metodom HD (hidrodestilacija)

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	23,94
2.	RI, MS	$\alpha$ -pinen	0,10
3.	RI, MS	benzaldehyd	1,43
4.	RI, MS	benzil-alkohol	0,19
5.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	66,34
6.	RI, MS	$\gamma$ -terpinen	0,13
7.	RI, MS	linalol	0,12
8.	RI, MS	karvakrol	0,71
9.	RI, MS	heksanska kiselina	0,47
10.	RI, MS	(Z)-oktadek-9-enska kiselina	1,01
11.	RI, MS	trikosan	2,16
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>96,40</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar

Tablica 8. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzorak III) izolirani HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz središnjeg dijela Clevenger aparature

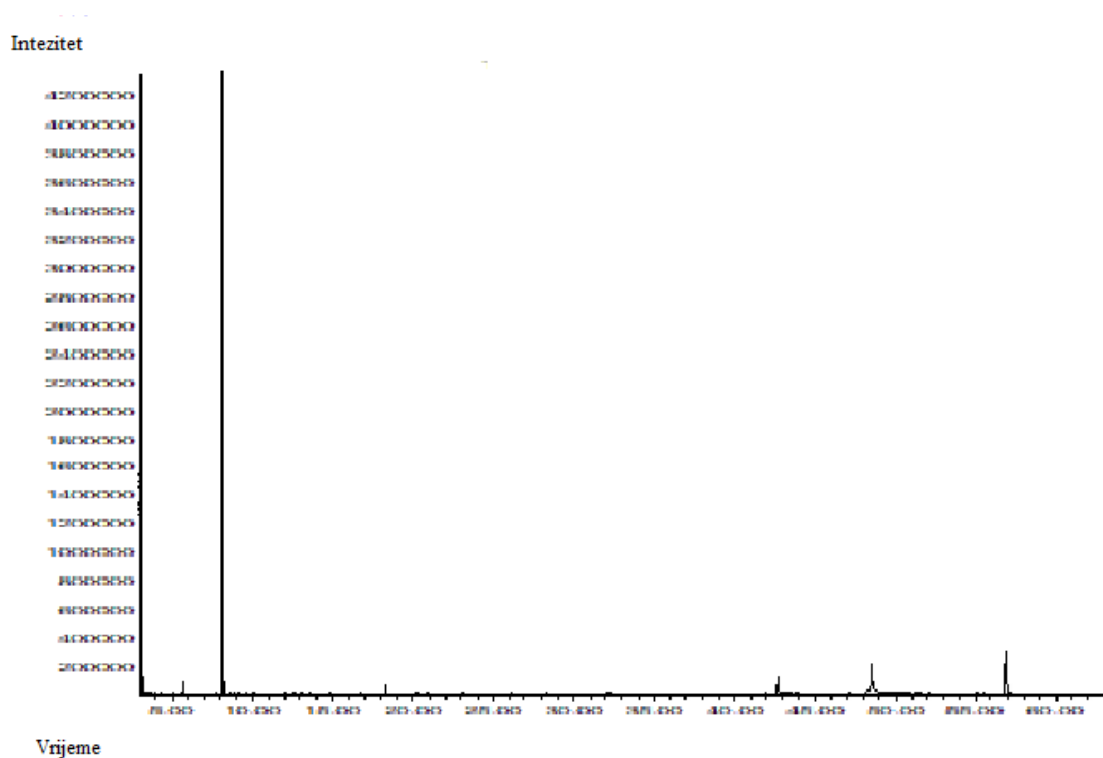
Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	0,31
2.	RI, MS	benzaldehyd	15,50
3.	RI, MS	benzil-alkohol	0,14
4.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	55,74
5.	RI, MS	2-feniletanol	0,14
6.	RI, MS	eikosan	22,10
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>93,93</b>

