

# Hlapljivi spojevi kestenovog meda

---

Usanović, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:167:373004>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**

Repository / Repozitorij:

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



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI KESTENOVOG MEDA**

**Završni rad**

**KATARINA USANOVIĆ**

**Matični broj: 385**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**Preddiplomski studij kemije**

**HLAPLJIVI SPOJEVI KESTENOVOG MEDA**

**Završni rad**

**KATARINA USANOVIĆ**

**Matični broj: 385**

**Split, rujan 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

**Undergraduate study of chemistry**

**VOLATILE COMPOUNDS OF CHESTNUT HONEY**

**Bachelor thesis**

**KATARINA USANOVIĆ**

**Parent number: 385**

**Split, september 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije, Kemija

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemija  
**Tema rada** je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta  
**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić  
**Pomoć pri izradi:** Doc. dr. sc. Marina Zekić

### HLAPLJIVI SPOJEVI KESTENOVOG MEDA

Katarina Usanović, 385

#### Sažetak:

Med je slatki proizvod kojeg proizvode pčele složenom obradom prikupljenog cvjetnog nektara i sekreta biljnih sokova. U njemu su sadržani gotovo svi esencijalni sastojci ljudskog organizma. Primjenu nalazi u kulinarstvu, medicini i kozmetici. Aroma predstavlja jedno od najvažnijih svojstava meda koje doprinosi njegovoj kvaliteti, a nosioci arome u medu su hlapljivi spojevi.

U ovom završnom radu određen je profil hlapljivih spojeva meda dobivenog od Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz diklormetan kao otapalo. Izolirani spojevi iz diklormetanskog ekstrakta, analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija. Glavni hlapljivi spojevi u svim ekstraktima meda kestena su 4-hidroksikinolin i *p*-aminoacetofenon, uz izuzetak jednog uzorka u kojem je glavni hlapljivi spoj 2-feniloctena kiselina, a karakterizira ga i visoki udio 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona. Derivati benzena, 2-feniloctena kiselina i *p*-aminoacetofenon, glavni hlapljivi spojevi u USE ekstraktima kestenovog meda, karakteristični su za med kestena te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla. Prema rezultatima ovog rada i spoj s dušikom, alkaloid 4-hidroksikinolin bi također mogao biti karakteristični marker botaničkog porijekla kestenovog meda.

**Ključne riječi:** kestenov med, hlapljivi spojevi, ultrazvučna ekstrakcija, plinska kromatografija, masena spektrometrija

**Rad sadrži:** 49 stranica, 17 slika, 5 tablica, 31 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

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

#### Datum obrane:

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Chemistry  
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6  
**Mentor:** Ani Radonić, PhD, associate professor  
**Technical assistance:** Marina Zekić, PhD, assistant professor

### VOLATILE COMPOUNDS OF CHESTNUT HONEY

Katarina Usanović, 385

#### Abstract:

Honey is a sweet product produced by bees by complex processing of collected flower nectar and secretions of plant juices. It contains almost all the essential ingredients needed by the human body. It is used in cooking, medicine and cosmetics. The aroma is one of the most important properties of honey that contributes to its quality, and the carriers of aroma in honey are volatile compounds.

In this thesis, the profile of volatile compounds of honey obtained from the Department of Fisheries, Beekeeping, Hunting and Special Zoology of the Faculty of Agriculture, University of Zagreb is determined. At the same Institute, the monoflorality of the chestnut mode was confirmed by melisopalinological analysis. Ultrasonic assisted extraction with dichloromethane as solvent was used to isolate the volatile compounds. Isolated compounds from the dichloromethane extract were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry. The main constituents in all extracts of chestnut honey are 4-hydroxyquinoline and *p*-aminoacetophenone, with the exception of one extract in which the main volatile compound is 2-phenylacetic acid, and it is also characterized by a high content of 3-hydroxy-4-phenylbutan-2-one. Benzene derivatives, 2-phenylacetic acid and *p*-aminoacetophenone, are characteristic of the chestnut honey and can be considered as markers of its botanical origin. According to the obtained results, nitrogen containing compound alkaloid 4-hydroxyquinoline could also be considered as a potential marker of the botanical origin of chestnut honey.

**Keywords:** chestnut honey, volatile compounds, ultrasonic extraction, gas chromatography, mass spectrometry

**Thesis contains:** 49 pages, 17 figures, 5 tables, 31 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

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

#### Defence date:

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od svibnja do rujna 2021. godine.*



## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na potpori, motivaciji i razumijevanju tijekom dosadašnjeg studiranja.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na ukazanoj prilici, pristupačnosti, korisnim savjetima i stručnoj pomoći koji su mi olakšali izradu završnog rada.*

*Također se zahvaljujem i doc. dr. sc. Marini Zekić na pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela završnog rada.*

***Katarina Usanović***

### **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Izolirati hlapljive spojeve kestenovog meda metodom ultrazvučne ekstrakcije koristeći diklormetan kao organsko otapalo te odrediti profil hlapljivih spojeva analizom pomoću plinske kromatografije-spektrometrije masa.

## SAŽETAK

Med je slatki proizvod kojeg proizvode pčele složenom obradom prikupljenog cvjetnog nektara i sekreta biljnih sokova. U njemu su sadržani gotovo svi esencijalni sastojci potrebni ljudskom organizmu. Primjenu nalazi u kulinarstvu, medicini i kozmetici. Aroma predstavlja jedno od najvažnijih svojstava meda koje doprinosi njegovoj kvaliteti, a nosioci arome u medu su hlapljivi spojevi.

U ovom završnom radu određen je profil hlapljivih spojeva meda dobivenog od Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na istom Zavodu melisopalinološkom analizom potvrđena je monoflornost kestenovog meda. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz diklormetan kao otapalo. Izolirani spojevi iz diklormetanskog ekstrakta, analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija. Glavni hlapljivi spojevi u svim ekstraktima meda kestena su 4-hidroksikinolin i *p*-aminoacetofenon, uz izuzetak jednog uzorka u kojem je glavni hlapljivi spoj 2-feniloctena kiselina, a karakterizira ga i visoki udio 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona. Derivati benzena, 2-feniloctena kiselina i *p*-aminoacetofenon, glavni hlapljivi spojevi u USE ekstraktima kestenovog meda, karakteristični su za med kestena te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla. Prema rezultatima ovog rada i spoj s dušikom, alkaloid 4-hidroksikinolin bi također mogao biti karakteristični marker botaničkog porijekla kestenovog meda.

**Ključne riječi:** med kestena, hlapljivi spojevi, ultrazvučna ekstrakcija, plinska kromatografija, masena spektrometrija

## SUMMARY

Honey is a sweet product produced by bees by complex processing of collected flower nectar and secretions of plant juices. It contains almost all the essential ingredients needed by the human body. It is used in cooking, medicine and cosmetics. The aroma is one of the most important properties of honey that contributes to its quality, and the carriers of aroma in honey are volatile compounds.

In this thesis, the profile of volatile compounds of honey obtained from the Department of Fisheries, Beekeeping, Hunting and Special Zoology of the Faculty of Agriculture, University of Zagreb is determined. At the same Institute, the monoflorality of the chestnut mode was confirmed by melisopalinalogical analysis. Ultrasonic assisted extraction with dichloromethane as solvent was used to isolate the volatile compounds. Isolated compounds from the dichloromethane extract were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry. The main constituents in all extracts of chestnut honey are 4-hydroxyquinoline and p-aminoacetophenone, with the exception of one extract in which the main volatile compound is 2-phenylacetic acid, and it is also characterized by a high content of 3-hydroxy-4-phenylbutan-2-one. Benzene derivatives, 2-phenylacetic acid and p-aminoacetophenone, are characteristic of the chestnut honey and can be considered as markers of its botanical origin. According to the obtained results, nitrogen containing compound alkaloid 4-hydroxyquinoline could also be considered as a potential marker of the botanical origin of chestnut honey.

**Keywords:** chestnut honey, volatile compounds, ultrasonic extraction, gas chromatography, mass spectrometry

|  |           |
|--|-----------|
| <b>UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1. OPĆI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>1.1. MED</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>1.1.1. Pčele</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>1.1.2. Vrste meda</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>1.1.3. Kemijski sastav meda</b> .....                                   | <b>5</b>  |
| <b>1.1.4. Fizikalna svojstva meda</b> .....                                | <b>7</b>  |
| <b>1.1.5. Senzorska svojstva meda</b> .....                                | <b>9</b>  |
| <b>1.2. Hlapljivi spojevi u medu</b> .....                                 | <b>11</b> |
| <b>1.2.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva</b> .....                    | <b>11</b> |
| <b>1.2.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE)</b> .....     | <b>12</b> |
| <b>1.2.2. Analiza hlapljivih spojeva</b> .....                             | <b>14</b> |
| <b>1.2.2.1. Plinska kromatografija (GC)</b> .....                          | <b>14</b> |
| <b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>2.1. Kestenov med</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>2.2. Kemikalije i aparatura</b> .....                                   | <b>18</b> |
| <b>2.3. Izolacija i analiza hlapljivih spojeva</b> .....                   | <b>18</b> |
| <b>2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija (USE)</b> .....                          | <b>18</b> |
| <b>2.3.2. Koncentriranje frakcijskom destilacijom</b> .....                | <b>19</b> |
| <b>2.3.3. Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS)</b> ..... | <b>20</b> |
| <b>3. REZULTATI</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>4. RASPRAVA</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>4.1. Hlapljivi spojevi kestenovog meda</b> .....                        | <b>30</b> |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....   | <b>36</b> |

## UVOD

Med je najsvršeniji proizvod prirode jer su u njemu sadržani gotovo svi sastojci koji grade ljudski organizam. To je proizvod medonosnih pčela koji nastaje složenom obradom prikupljenog cvjetnog nektara i sekreta biljnih sokova.<sup>1</sup> Zbog svoje široke primjenjivosti, kojom se malo koji drugi proizvod može pohvaliti, neizostavan je u kulinarsstvu, medicini, kozmetici i konzerviranju namirnica. Upravo zbog toga opravdava naziv „tekuće zlato“. Danas je med iznimno cijenjen prirodni proizvod zbog znanstveno dokazane kvalitete i mnogobrojnih dobrobiti za ljudski organizam i očuvanje onog najvrjednijeg – zdravlja.

Dugo vremena, med je bio jedini zaslađivač koji je bio široko dostupan ljudima prije masovne proizvodnje šećera. Povijest meda je zapravo starija od povijesti čovjeka i svakako starija od povijesti moderne medicine. Čovjek skuplja med još od kamenog doba. Znanstvenici vjeruju da je med još i stariji – smatra se da su pčele i tvar nalik medu postojale još od prije 100 milijuna godina.<sup>2</sup> Prvi otkriveni slikovni dokaz o korištenju meda nađen je u Egiptu, a datira iz 7. tisućljeća prije Krista. Opisan je u drevnim egipatskih hijeroglifima, a spominje se i u indijskoj Vedi, židovskoj Tori, Kuranu i kineskom Shi Jingu. Grčki liječnik Hipokrat, otac moderne medicine, pisao je o ljekovitim svojstvima meda i njegovoj primjeni vjerujući kako dobro utječe na ten i kožu. Julije Cezar je navodno prihvatio med kao vrstu valute koja je zamijenila zlato pri plaćanju poreza. Osim toga, Rimljani su koristili med kao antiseptik za liječenje rana u svojim bitkama, ali i kao poklon za svoje bogove. Upravo zato, povijest meda pokazuje da je on vodeći antibiotik koji se koristio za otvorene rane i ozljede, čak i prije otkrića penicilina. U istu svrhu se koristi i danas.

Med je čudesan ponajprije zbog svoje dugovječnosti. Arheolozi su otkrili 2 000 godina stare staklenke meda u egipatskim grobnicama i, usudivši se probati, došli su do zaključka da je med još uvijek ukusan. Dakle, zahvaljujući svom kemijskom sastavu, niskom sadržaju vode i relativno visokoj kiselosti, u medu je niski pH (3,2-4,5) koji je neprikladan za razvoj bakterija i drugih mikroorganizama.<sup>3</sup>

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. MED

*Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva* u svom Pravilniku o medu („Narodne novine“, br. 30/2015) iznosi definiciju meda (slika 1): „Med jest prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.“<sup>4</sup>



Slika 1. Med

Zbog tipičnog kemijskog sastava, med je kalorično vrijedna hrana za odrasle i djecu. Kilogram meda daje toliko energije koliko 3 kg svježeg mesa, 5 litara mlijeka, 3 kg slatkovodne ribe, kilogram šunke, 6 kg naranči ili 3 kg banana.<sup>5</sup> Iako predstavlja bolji izbor od rafiniranog šećera, potrebno ga je umjereno konzumirati. Pretjeranom uporabom podiže se razina šećera u krvi čime se potiče gušterača na lučenje inzulina, a tijelo na skladištenje masti što dovodi do debljanja. Time se osoba dovodi u opasnost od razvoja srčanih bolesti ili bolesti jetre.<sup>6</sup>

### 1.1.1. Pčele

Pčele ulažu znatan trud kako bi medu podarili takva „magična“ svojstva. Čovjeku je zapravo važna samo jedna vrsta pčela, a to je medonosna pčela ili pčela medarica (lat. *Apis mellifera*, slika 2) iz roda opnokrilaca (*Hymenoptera*).



Slika 2. Medonosna pčela

One imaju vjerojatno jednu od najvažnijih uloga u ekosustavu. Lete od cvijeta do cvijeta skupljajući vodenastu slatku tekućinu – nektar i pelud koje nose u košnicu. Usta su im građena od prednjeg dijela kojim grizu i stražnjeg dijela koji je zapravo rilce pomoću kojega spremaju nektar. Poznato je 28 različitih rasa medonosnih pčela koje se dijele u četiri skupine:

- tamne ili crne pčele sjeverne i zapadne Europe te sjeverne Afrike
- pčele Balkana i susjednih područja
- pčele Bliskog istoka
- tropske pčele.<sup>5</sup>

Pčele radilice u košnicu mogu ponijeti nektar u količini polovice težine svog tijela. Tijekom putovanja, dodaju mu vlastite enzime koji počinju mijenjati kemijska svojstva nektara, od složenih do jednostavnih šećera. Na taj način, one invertiraju veću količinu saharoze u glukozu i fruktozu, glavne sastojke meda. Nakon ulaska u košnicu, pčela radilica žvače kap nektara i izlaže ga zraku. Tim procesom smanjuje se sadržaj tekućine iz inicijalno vodenastog nektara. Kako bi još dodatno smanjila sadržaj vode, pčela radilica potiče kruženje zraka oko saća intenzivnim mahanjem krilima. Taj se postupak odvija sve dok se sadržaj vode ne smanji na oko 19 % te tada nastaje med. Tada pčele zatvaraju ćeliju tankim slojem svježeg voska i tako čuvaju med za buduću upotrebu.

Kada će med biti spreman za branje, u prvom redu ovisi o vrsti i obilju cvijeća, usjeva i drveća u radijusu od 5 km oko košnica. S druge strane, vrijeme ispaše ovisi o brojnim drugim faktorima, među kojima su najvažnije vremenske prilike.<sup>7</sup>



### 1.1.2. Vrste meda

Prema Pravilniku o medu („Narodne novine“, br. 46/07, 155/08), med se svrstava prema porijeklu medonosnih biljaka ili medne rose ili prema načinu proizvodnje i/ili prezentacije proizvoda.<sup>8</sup>

Podjela meda prema podrijetlu medonosnih biljaka i medne rose:

- Cvjetni ili nektarni med
- Medljikovac ili medun.

Nektarni med je proizvod medonosnih pčela od raznovrsnih cvjetova medonosnih biljaka kao što su lipa, bagrem, kadulja, lavanda i dr. Razlikuje se monoflorni (sortni) i poliflorni (cvjetni) nektarni med. Da bi se neki med mogao proglasiti monoflornim, udjel peludnih zrnaca određene biljne vrste mora imati specifičan okus i miris označene medonosne bilje i mora biti u skladu s najmanjim propisanim udjelom peludnih zrnaca pojedine biljne vrste u netopljivom sedimentu koji iznosi 45%. Cvjetni ili poliflorni med predstavlja mješavinu meda različitih vrsta biljaka. Boja nektarnog meda može varirati od blijedo žute do zagasito tamne boje.<sup>3,7,9</sup>

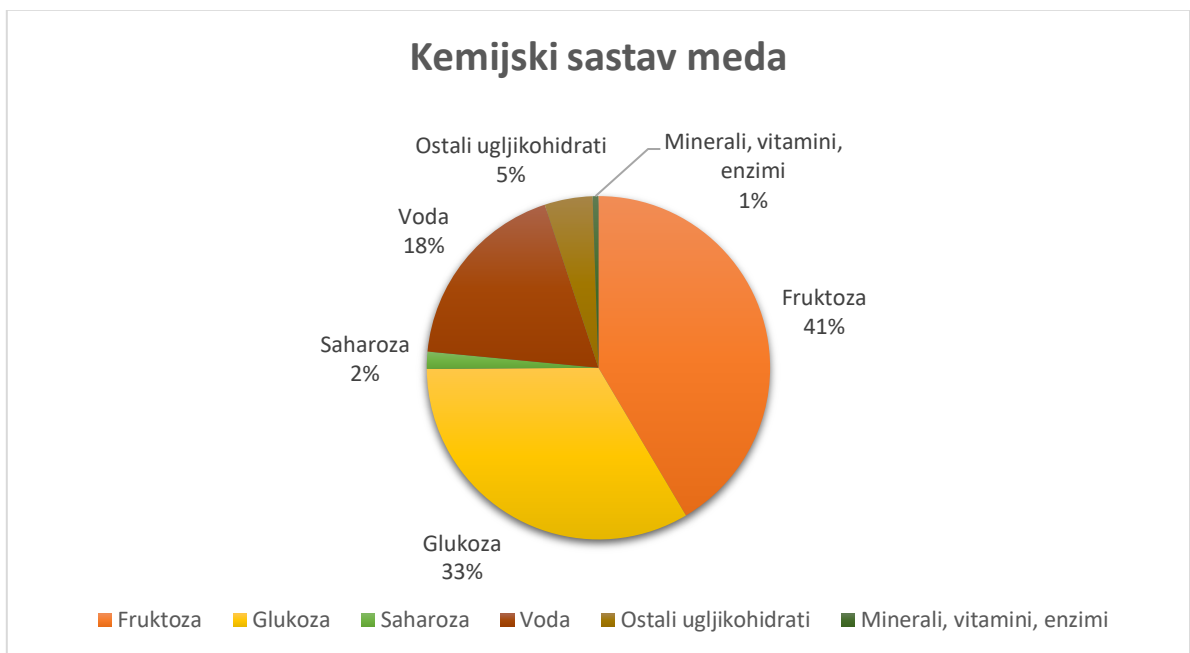
Medljikovac ili medun je pčelinji proizvod od medne rose koji ne potječe od nektara biljaka, već od sokova koji se nalaze u dubljim dijelovima biljke. Medna rosa se javlja u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama, odakle i naziv za ovu vrstu meda „šumski med“. Također, može se dobiti iz izlučevina kukaca roda *Hempitera* koji sišu žive dijelove biljaka. Boja mu je iznimno tamna, a okus dugotrajan.<sup>10</sup>