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar

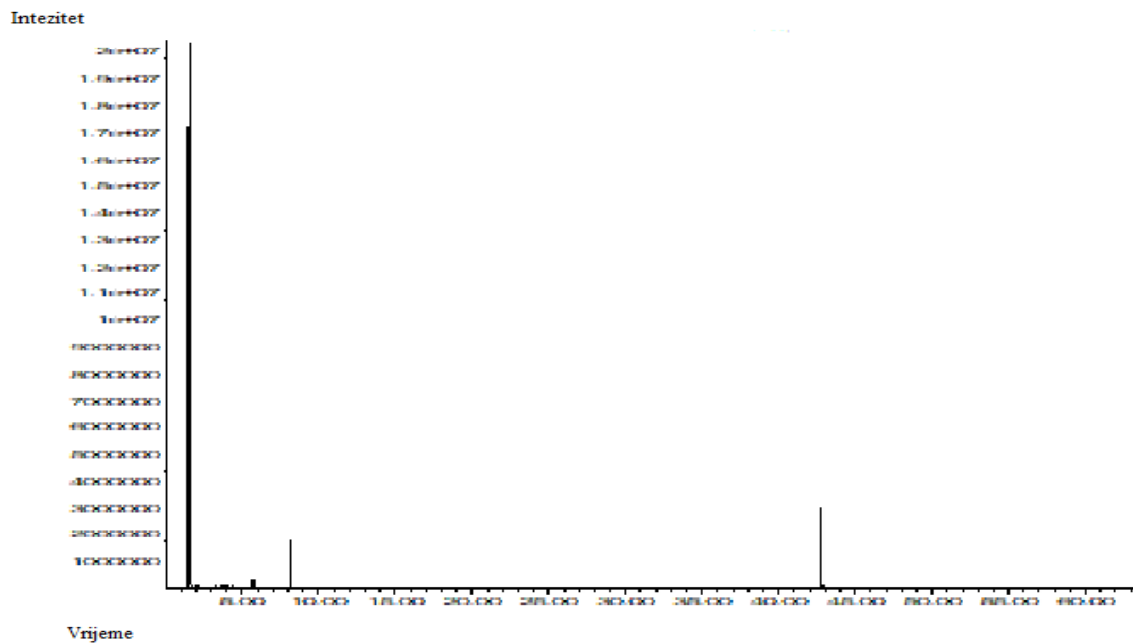
Tablica 9. Hlapljivi spojevi meda od kadulje (uzorak III) izolirani HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz tikvice Clevenger aparature

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2-furankarboksaldehid	12,78
2.	RI, MS	benzaldehyd	9,78
3.	RI, MS	benzil-alkohol	0,41
4.	RI, MS	2-fenilacetaldehyd	63,89
5.	RI, MS	2-feniletanol	1,22
6.	RI, MS	eikosan	1,32
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b><i>89,40</i></b>

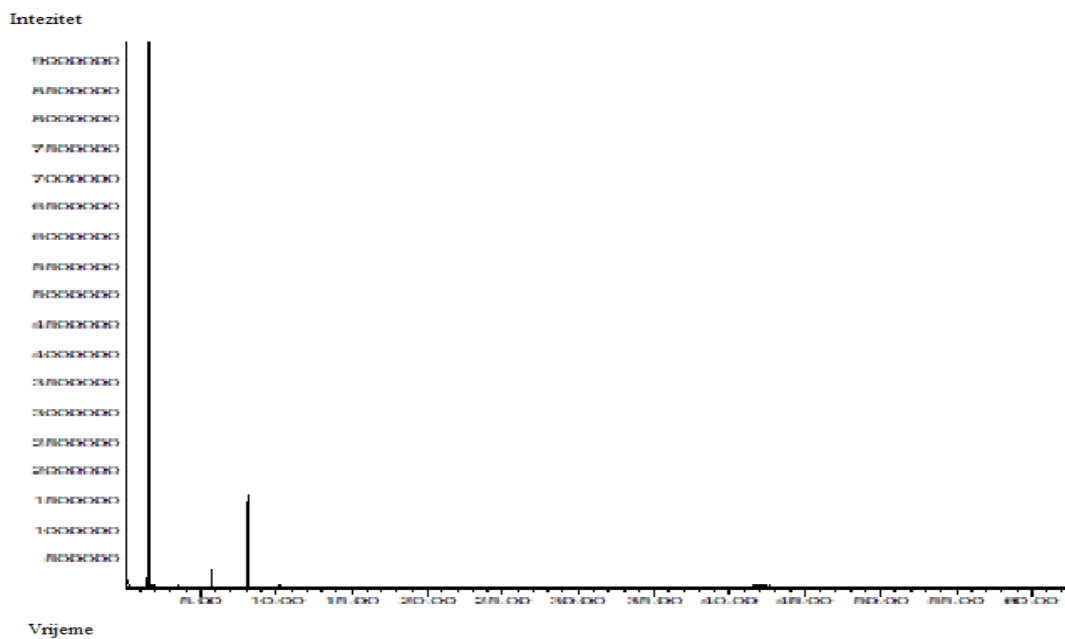
RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar



**Slika 16.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od kadulje (uzorak I) izoliranih metodom HD (hidrodestilacija)



**Slika 17.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od kadulje (uzorak II) izoliranih HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz središnjeg dijela Clevenger aparature



**Slika 18.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda od kadulje (uzorak III) izoliranih HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz tikvice Clevenger aparature

## 4.RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti hlapljive spojeve meda od kadulje. Hlapljivi spojevi meda od kadulje izolirani su hidrodestilacijom (HD) u modificiranoj aparaturi po Clevengeru te mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) iz vodenog dijela uzetog iz središnjeg dijela aparature po Clevengeru kao i iz tikvice za destilaciju. Na taj način su dobivena tri uzorka hlapljivih spojeva, destilat i dva uzorka vršnih para.

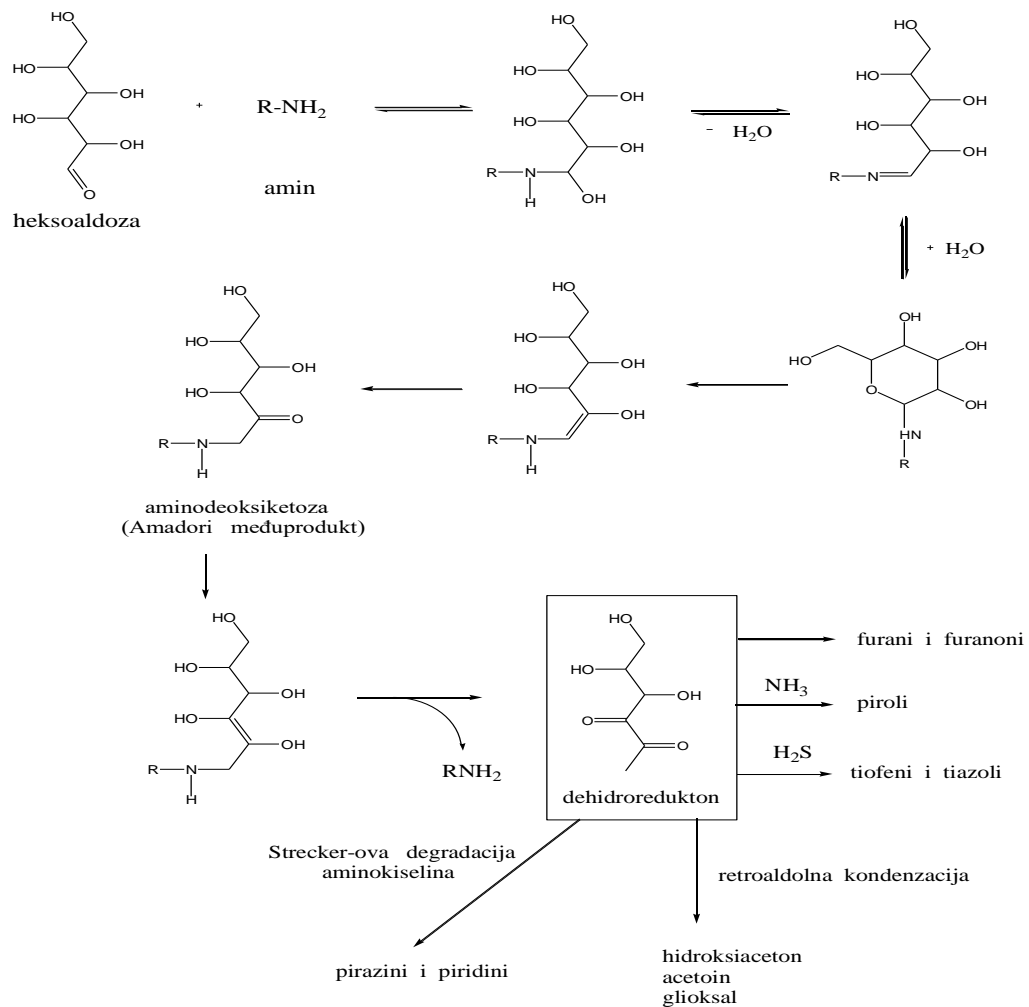
Iz tablica 1, 4 i 7 vidljivo je daje među hlapljivim spojevima izoliranim hidrodestilacijom najzastupljeniji 2-fenilacetaldehid (56,00-66,34%). Drugi količinski važni spojevi su trikosan (2,16-19,20 %) i (Z)-oktadek-9-enska kiselina (1,01-19,57 %). Izuzetak je uzorak III (tablica 7) u kojem je identificiran 2-furankarboksaldehid (23,94 %) u znatno većem postotku nego u uzorcima I i II. U uzorcima I i II su nađeni izomeri aldehida jorgovana, dok kod uzorka III taj spoj nije pronađen. Aldehidi jorgovana mogu se koristiti kao potencijalni biomarkeri za med od drače (51), a to se može pripisati tome što biljke kadulja i drača mede u istom vremenskom periodu (mjesecu svibnju). Niti u jednom uzorku nisu identificirani norizoprenoidi, derivati karotenoida (derivati 3,5,5-trimetilcikloheks-2-ena), koji se mogu koristiti kao potencijalni biomarkeri za kaduljin med:  $\alpha$ -izoforon, 4-ketoizoforon i 2-hidroksiizoforon (41). Ostali spojevi su zastupljeni u manjem postotku.