Podjela meda prema načinu proizvodnje i/ili prezentacije proizvoda:

- med u saću
- med u komadima saća ili rezano saće
- cijedeni med
- vrcani med
- kremasti med
- topljeni med
- filtrirani med
- industrijski med.<sup>3,7,9</sup>

### 1.1.3. Kemijski sastav meda

Med predstavlja vrlo kompleksnu mješavinu više od 70 različitih komponenata koje čine ugljikohidrati, proteini (uključujući enzime), aminokiseline, organske kiseline, polifenole, tvari slične karotenoidima, proizvodi Maillardove reakcije, vitamini i minerali (slika 3). Pojedine komponente u med dodaju pčele, neke su porijeklom od medonosne biljke, a neke se stvaraju prilikom zrenja meda u saću.



Slika 3. Kemijski sastav meda

#### Ugljikohidrati

S obzirom da ugljikohidrati čine 95-97 % suhe tvari u medu, može se reći da med predstavlja koncentriranu otopinu invertiranih šećera u vodi. Najzastupljenije nutritivne komponente su monosaharidi fruktoza i glukoza, koje čine 85-95 % od ukupnih šećera. Glukoza i fruktoza su najvažniji jer od njih potječu slatkoća i energetska vrijednost, a određuju i fizikalna svojstva meda poput viskoznosti, gustoće, ljepljivosti, higroskopnosti i sl. U smjesi omjer fruktoze i glukoze uvijek mora biti veći od 1, a kako fruktoza ima visoku slatkoću, tako je i med slađi 1,5 puta od konzumnog šećera. Od disaharida, u najvećoj količini prisutna je saharoza, zatim maltoza, izomaltoza, maltuloza, furanoza i dr. U medu se nalazi još oko 25 oligosaharida.

## **Voda**

Udio vode je promjenjiva komponenta u medu, a kreće se između 15 i 20%. Voda predstavlja važan faktor koji utječe na kristalizaciju, viskoznost i gustoću meda. Posebnu važnost ima kod njegova skladištenja jer, kako je med higroskopan, udio vode definira njegovu stabilnost i otpornost na mikrobiološko kvarenje odnosno fermentaciju. Drugim riječima, veće količine vode u medu otežavaju kristalizaciju. Prema hrvatskom Pravilniku o kakvoću meda i drugih pčelinjih proizvoda („Narodne novine“, br. 30/2015), med koji se stavlja na tržište ne smije imati udio vode veći od 20%.

## **Organske kiseline**

Kiselost meda potječe od organskih kiselina kao što su mravlja, glukonska, oksalna, limunska, maslačna, vinska, mliječna, jabučna, valerijanska, benzojeva, pirogroždana i dr. Njihova prisutnost niža je u svijetlim (bagremov i livadni), nego u medovima tamnije boje. Vrlo nizak pH meda, koji se uglavnom kreće u rasponu od 3,2 do 4,5, osigurava inhibiciju razvoja mnogih mikroorganizama.

## **Enzimi**

Proteini odnosno enzimi u medu potječu od pčela, ali ih nalaze se i u peludu i nektaru. Dospijevaju u med putem pčelinjih žlijezda slinovnica prilikom prerade nektara i medljike u vlastitom želucu. Od svih prisutnih enzima, najvažniji su invertaza, dijastaza, katalaza i glukoza oksidaza. Uloga invertaze je hidroliza saharoze do njezinih sastavnica – glukoze i fruktoze. Dijastaza (amilaza) je najstabilniji od svih enzima u medu pa se koristi u svrhu ocjene kvalitete meda. Sadrži  $\alpha$  – amilaze koje sudjeluju u razgradnju škroba na dekstrine i  $\beta$  – amilaze koje nadalje razgrađuju škrob do maltoze. Produkti reakcije katalizirane glukoza oksidazom su glukonska kiselina i vodikov peroksid koji ima baktericidna svojstva.

## **Vitamini**

Vitamini su sadržani u medu u vrlo malim udjelima, nedostatnim za čovjekove potrebe, a potječu iz peludnih zrnaca. U prvom redu to su vitamini B skupine, poput tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), pantotenske kiseline (B<sub>5</sub>), niacina (B<sub>3</sub>), piridoksina (B<sub>6</sub>), biotina (B<sub>7</sub>), folne kiseline (B<sub>9</sub>), i vitamin C.

## **Minerali**

Tamni medovi imaju povećani udio minerala. Najzastupljeniji je kalij, a u manjoj mjeri sadrže kalcij, silicij, cink, bakar, mangan, selen, fosfor, natrij, magnezij i dr. Koliko će ih biti ovisi o botaničkom porijeklu, klimatskim promjenama i sastavu tla što se naposljetku koristi kod utvrđivanja botaničkog i geografskog porijekla meda. Za bagremove i suncokretove medove karakterističan je mali udio pepela, a veće količine nalaze se u kestenovom i livadnom medu te medljikovcu.

## **Dušikovi spojevi**

Dušikovi spojevi u medu prisutni su u tragovima, a nastaju u žlijezdama slinovnica pčela radilica. Pojavljuju se u obliku aminokiselina, a najzastupljenija je prolin te se udio prolina koristi kao indikator zrelosti meda i mogućeg patvorenja.

## **Fenolni spojevi**

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka i uglavnom služe u obrambenom mehanizmu biljke. Od fenolnih spojeva u medu nalaze se flavonoidi i fenolne kiseline poput galne, kumarinske, kafeinske, elaginske i ferulinske te njihovi esteri.<sup>1,7,9-11</sup>

### **1.1.4. Fizikalna svojstva meda**

U fizikalna svojstva meda ubrajaju se viskoznost, specifična težina, kristalizacija, higroskopnost, električna vodljivost te optička svojstva. Svako od tih svojstava je direktno povezano sa kemijskim sastavom meda. Zbog postojećih razlika u sastavu pojedinih vrsta medova, opravdano je očekivati i da će vrijednosti ovih parametara biti specifične i različite za određenu vrstu.

#### **Viskoznost**

Med je gusta tekućina koja posjeduje određeni viskozitet pri određenoj temperaturi. Viskoznost je jedno od najvažnijih karakteristika meda koje označava stupanj likvidnosti odnosno tekućeg stanja meda. Prvenstveno utječe na rukovanje s medom tijekom dorade i samog skladištenja. Vrlo je važan parametar u proizvodnji i analizi jer utječe na protočnost meda primjerice kod ekstrakcije, taloženja, procjeđivanja, miješanja i pakiranja. Porastom temperature smanjuje se viskoznost meda zbog blažeg molekularnog trenja i slabijih hidrodinamičkih sila. Na viskoznost meda utječu sadržaj vode te količina

i vrsta prisutnih šećera. Ukoliko med sadrži veći udio vode, bit će manje viskozan. Nasuprot tomu, veći udio disaharida i trisaharida doprinosi većoj viskoznosti.

### **Gustoća**

Gustoća meda izražava se kao specifična težina. Određuje se pomoću piknometra, stavljanjem mase meda i mase iste količine vode u omjer, a ovisi prvenstveno o udjelu vode. Med ne smije imati gustoću pri 20 °C manju od 1,390 g/m.<sup>3</sup>

### **Kristalizacija**

Postoji zabluda da je kristalizirani med (slika 4) zapravo pokvaren ili da mu je naknadno dodavan šećer te je takvog izgleda neprivlačan potrošačima. U stvarnosti, kristalizacija je najnormalnija prirodna pojava kod stajanja meda te upravo zbog toga možemo biti sigurni da takav med nije patvoren. Do te spontane pojave dolazi zbog toga što je med prezasićena šećerna otopina u kojoj glukoza pri određenoj temperaturi prelazi u kristaliničnu formu glukoza monohidrata, čime stajanjem med prelazi u kruto stanje. Oslobođena voda odlazi u nekristalizirane dijelove meda čime se povećava sklonost fermentaciji i kvarenju meda. Dolazi do promjene boje meda, počinje svijetliti i gubi prozirnost. Kristalizacija ovisi o sadržaju vode i o omjeru glukoze i fruktoze. Što je niža količina vode odnosno ako imamo koncentriraniju otopinu glukoze i fruktoze, brzina kristalizacije će biti veća. Optimalna temperatura kristalizacije je oko 14 °C, a u hladnim prostorijama med puno brže kristalizira. Procesom pasterizacije može se odgoditi kristalizacija.