Iz tablica 2, 5 i 8 vidljivo je da su najzastupljeniji hlapljivi spojevi izolirani HS-SPME metodom iz vodenog dijela uzetog iz centralnog dijela aparature po Clevengeru: eikosan (22,10-60,13 %), 2-fenilacetaldehid (28,40-55,74%) i benzaldehid (3,90-15,50 %).

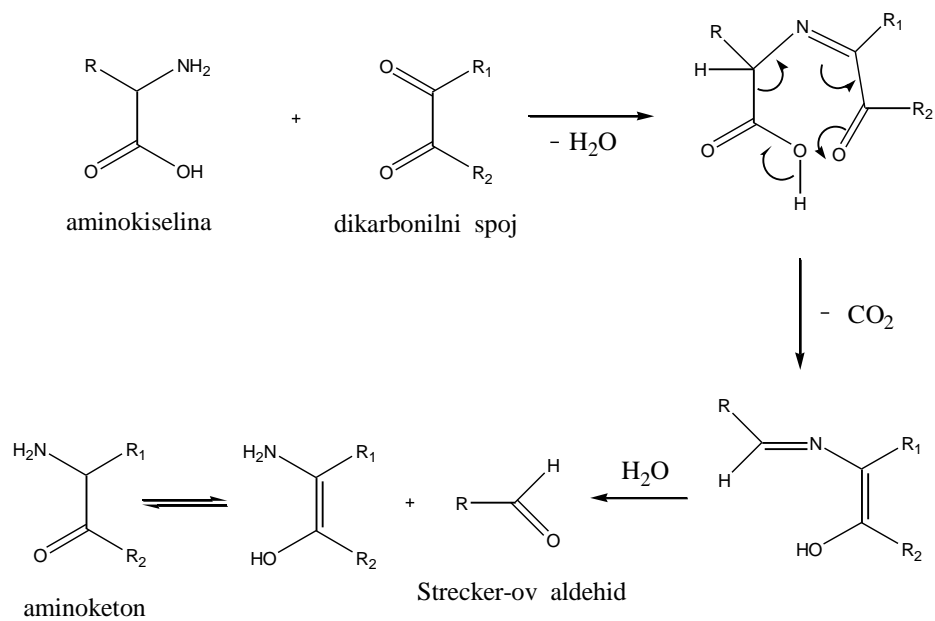
U tablicama 3, 6 i 9. dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u uzorcima izoliranim HS-SPME metodom iz vodene otopine uzete iz tikvice za destilaciju. Vidljivo je da su najzastupljeniji hlapljivi spojevi eikosan (72,93 % u uzorku I i 44,66 % u uzorku II) i 2-fenilacetaldehid (21,67 % u uzorku I, 42,22 % u uzorku II i 63,89% u uzorku III). 2-Furankarboksaldehid je nađen u uzorku III sa većim postotkom (12,78%). Benzaldehid je pronađen u sva tri uzorka (1,59-9,78%).