Slika 4. Kristalizirani med

## **Higroskopnost**

Higroskopnost je sposobnost meda da, u ovisnosti o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode, upija ili otpušta vodu. Promjene se očituju uglavnom na površini jer velika viskoznost meda sprječava da apsorbirana voda dospije u unutrašnjost. Med pokazuje visoki stupanj higroskopnosti što duguje velikoj količini fruktoze koja je higroskopnija od glukoze i drugih šećera. Iz tog razloga, prilikom čuvanja meda u vlažnim prostorijama potrebno je paziti da je med dobro zatvoren.

## **Električna vodljivost**

Električna vodljivost je sposobnost neke tvari da provodi električnu struju. Ovisna je o količini mineralnih tvari i kiselina, a što su one prisutnije, viša je i električna vodljivost. Kako med sadrži malu količinu mineralnih tvari, tako je i električna vodljivost prilično mala. Vrijednosti variraju kod različitih vrsta medova pa tako kod nektarnih medova mora biti viša od 0,8 mS/cm, a kod medljikovca i kestenovog meda viša od te vrijednosti.

## **Optička aktivnost**

Važno je spomenuti još jedno svojstvo meda, a to je optička aktivnost. Vodena otopina meda je optički aktivna odnosno ima sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti, a kut zakretanja ovisi o vrsti i udjelu ugljikohidrata. Fruktoza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo, a glukoza, svi disaharidi i olisaharidi udesno. Tako nektarni med pokazuje negativnu, radi zastupljenije fruktoze, a medljikovac pozitivnu optičku aktivnost zbog većeg udjela olisaharida.<sup>7,11-13</sup>

### **1.1.5. Senzorska svojstva meda**

Senzorska analiza predstavlja neizostavnu znanstvenu disciplinu za procjenu kvalitete hrane koja kao mjerni instrument koristi ljudska osjetila. Dakle, boja, okus i miris predstavljaju najvažnija senzorska svojstva meda koja ovise o biljnom porijeklu te o načinu prerade i skladištenja. Rezultati takvih ispitivanja mnogo govore o kakvoći samog meda, a mogu ukazati i na potencijalnu patvorenje i kontaminaciju meda stranim tvarima poput šećera, hranjenjem pčela šećerom ili lažno botaničko porijeklo. Senzorska svojstva gube na jačini grijanjem ili duljim skladištenjem na visokim temperaturama.

## Boja

Boja meda ovisi o njegovoj vrsti, a varira od svijetložute sve do tamnosmeđe ili čak crne (slika 5). Izrazito svijetlu, gotovo bijelu boju ima bagremov, a zagasitu tamnosmeđu kestenov med. Boje ostalih vrsta, kao što su livadni med i med djeteline, kreću se između tih dviju krajnosti. Faktori koji utječu na boju su botaničko porijeklo i skladišni uvjeti, a suspendirane čestice poput peludi određuju bistrinu. Također, ona ovisi o kemijskom sastavu – zastupljenosti ugljikohidrata, pepela i nekih minerala kao što su bakar, željezo i mangan. Kako su kristali glukoze bijeli, kristalizacijom med svijetli, a tijekom čuvanja može i potamniti. Općenito, proljetni med je uvijek svjetliji, a kasni ljetni tamniji. Boja se određuje se u milimetrima po Pfundovoj ljestvici ili, u novije vrijeme, upotrebom spektrofotometra.



Slika 5. Različite boje meda

## Miris

U medu je sadržano više od pedeset spojeva koji mu daju karakterističan miris. Kod monoflornog meda, okus je karakterističan za biljku iz koje je dobiven nektar. Mirisne tvari, nosioci mirisnih svojstava meda, su hlapljive pa starenjem ili zagrijavanjem meda dolazi do slabljenja odnosno potpunog nestanka mirisa. U prvom redu, mirisni spojevi su karbonilni spojevi (acetaldehid, aceton), alkoholi (etanol, propanol, fenol) i esteri (metilni i etilni esteri mravlje, octene, benzojeve kiseline).

## Okus

Okus i miris meda usko su povezani. Ovisno o vrsti meda, okus se mijenja od slatkog do gorkog. Ukoliko dođe do njegove fermentacije, med poprima kiselkast okus. Među najgorčim ističu se kestenov, trešnjin i višnjin med. Općenito, med svijetle boje blagog je okusa, a tamniji med ima izraženiji okus.<sup>7, 11</sup>

## 1.2. HLAPLJIVI SPOJEVI U MEDU

Aroma je zapravo kombinirana impresija okusa i mirisa koja ujedno predstavlja jedno od najcjenjenijih svojstava prehrambenih proizvoda, a često je i glavni faktor kod izbora potrošača.<sup>14</sup> Općenito, miris prehrambenih proizvoda ovisi o tvarima nosiocima arome – hlapljivim spojevima. Ponajprije su to velike skupine organskih molekula kao što su ugljikovodici, alkoholi, fenoli, esteri, aldehidi, ketoni, terpeni, furani i dušikovi spojevi. Međutim, izolacija hlapljivih spojeva veoma je problematična radi njihove isparljivosti na visokim temperaturama. Do sada je uspješno identificirano oko šesto hlapljivih komponenata u medu.<sup>7</sup> Prisutni su u vrlo niskim koncentracijama i imaju relativno male molekulske mase. Hlapljivi spojevi dospjevaju u med:

- direktnim prijenosom iz medonosne biljke (fitokemikalije),
- transformacijom biljnih spojeva od strane pčela,
- termičkim tretiranjem ili dužim stajanjem meda
- onečišćenjima iz okoliša i dr.

Dakle, postoje čimbenici koji mogu doprinijeti razvoju hlapljivih spojeva u medu koji nisu izravno povezani s preradom od strane pčela ili njegovim botaničkim porijeklom. Naknadnom termičkom obradom ili produženim skladištenjem, termolabilni spojevi mogu se oksidirati ili uništiti, a hlapljivi spojevi mogu i nastati kao produkti Maillardovih reakcija i Steckerovih degradacija. Drugim riječima, primjena određenih metoda koje koriste toplinu, poput hidrodestilacije (HD) ili simultane destilacije-ekstrakcije (SDE), za posljedicu može imati stvaranje artefakata koji nastaju uglavnom radi toplinske razgradnje šećera ili aminokiselina do furana i piranskih derivata.<sup>15,16</sup>

### 1.2.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Zbog velikog broja hlapljivih sastojaka u medu, aromatični profil može poslužiti kao tzv. „fingerprint“ koji vodi ka utvrđivanju njegova botaničkog porijekla. Za izolaciju takvih spojeva, potrebno je biti dobro upoznat sa uzorkom i imati približnu sliku o tome koje spojeve očekivati. U cilju dobivanja što reprezentativnijeg profila hlapljivih spojeva potrebno je odabrati optimalnu izolacijsku metodu. Dostupne su razne metode s različitim stupnjevima selektivnosti i djelotvornosti, a pri izboru je nužno minimizirati gubitke, kontaminaciju i smanjiti mogućnost nastajanja artefakata. Izabrana metoda trebala bi



pokazivati jednaku učinkovitost za polarne i nepolarne spojeve te ne bi smjela potencirati termičku degradaciju, oksidaciju, redukciju, promjenu pH ili gubitak isparljivih spojeva.

Uobičajene metode izolacije hlapljivih spojeva su:

- metoda ekstrakcije otapalima
- destilacijske metode
- tehnike „vršnih para“
- sorpcijske tehnike.<sup>15</sup>

Najčešće metode su hidrodestilacija (HD), simultana destilacija-ekstrakcija (SDE) u aparaturi po Likens-Nickersonu, ultrazvučna ekstrakcija (USE) i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).<sup>15,16</sup>

#### **1.2.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE)**

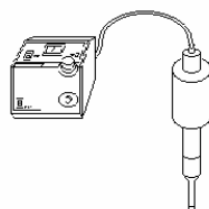
Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound assisted extraction*, USE) je ultrazvukom (20-100 kHz) inducirana tehnika koja omogućuje visoku reproducibilnost u kraćem ekstrakcijskom vremenu, olakšano rukovanje, niže temperature i smanjenje količine otapala, a kao rezultat ima visokokvalitetne ekstrakte. Koristi se kao pojednostavljena i učinkovita alternativa klasičnim ekstrakcijskim tehnikama.

Ultrazvuk je dio zvučnog spektra od 20 kHz do 10 MHz. Generator pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije (oko 25 kHz odnosno 25 000 ciklusa po sekundi) električne energije. Električna ili mehanička energija transformira se u energiju zvuka. Zbog privlačenja polariziranih molekula dolazi do vibracije molekula medija te prijenosa mehaničke energije titranja na medij. Emisijom ultrazvučnih valova u medij nastaju longitudinalni valovi što rezultira promjenjivim ekspanzijama i kompresijama tlaka. Ekspanzija razdvaja molekule, a kompresija uzrokuje njihovo združivanje. Dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića koji zbog tlačnih oscilacija i sami osciliraju. Mjehurići bubre pod utjecajem negativnog tlaka u fazi ekspanzije, a kada dosegnu neku kritičnu veličinu kod koje ne mogu učinkovito apsorbirati energiju, dolazi do njihovog urušavanja. Čitav proces formiranja, bubrenja i urušavanja mjehurića naziva se akustična kavitacija. Na taj način ultrazvuk „uznemirava“ ekstrakcijsko otapalo stvarajući veću kontaktnu površinu, direktni kontakt uslijed pucanja te bržu difuziju otapala u uzorak čime se ubrzava prijenos mase.

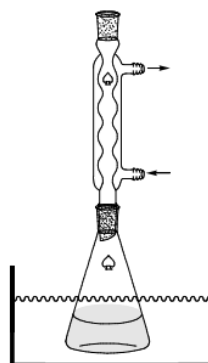
Pri tom, vrlo je važno odabrati pogodno ekstrakcijsko otapalo. U prvom redu, otapala su cjenovno skupa i mnoga su toksična za ljudsko zdravlje. Otapalo mora vriti na dovoljno niskoj temperaturi kako bi se lako uklonilo, a da pritom ne dolazi do gubitaka željenih spojeva. Također, otapalo može ekstrahirati neisparljive spojeve što otežava analizu hlapljivih spojeva plinskom kromatografijom jer neisparljivi spojevi kontaminiraju kolonu plinskog kromatografa. Nadalje, neki se analiti mogu maskirati otapalom i što onemogućava njihovu identifikaciju. Najčešća otapala koja se koriste su heksan, aceton, kloroform, diklormetan, dietil-eter, metanol, pentan, smjesa pentana i dietil-etera (1:2, v/v). Metoda ekstrakcije potpomognute ultrazvukom provodi se pri relativno niskim temperaturama (oko 25 °C), a ako su prisutne termički nestabilne tvari može se i sniziti. Uz otapalo, temperaturu i tlak, za optimizaciju procesa potrebno je voditi računa i o drugim faktorima poput frekvencije, vremena obrade, snage ultrazvuka te distribucije ultrazvučnih valova.

Postoje dvije vrste sustava za ultrazvučnu ekstrakciju:

- ✓ **Izravna**, s ultrazvučnim sondama koje se uranjaju u otopinu s uzorkom (slika 6)
- ✓ **Neizravna**, s ultrazvučnom kupelji (slika 7)<sup>15,17-19</sup>



Slika 6. Ultrazvučna sonda



Slika 7. Ultrazvučna kupelj s uzorkom u tikvici

## 1.2.2. Analiza hlapljivih spojeva

Jednom kada se hlapljivi spojevi uspješno izoliraju, potrebno ih je analizirati. Upravo je korelacija senzorske analize s instrumentalnim podacima stekla kredibilitet posljednjih godina jer omogućuje kategorizaciju meda prema određenim kriterijima i predviđanje osjetilne kvalitete meda. Pod analizom hlapljivih spojeva, podrazumijeva se identifikacija pojedinih komponenata složene smjese, odnosno kvalitativna analiza te određivanje udjela identificiranih sastojaka u smjesi, odnosno kvantitativna analiza.<sup>20</sup>

### 1.2.2.1. Plinska kromatografija (GC)

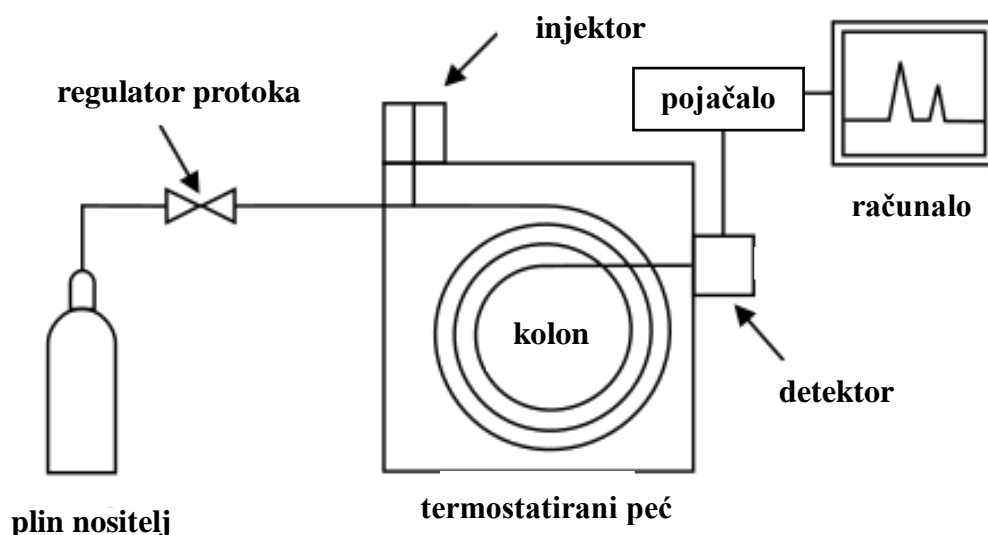
Kromatografija (grč. *chroma*; boja *graphein*; pisati) je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese s obzirom na njihovu različitu raspodjelu između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Zbog različitih afiniteta vezivanja prema nepokretnoj fazi, analiti pokazuju različitu pokretljivost u kromatografskom sustavu što rezultira njihovim razdvajanjem.

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena tehnika u odjeljivanje hlapljivih spojeva. Uzorci za analizu moraju biti isparljivi kako bi se preveli u injektoru u plinovito stanje i otporni na visoke temperature zagrijavanja kromatografske kolone. Postoje dvije vrste plinske kromatografije koje imaju zajedničku mobilnu fazu - plin, a razlikuju se u vrsti stacionarne faze pa se sukladno tome dijele na:

- 1) **adsorpcijska**, gdje je stacionarna faza čvrsta tvar velike specifične površine
- 2) **razdjelna**, gdje je stacionarna faza nehlapljiva tekućina vezana na čvrsti nosač adsorpcijskim ili kemijskim vezama.

Uređaj za plinsku kromatografiju se naziva plinski kromatograf (slika 8), a sastoji se od:

- plina nositelja s regulatorom tlaka i mjerачem protoka
- injekcijskog bloka (injektora)
- kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranoj peći
- detektora, pojačala i računala.



Slika 8. Shematski prikaz plinskog kromatografa

Kao pokretna faza koristi se kemijski inertan plin kao što je argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid kako ne bi reagirao s uzorkom ili nepokretnom fazom. Mjesto za ubrizgavanje uzorka pomoću mikrolitarske šprice zagrijano je na nešto višu temperaturu nego sama kromatografska kolona kako bi se omogućilo potpuno uplinjavanje uzorka i spriječilo potencijalno ukapljivanje uzorka prilikom dolaska na detektor.

U plinskoj kromatografiji koriste se punjene i kapilarne kolone. Kolona je smještena u termostatiranom prostoru, a zbog boljeg razlučivanja smjese, temperatura kolone nije konstanta, već se ona mijenja uglavnom linearnim porastom do neke maksimalne radne temperature (temperaturna rampa).

Funkcija mirujuće faze jest separacija različitih komponenti, zbog čega svaka izlazi iz kolone u različito vrijeme. Vrijeme zadržavanja odnosno retencijsko vrijeme ( $t_r$ ) je zabilježeno vrijeme od trenutka injektiranja uzorka do odziva detektora. Detektori su uređaji koji temeljem određenih fizikalnih ili kemijskih svojstava mogu zabilježiti prisutnost i kvalitativno i kvantitativno odrediti eluirane komponente uzorka. Izmjereno vrijeme zadržavanja, koje je karakteristično za svaku komponentu, može se usporediti s vremenom zadržavanja standarda čiste tvari te time potvrditi kvalitativnu analizu. Detektori koji se koriste u plinskoj kromatografiji su plamenoionizacijski (FID), detektor toplinske vodljivosti (TCD), plamenofotometrijski (FPD), fotoionizacijski detektor (PID), detektor apsorpcije elektrona (ECD) i spektrometar masa (MS).

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda kojom se dobivaju vrijedni podatci o relativnoj molekularnoj masi spoja. S obzirom da detektor spektrometar masa pruža više nego zadovoljavajuću brojnost podataka za identifikaciju i određivanje strukturnog identiteta spojeva uz korištenje minimalne količine materijala, upravo je on najčešći izbor. Stoga, najbolja separativna instrumentna tehnika za analizu hlapljivih spojeva je spregnuta plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS). Njihovo vezivanje u jedinstven sustav omogućuje visoku osjetljivost te dobivanje složenog kromatografskog profila s višestrukim pikovima različitih visina i širina.<sup>18</sup> Uz pomoć plinske kromatografije moguće je fizičko odvajanje različitih spojeva, dok masena spektrometrija omogućava određivanje njihovih specifičnih masa koje omogućuju njihovu identifikaciju i klasifikaciju putem raznih biblioteka spojeva.<sup>20</sup>

Prednosti uparivanja plinske kromatografije (GC) s masenim spektrometrom (MS) su:

- ✓ velika učinkovitost odvajanja
- ✓ visoka osjetljivost
- ✓ velika selektivnost
- ✓ mogućnost obnove masenih spektara
- ✓ jednostavnost pri uporabi
- ✓ cijena.<sup>21-23</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Kestenov med

Šumski pitomi kesten (lat. *Castanea sativa*) je samonikla biljka iz porodice bukovki roda *Castanea*. Plodovi pitomog kestena bili su jedni od prvih namirnica kojima se čovjek hranio za što postoje i arheološki dokazi. Najviše raste u Europi i Sredozemlju, a smatra se da je izvorno potekao iz Grčke.<sup>24</sup>

Kestenov med (slika 9) karakterizira jedinstven gorko – sladak i drveni okus. Dobiva se od nektara cvjetova pitomog kestena koji cvatu u lipnju, a ima tamnu crveno – smeđu boju. Svoju tržišnu cijenu opravdava brojnim ljekovitim svojstvima. Smatra se da je zbog bogatog mineralnog (željezo, bakar, mangan) i vitaminskog sadržaja (vitamini B i C), antioksidativnih i antibakterijskih svojstava jedan od najzdravijih vrsta meda. Pomaže kod grlobolje, kardiovaskularnih bolesti, nesаницe, anemije, povoljno djeluje na probavni sustav i potiče rad crijeva. Također, svakodnevna konzumacija ovog meda pomaže pri gubitku kilograma i održavanju tjelesne težine. Poznat je diljem Mediterana pa je tako u Toskani dio tradicionalnog jela sa sirom pecorinom i kruškom.<sup>25</sup>



Slika 9. Kestenov med

## 2.2. Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- natrijev sulfat, bezvodni, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- destilirana voda
- diklormetan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska

Aparatura:

- tehnička vaga, Kern model 572, Njemačka
- ultrazvučna kupelj, Elma D-78224, Njemačka
- aparatura za frakcijsku destilaciju s Vigreuxovom kolonom, Deotto lab d.o.o., Hrvatska
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa, Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E.