Spojevi kao što su 2-fenilacetaldehid i 2-furankarboksialdehid (52) su najčešće produkti Maillardovih reakcija (**Slika 19**) i Streckerovih degradacija. Maillardove reakcije se temelje na kondenzaciji 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: hidrosketoni, dikarbonilni spojevi, derivati furfurala i furanona i drugi spojevi, a koji dalje mogu biti reaktanti kod Streckerovih degradacija aminokiselina. Streckerova degradacija aminokiselina temelji se na dekarboksilaciji i deaminaciji aminokselina u prisutnosti dikarbonilnih spojeva pri čemu nastaje Streckerov aldehyd i aminoketon (Slika 20). (41)



Slika 19. Opća shema Maillard-ove reakcije (53)



**Slika 20.** Opća shema Strecker-ovih degradacija aminokiselina (41)

## 5.ZAKLJUČAK

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

- Cilj ovog istraživanja, određivanja kemijskog profila, odnosno sastava i udjela hlapljivih spojeva meda od kadulje je ostvaren.
- Hlapljivi spojevi izolirani su hidrodestilacijom (HD) u aparaturi po Clevengeru. Također, mikroekstarakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) izolirani su hlapljivi spojevi iz vodenog dijela uzetog iz središnjeg dijela aparature po Clevengeru, kao i iz tikvice za destilaciju.
- U istraženim uzorcima hlapljivih spojeva nisu pronađeni karakteristični hlapljivi spojevi meda od kadulje koji su pronađeni u prethodnim istraživanjima.
- U svim uzorcima jedan od najzastupljenijih spojeva je 2-fenilacetaldehid, produkt Streckerovih degradacija aminokiselina.
- Veći postotak 2-fenilacetaldehida, eikosana, trikosana i 2-furankarboksaldehida može se pripisati utjecaju toplinske obrade (temperature veća od 100 °C) i uvjeta skladištenja (uzorci iz 2018. godine) meda od kadulje.



## 6.LITERATURA

1. Pravilnik o medu (NN 53/2015)
2. <http://www.heathmonthoney.com.au/bees/HoneyHistory.html>(preuzeto 25.7.2020.)
3. <https://hr.play-azlab.com/obrazovanje/85522-istoriya-meda-interesnye-fakty-i-pervye-upominaniya-o-mede.html> (preuzeto 25.7.2020)
4. Batinić K.,Priručnik o medu. Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru,2014.
5. <https://www.centarzdavlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/kratka-povijest-meda/>(preuzeto 28.7.2020.)
6. <https://www.primarna-medicina.com/med-vosak-nepobedivi-tandem/> (preuzeto28.7.2020.)
7. <https://bebetto.info/razpechatka/> (preuzeto 28.7.2020.)
8. <http://pcelarstvo-dobranic.hr/proizvodi/med/> (preuzeto 28.7.2020.)
9. Sajko K, Odak M, Bubalo D, Dražić M, Kezić N. Razvrstavanje meda prema biljnom podrijetlu uz pomoć peludne analize i električne provodljivosti. Hrvatska pčela. 1996; 10:193- 196.
10. Persano OL, Piana L, Bogdanov S, Bentabol A, Gotsiou P, Kerkivliet J, Martin P, Morlot M, Valbuena Ortiz A, Ruoff K, Von der Ohe K. Botanical species giving unifloral honey in Europe. Apidologie. 2004; 82-93.
11. Aljinović D. Fitokemijske karakteristike i primjena meda u farmakognoziji, Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet u Splitu. Split2015.
12. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda(NN 20/00)
13. <https://webshop.gligora.com/shop/cijena/med-medljikovac1> (preuzeto 29.7.2020.)
14. Krell R, Value-added products from bee keeping. Ch. 2. FAO Agricultural Services Bulletin 1996:124.
15. Batinić K , Palinić D. Priručnik o medu, Agronomski i prehrambeno- tehnološki fakultet Mostar, BiH, 2014.
16. Škenderov S., Ivanov C. Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje, Nolit, Beograd, 1986.
17. Barhate R. S., Subramanian, R., Nandini, K. E., Hebbar, H. U. Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes. J. Food Eng. 2003;60, 49- 54