## 2.3. Izolacija i analiza hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi kestenovog meda izolirani su metodom ultrazvučne ekstrakcije (USE), nakon čega je provedeno njihovo koncentriranje frakcijskom destilacijom u svrhu uklanjanja otapala. Naposljetku, uzorci su analizirani i identificirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

### 2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija (USE)

Ultrazvučna ekstrakcija je postupak kojim se uzorak ekstrahira pomoću ultrazvučnih valova. Kao organsko otapalo korišten je diklormetan. Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju sastojala se od Erlenmayerove tikvice, povratnog Liebigovog hladila i ultrazvučne kupelji (slika 10)

U Erlenmayerovu tikvicu je odvagano 40 g meda i otopljeno u 22 ml destilirane vode uz intenzivno miješanje. Potom je odvagano 1,5 g bezvodnog natrijevog sulfata ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) i postepeno dodano u tikvicu. Kada se med u potpunosti otopio, u tako pripremljenu otopinu dodano je 20 ml ekstrakcijskog otapala diklormetana. Erlenmayerova tikvica, na koju je pričvršćeno Liebigovo hladilo, uronjena je u vodom napunjenu ultrazvučnu

kupelj. Tada ekstrakcija započinje. Sonifikacija se provodi 30 minuta pri temperaturi od  $25 \pm 3$  °C. Nakon završetka ekstrakcije, tikvica se ukloni iz kupelji, a sadržaj tikvice se prenese u kivetu. S ciljem dobivanja što jasnijih granica između donjeg sloja - otapala i gornjeg sloja - vodene otopine meda, potrebno je provesti centrifugiranje. Kada se slojevi razdvoje, pomoću kapaljke odvaja se gornji sloj (vodena otopina meda). Postupak ultrazvučne ekstrakcije se ponavlja uz dodatak svježeg otapala. Donji sloj, diklormetanski ekstrakt, se filtrira preko lijevka u kojem se nalazi pamučna vata iznad loje je sloj bezvodnog natrijevog sulfata. Čitav postupak, ultrazvučna ekstrakcija, centrifugiranje i odjeljivanje slojeva, se ponavlja sveukupno tri puta po jednom uzorku. Dobiveni organski ekstrakti se udružuju i dalje obrađuju frakcijskom destilacijom.

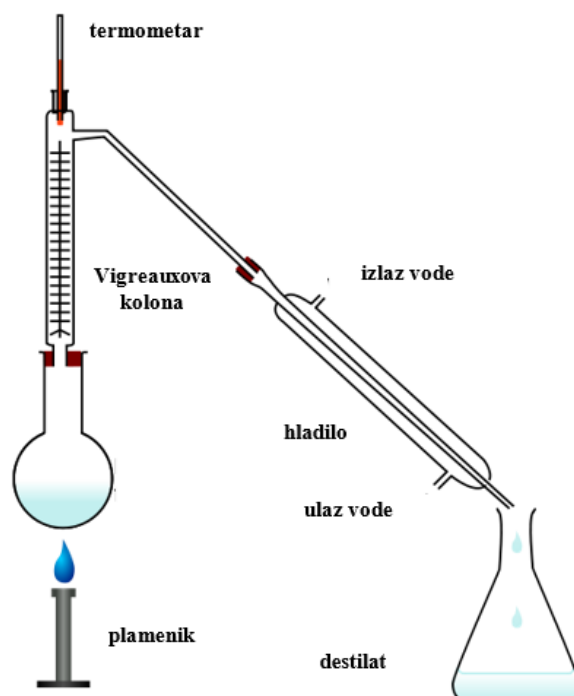


Slika 10. Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju

### 2.3.2. Koncentriranje frakcijskom destilacijom

Združeni diklormetanski ekstrakti su koncentrirani do oko 1 mL frakcijskom destilacijom s Vigreuxovom kolonom (slika 11). Nakon otparavanja otapala uzorak je prebačen u male bočice, tzv. vijalice, dobro začepljen i čuvan u hladnjaku do GC-MS analize.





Slika 11. Aparatura za frakcijsku destilaciju

### 2.3.3. Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS)

Dobiveni diklormetanski ekstrakti s izoliranim hlapljivim spojevima su analizirani pomoću vezanog sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS, slika 12)



Slika 12. GC-MS u Zavodu za organsku kemiju KTF-a

Analize su provedene na HP-5MS koloni proizvođača Agilent Technologies s nepolarnom stacionarnom fazom kemijskog sastava: 5 % difenil i 95 % dimetilpolisiloksan. Dimenzije kolone su 30 m x 0,25 mm, a debljina sloja stacionarne faze je 0,25  $\mu$ m. Plin nositelj je helij protoka od 1 mm/min. Omjer cijepanja je 1:50, temperatura injektora iznosila je 250 °C, temperatura detektora 280 °C, a energija ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi:

- 3,5 min na 70 °C,
- potom zagrijavanje od 70 do 200 °C brzinom od 3 °C/min i
- zadržavanje 20 min na 200 °C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja/retencijskih indeksa s vremenima zadržavanja/retencijskim indeksima već poznatih spojeva iz raznih smjesa hlapljivih spojeva prethodno analiziranih GC-MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu. Osim navedenoga identifikacija je provedena i usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara Wiley 9 (*Wiley MS library*) i NIST17 (*National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD*) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

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

- kromatogram ukupne ionske struje (TIC),
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbliži spektru nepoznatog spoja koji je predstavljen pikom na kromatogramu,
- vrijeme zadržavanja pojedinog sastojka u minutama,
- udio pojedinog sastojka u postotcima, %.

Retencijski indeksi svakog sastojka izračunati su pomoću formule unesene u program Excel, a predstavljaju logaritam vremena zadržavanja ( $t_r$ ) interpoliran na vremena zadržavanja homolognog niza n-alkana.

### 3. REZULTATI

Pet uzoraka monoflornog meda kestena ekstrahirano je diklormetanom uz pomoć ultrazvuka (ultrazvučna ekstrakcija, USE). Na taj način je dobiveno pet diklormetanskih ekstrakata (označenih 1 – 5) koji, pored ostalih spojeva, sadrže i hlapljive (i poluhlapljive) spojeve. Analiza ekstrakata provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Rezultati analiza, odnosno kemijski sastav i udio hlapljivih (i poluhlapljivih) spojeva, prikazani su u tablicama 1 - 5. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja, odnosno vremenu zadržavanja, sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku izražen je u % i predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

$t_R$  – vrijeme zadržavanja u minutama

RI – retencijski indeks

-- nije identificiran

\* – točan izomer nije određen

<sup>a</sup> – spoj identificiran samo na temelju masenog spektra, odnosno usporedbom masenog spektra sa spektrima iz *Wiley9* i *NIST17* biblioteka masenih spektara

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak 1

| Redni broj | Ime spoja                | $t_R$<br>(min) | RI    | Udio (%) |
|------------|--------------------------|----------------|-------|----------|
| 1.         | 3-metilbutanska kiselina | 3,130          | < 900 | 0,22     |
| 2.         | furfural                 | 3,300          | < 900 | 0,22     |
| 3.         | 2-metilbutanska kiselina | 3,279          | < 900 | 0,38     |
| 4.         | okt-1-en-3-ol            | 6,098          | 982   | 1,22     |
| 5.         | benzil-alkohol           | 7,839          | 1041  | 2,33     |

|     |   |        |       |       |
|-----|---|--------|-------|-------|
| 6.  | 2-pirolidinon <sup>a</sup>                                | 8,865  | 1071  | 1,97  |
| 7.  | metil-2-furoat  | 9,448  | 1086  | 0,70  |
| 8.  | 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on | 11,699 | 1148  | 2,30  |
| 9.  | benzojeva kiselina  | 12,798 | 1174  | 1,44  |
| 10. | 2-piperidinon <sup>a</sup>                                | 13,287 | 1186  | 0,91  |
| 11. | terpendiol I  | 13,650 | 1193  | 0,57  |
| 12. | 5-hidroksimetilfurfural                                   | 15,171 | 1209  | 0,46  |
| 13. | 2-feniloctena kiselina                                    | 16,151 | 1256  | 1,71  |
| 14. | <i>o</i> -aminoacetofenon                                 | 18,213 | 1302  | 1,79  |
| 15. | 1-(3-hidroksipropil)-2-pirolidon <sup>a</sup>             | 22,618 | 1409  | 1,88  |
| 16. | ( <i>E</i> )-cimetna kiselina*                            | 23,476 | 1432  | 0,88  |
| 17. | <i>N,N</i> -dimetil-1-dodekanamin <sup>a</sup>            | 26,560 | 1,507 | 0,78  |
| 18. | <i>p</i> -aminoacetofenon                                 | 27,103 | 1522  | 18,36 |
| 19. | 5-aminoindan-1-on   | 29,690 | 1589  | 1,68  |
| 20. | heksadekan  | 30,218 | 1602  | 0,53  |
| 21. | 8-hidroksikinolin <sup>a,*</sup>                          | 33,792 | 1699  | 9,16  |
| 22. | heptadekan  | 34,257 | 1713  | 0,51  |
| 23. | ( <i>E</i> )-koniferil-alkohol                            | 35,225 | 1741  | 0,70  |
| 24. | benzil-benzoat  | 36,163 | 1768  | 1,77  |
| 25. | vomifoliol  | 37,219 | 1797  | 2,70  |
| 26. | heksadekan-1-ol   | 40,107 | 1884  | 2,49  |
| 27. | deoksivazikinon <sup>a</sup>                              | 42,187 | 1948  | 7,68  |
| 28. | heksadekanska kiselina                                    | 42,829 | 1968  | 4,07  |
| 29. | 4-hidroksikinolin <sup>a,*</sup>                          | 43,281 | 1982  | 15,39 |
| 30. | ( <i>Z</i> )-9-oktadecen-1-ol                             | 45,771 | 2060  | 1,14  |
| 31. | oktadekan-1-ol  | 46,619 | 2086  | 3,64  |

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak 2

| <b>Redni broj</b> | <b>Ime spoja</b>  | <b><math>t_R</math><br/>(min)</b> | <b>RI</b> | <b>Udio (%)</b> |
|-------------------|---|-----------------------------------|-----------|-----------------|
| 1.                | furfural  | 3,300                             | < 900     | 0,78            |
| 2.                | okt-1-en-3-ol   | 6,098                             | 982       | 1,04            |
| 3.                | benzil-alkohol  | 7,839                             | 1041      | 1,58            |
| 4.                | 2-pirolidinon <sup>a</sup>                                | 8,865                             | 1071      | 1,07            |
| 5.                | metil-2-furoat  | 9,448                             | 1086      | 1,58            |
| 6.                | 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on | 11,699                            | 1148      | 2,01            |
| 7.                | benzojeva kiselina  | 12,798                            | 1174      | 1,80            |
| 8.                | terpendiol I  | 13,650                            | 1193      | 4,94            |
| 9.                | 2,3-dihidrobenzofuran <sup>a</sup>                        | 14,859                            | 1200      | 0,75            |
| 10.               | 5-hidroksimetilfurfural                                   | 15,171                            | 1209      | 2,72            |
| 11.               | 2-feniloctena kiselina                                    | 16,151                            | 1256      | 4,64            |
| 12.               | <i>o</i> -aminoacetofenon                                 | 18,213                            | 1302      | 1,58            |
| 13.               | 2-metoksi-4-vinilfenol                                    | 18,779                            | 1318      | 0,58            |
| 14.               | 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on                              | 20,064                            | 1350      | 3,25            |
| 15.               | ( <i>E</i> )-8-hidroksilinalol <sup>a</sup>               | 20,823                            | 1368      | 0,49            |
| 16.               | 1-(3-hidroksipropil)-2-pirolidon <sup>a</sup>             | 22,618                            | 1409      | 0,98            |
| 17.               | <i>N,N</i> -dimetil-1-dodekanamin <sup>a</sup>            | 26,560                            | 1,507     | 0,54            |
| 18.               | <i>p</i> -aminoacetofenon                                 | 27,103                            | 1522      | 12,08           |

|     |                                  |        |      |       |
|-----|----------------------------------|--------|------|-------|
| 19. | siringaldehid                    | 32,471 | 1665 | 1,74  |
| 20. | 8-hidroksikinolin <sup>a,*</sup> | 33,792 | 1699 | 1,71  |
| 21. | benzil-benzoat                   | 36,163 | 1768 | 0,85  |
| 22. | metil-siringat                   | 36,495 | 1777 | 1,52  |
| 23. | vomifoliol                       | 37,219 | 1797 | 4,91  |
| 24. | heksadekan-1-ol                  | 40,107 | 1884 | 0,83  |
| 25. | deoksivazikinon <sup>a</sup>     | 42,187 | 1948 | 2,20  |
| 26. | dibutil-ftalat                   | 42,775 | 1967 | 0,67  |
| 27. | 4-hidroksikinolin <sup>a,*</sup> | 43,281 | 1982 | 34,48 |
| 28. | oktadekan-1-ol                   | 46,619 | 2086 | 1,15  |

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena - uzorak 3

| <b>Redni broj</b> | <b>Ime spoja</b>  | <b><i>t<sub>R</sub></i><br/>(min)</b> | <b>RI</b> | <b>Udio (%)</b> |
|-------------------|---|---------------------------------------|-----------|-----------------|
| 1.                | furfural  | 3,300                                 | < 900     | 0,29            |
| 2.                | okt-1-en-3-ol   | 6,098                                 | 982       | 1,14            |
| 3.                | benzil-alkohol  | 7,839                                 | 1041      | 1,43            |
| 4.                | 2-pirolidinon <sup>a</sup>                                | 8,865                                 | 1071      | 0,85            |
| 5.                | metil-2-furoat  | 9,448                                 | 1086      | 0,77            |
| 6.                | 2-feniletanol   | 10,638                                | 1119      | 0,51            |
| 7.                | 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on | 11,699                                | 1148      | 1,89            |
| 8.                | benzojeva kiselina  | 12,798                                | 1174      | 0,48            |

|     |  |        |       |       |
|-----|--|--------|-------|-------|
| 9.  | terpendiol I                                   | 13,650 | 1193  | 0,61  |
| 10. | 5-hidroksimetilfurfural                        | 15,171 | 1209  | 0,86  |
| 11. | 2-feniloktana kiselina                         | 16,151 | 1256  | 5,12  |
| 12. | <i>o</i> -aminoacetofenon                      | 18,213 | 1302  | 1,42  |
| 13. | 2-metoksi-4-vinilfenol                         | 18,779 | 1318  | 0,77  |
| 14. | 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on                   | 20,064 | 1350  | 3,25  |
| 15. | ( <i>E</i> )-8-hidroksilinalol                 | 20,823 | 1368  | 0,49  |
| 16. | 1-(3-hidroksipropil)-2-pirolidon <sup>a</sup>  | 22,618 | 1409  | 0,98  |
| 17. | <i>N,N</i> -dimetil-1-dodekanamin <sup>a</sup> | 26,560 | 1,507 | 0,54  |
| 18. | <i>p</i> -aminoacetofenon                      | 27,103 | 1522  | 12,08 |
| 19. | siringaldehid                                  | 32,471 | 1665  | 1,74  |
| 20. | 8-hidroksikinolin <sup>a,*</sup>               | 33,792 | 1699  | 1,71  |
| 21. | benzil-benzoat                                 | 36,163 | 1768  | 0,85  |
| 22. | metil-siringat                                 | 36,495 | 1777  | 1,52  |
| 23. | vomifoliol                                     | 37,219 | 1797  | 4,91  |
| 24. | heksadekan-1-ol                                | 40,107 | 1884  | 0,83  |
| 25. | deoksivazikinin <sup>a</sup>                   | 42,187 | 1948  | 2,20  |
| 26. | dibutil-ftalat                                 | 42,775 | 1967  | 0,67  |
| 27. | 4-hidroksikinolin <sup>a,*</sup>               | 43,281 | 1982  | 34,48 |
| 28. | oktadekan-1-ol                                 | 46,619 | 2086  | 1,15  |