18. Mendes, E., Brojo Proenca, E., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Ferreira, M. A. Quality evaluation of Portuguese honey, *Carb. Pol.* 1998;37, 219- 223.
19. Singhal R.S., Kulkarni P.R., Rege D.V. Handbook of indices of food quality. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 1997; 358-379.
20. Mateo R., Bosch-Reig F. Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. *Food Chem.*1997; 60, 33-41.
21. Zamora MC, Chirife J. Determination of water activity change due to crystallization in honey from Argentina. *Food Cont.* 2004; 38:342-347.
22. Flanjak I. Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja. Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek 2012.
23. Anupama D., Bhat K.K., Sapna V.K., Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International* 2003;36 (2), 183-191.
24. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 63:549-562, 1998.
25. Kapš P. Liječenje pčelinjim proizvodima Apiterapija, Geromar, Udruga Dobar život, Zagreb 2013.
26. Laktić Z. i Šukelja D. Suvremeno pčelarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb 2008.
27. Vahčić, N., Matković, D. (2009): Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda, <http://documents.tips/documents/kemijske-fizikalne-i-senzorske-karakteristikameda.html> (preuzeto 7.8.2020.)
28. Tucak, Z., Bačić, T., Horvat, S., Puškadija, Z. Pčelarstvo, Poljoprivredni fakultet, Osijek 1999.
29. Ojeda de Rodríguez, G., Sulbarán de Ferrer, B., Ferrer, A., Rodríguez, B. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chem.*2004; 84, 499-502
30. Cushnie T.P.T., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26: 343-356
31. Linden T, Cohen A, Deppisch R, Kjellstrand P, Wieslander A. 3,4-Dideoxyglucosone3-ene (3,4-DGE): A cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int.*2002; 62; 697-703.
32. Ajlouni S, Sujirapinyokul P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. *Food Chem.* 2010; 119: 1000-1005.
33. <https://sh.wikipedia.org/wiki/Hidroksimetilfurfural> (preuzeto 9.8.2020.)
34. Lazaridou A., Biliaderis C.G., Bacandritsos N., Sabatini A. G. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *J. Food Eng.* 2004; 64, 9-21.

35. Abu-Jdayil B, Ghzawi AA-M, Al-Malah KIM, Zaitoun S. Heat effect on rheology of light- and dark-colored honey. *J. Food Eng.* 2002; 51:33-38.
36. Mujić I., Alibabić V., Travnjanin D. Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda, Veleučilište u rijeci, 2014.
37. <https://receptiasmir.wordpress.com/2016/11/11/postupak-s-kristaliziranim-medom/> (preuzeto 12.8.2020.)
38. Bogdanov, S., Lullmann, C., Martin, P. Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Commission. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 1999;90, 108-125.
39. National Honey Board, Honey's Nutrition and Health Facts. Longmon, Colorado, USA, 2005.
40. <https://www.lamieleria.com/en/types-of-honey/> (preuzeto 14.8.2020.)
41. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom I mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda, Doktorska dizertacija. Osijek Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2014.
42. Marević M. Profil hlapljivih spojeva i antioksidacijski potencijal. Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split 2015; 1.
43. I. Jerković, A. Radonić, Praktikum iz organske kemije, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.
44. Blažević, I. Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
45. A. Radonić, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
46. I. Blažević. Predavanja iz Organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
47. Silić A. Glukozinolatni profil u biljkama *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiola incana* (L.) BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima. Diplomski rad. Split, Hrvatska; Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2018.
48. Sutlović D. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011.
49. <https://emerkato.hr/blog/otkrijte-neke-zanimljivosti-o-medu-kadulje.html> (preuzeto 16.8.2020.)

50. Stipanović N. Isparljivi organski spojevi invazivne crvene alge *Aasparagopsis taxiformis* (rhodophyta): Halogenirani ugljikovodici, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2020.
51. Jerković I, Tuberoso C.I.G, Marijanović Z., Jelić M., Kasum A: Headspace, volatile and semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin, *Food Chemistry* 112: 239-245, 2009.
52. Martins S.I.F.S., Jongen W.M.F., Van Boeckel M.A.J.S.: A review of Maillard reactions in food and implications to kinetic modelling, *Trends in Food Science&Technology* 11: 364-373, 2001.
53. O'Hare W.T, Grigor J.: Flavor generation in food, in Rowe D.J. (ed.) *Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Oxford, Blackwell Publishing Ltd: UK, 2005.