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak 4

| Redni broj | Ime spoja   | $t_R$<br>(min) | RI    | Udio (%) |
|------------|---|----------------|-------|----------|
| 1.         | 3-metilbutanska kiselina                                  | 3,130          | < 900 | 0,24     |
| 2.         | 2-metilbutanska kiselina                                  | 3,279          | < 900 | 0,42     |
| 3.         | benzil-alkohol  | 7,839          | 1041  | 1,40     |
| 4.         | 2-pirolidinon <sup>a</sup>                                | 8,865          | 1071  | 0,99     |
| 5.         | metil-2-furoat  | 9,448          | 1086  | 0,42     |
| 6.         | 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on | 11,699         | 1148  | 1,98     |
| 7.         | benzojeva kiselina  | 12,798         | 1174  | 0,23     |
| 8.         | terpendiol I  | 13,650         | 1193  | 0,83     |
| 9.         | 2-feniloctena kiselina                                    | 16,151         | 1256  | 1,14     |
| 10.        | <i>o</i> -aminoacetofenon                                 | 18,213         | 1302  | 1,24     |
| 11.        | 3-fenilprop-2-en-1-ol<br>(cinamil-alkohol)                | 18,437         | 1308  | 0,45     |
| 12.        | 2-metoksi-4-vinilfenol                                    | 18,779         | 1318  | 0,61     |
| 13.        | 8- <i>p</i> -menten-1,2-diol <sup>a</sup>                 | 19,888         | 1345  | 2,16     |
| 14.        | 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on                              | 20,064         | 1350  | 1,45     |
| 15.        | <i>N,N</i> -dimetil-1-dodekanamin <sup>a</sup>            | 26,560         | 1,507 | 1,03     |
| 16.        | <i>p</i> -aminoacetofenon                                 | 27,103         | 1522  | 15,58    |
| 17.        | 5-aminoindan-1-on   | 29,690         | 1589  | 1,24     |
| 18.        | 8-hidroksikinolin <sup>a,*</sup>                          | 33,792         | 1699  | 4,43     |



|     |                                  |        |      |       |
|-----|----------------------------------|--------|------|-------|
| 19. | ( <i>E</i> )-koniferil-alkohol   | 35,225 | 1741 | 0,91  |
| 20. | benzil-benzoat                   | 36,163 | 1768 | 0,81  |
| 21. | vomifoliol                       | 37,219 | 1797 | 2,30  |
| 22. | deoksivazikinon <sup>a</sup>     | 42,187 | 1948 | 3,83  |
| 23. | heksadekanska kiselina           | 42,829 | 1968 | 0,55  |
| 24. | 4-hidroksikinolin <sup>a,*</sup> | 43,281 | 1982 | 44,61 |
| 25. | oktadekan-1-ol                   | 46,619 | 2086 | 0,85  |

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak 5

| <b>Redni broj</b> | <b>Ime spoja</b>  | <b><i>t<sub>R</sub></i><br/>(min)</b> | <b>RI</b> | <b>Udio (%)</b> |
|-------------------|---|---------------------------------------|-----------|-----------------|
| 1.                | 3-metilbutanska kiselina                                  | 3,130                                 | < 900     | 0,79            |
| 2.                | okt-1-en-3-ol   | 6,098                                 | 982       | 0,83            |
| 3.                | benzil-alkohol  | 7,839                                 | 1041      | 1,59            |
| 4.                | 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on | 11,699                                | 1148      | 1,07            |
| 5.                | benzojeva kiselina  | 12,798                                | 1174      | 1,79            |
| 6.                | terpendiol I  | 13,650                                | 1193      | 1,44            |
| 7.                | 5-hidroksimetilfurfural                                   | 15,171                                | 1209      | 0,48            |
| 8.                | 2-feniloctena kiselina                                    | 16,151                                | 1256      | 27,32           |
| 9.                | <i>o</i> -aminoacetofenon                                 | 18,213                                | 1302      | 1,71            |
| 10.               | 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on                              | 20,064                                | 1350      | 12,76           |

|     |  |        |       |       |
|-----|--|--------|-------|-------|
| 11. | <i>N,N</i> -dimetil-1-dodekanamin <sup>a</sup> | 26,560 | 1,507 | 1,12  |
| 12. | <i>p</i> -aminoacetofenon                      | 27,103 | 1522  | 13,16 |
| 13. | 5-aminoindan-1-on                              | 29,690 | 1589  | 0,58  |
| 14. | siringaldehid                                  | 32,471 | 1665  | 0,95  |
| 15. | 8-hidroksikinolin <sup>a,*</sup>               | 33,792 | 1699  | 2,59  |
| 16. | ( <i>E</i> )-koniferil-alkohol                 | 35,225 | 1741  | 0,63  |
| 17. | vomifoliol                                     | 37,219 | 1797  | 3,49  |
| 18. | heksadekan-1-ol                                | 40,107 | 1884  | 1,14  |
| 19. | deoksivazikinon <sup>a</sup>                   | 42,187 | 1948  | 2,74  |
| 20. | heksadekanska kiselina                         | 42,829 | 1968  | 2,52  |
| 21. | 4-hidroksikinolin <sup>a,*</sup>               | 43,281 | 1982  | 11,29 |
| 22. | oktadekan-1-ol                                 | 46,619 | 2086  | 1,58  |

## 4. RASPRAVA

Zadatak ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve, nositelje arome monoflornog meda kestena. Pet uzoraka meda kestena (1 – 5) dobivenih od podvrgnuto je ultrazvučnoj ekstrakciji diklormetanom radi izolacije hlapljivih spojeva. Na taj je način dobiveno pet diklormetanskih ekstrakata, 1 – 5. Diklormetanski ekstrakti su, nakon koncentriranja, odnosno otparavanja otapala, analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Za analizu je korištena kapilarna kolona sa nepolarnom stacionarnom fazom - HP-5MS kolona. Kemijski sastav i udio identificiranih hlapljivih i poluhlapljivih (teže hlapljivih) spojeva u ekstraktima prikazan je u tablicama 1 – 5.

### 4.1. Hlapljivi spojevi kestenovog meda

U diklormetanskom ekstraktu dobivenom iz uzorka meda označenog s 1 identificiran je 31 hlapljivi (ili poluhlapljivi spoj). Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u tom ekstraktu dan je u tablici 1. Glavni hlapljivi spoj u ekstraktu je *p*-aminoacetofenon (18,36 %), a slijedi 4-hidroksikinolin (15,39 %). Kvantitativno značajni hlapljivi spojevi su još i 8-hidroksikinolin (9,16 %) te deoksivazikonon (7,68 %). S udjelima iznad 2,0 % u ekstraktu su identificirani sljedeći spojevi: heksadekanska kiselina (4,07 %), oktadekan-1-ol (3,64 %), vomifoliol (2,70 %), heksadekan-1-ol (2,49 %) i 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on (2,30 %).

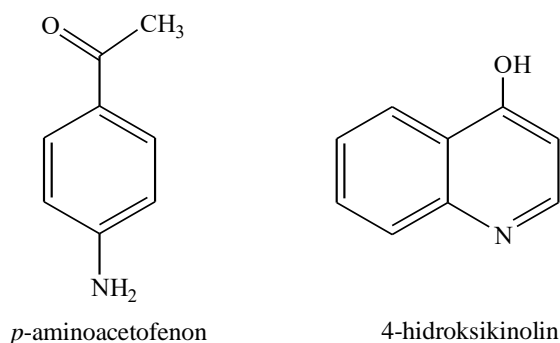
Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u ekstraktu kestenovog meda 2 prikazan je u tablici 2. U ekstraktu je identificirano 28 hlapljivih spojeva među kojima dominira 4-hidroksikinolin (34,48 %). Udio *p*-aminoacetofenona u ovom uzorku je 12,08 %. U kvantitativnom smislu treba spomenuti još i: terpendiol I (4,94 %), vomifoliol (4,91 %), 2-feniloctenu kiselinu (4,64 %) i 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on (3,25 %).

U tablici 3 prikazan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u ekstraktu 3. Identificiran je isti broj spojeva kao i u ekstraktu 2, 28 spojeva. Što se tiče glavnih hlapljivih sastojaka u ekstraktu, i u ovom ekstraktu to su isti spojevi kao i u ekstraktu 2, 4-hidroksikinolin (35,75 %) i *p*-aminoacetofenon (15,70 %). Ostali hlapljivi sastojci ovog ekstrakta, prisutni u većim količinama (udjelima) su: 2-feniloctena kiselina (5,12 %), 8-hidroksikinolin (4,67 %), vomifoliol (3,19 %) i deoksivazikonon (3,11 %).

Dvadeset i pet hlapljivih spojeva identificirano je u diklormetanskom ekstraktu 4, a njihov kemijski sastav i udio prikazan je u tablici 4. Najzastupljeniji hlapljivi spoj u ekstraktu, isto kao i u ekstraktima 2 i 3, je 4-hidroksikinolin čiji udio je 44,61 %. Također kao i u ekstraktima 2 i 3, slijedi *p*-aminoacetofenon (15,58 %). U nešto većim količinama prisutna su još samo dva spoja, 8-hidroksikinolin (4,43 %) i deoksivazikinon (3,83 %).

Najmanji broj hlapljivih spojeva identificiran je u ekstraktu 5 – dvadeset i dva (22) spoja. Sastav i udio tih spojeva prikazan je u tablici 5. Vidljivo je da se ekstrakt 5 razlikuje od prethodnih ekstrakata. Naime glavni hlapljivi spoj ovog ekstrakta je 2-feniloctena kiselina (27,32 %) koja je identificirana u ostalim ekstraktima, ali u manjim udjelima (1,71 - 5,12 %). Najveća razlika u usporedbi s ekstraktima 1 - 4 je u sadržaju 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona. 3-Hidroksi-4-fenilbutan-2-on je kvantitativno važan hlapljivi sastojak ekstrakta 5 s udjelom od 12,76 %. 4-Hidroksikinolin i *p*-aminoacetofenon, glavni hlapljivi spojevi ostalih ekstrakata, kvantitativno su značajni sastojci i ekstrakta 5. Udio *p*-aminoacetofenona u ekstraktu je 1 3,16 %, a 4-hidroksikinolina 11,29 %. Udjeli vomifoliola, deoksivazikinona i 8-hidroksikinolina u ovom ekstraktu su 3,49 %, 2,74 % i 2,59 %.

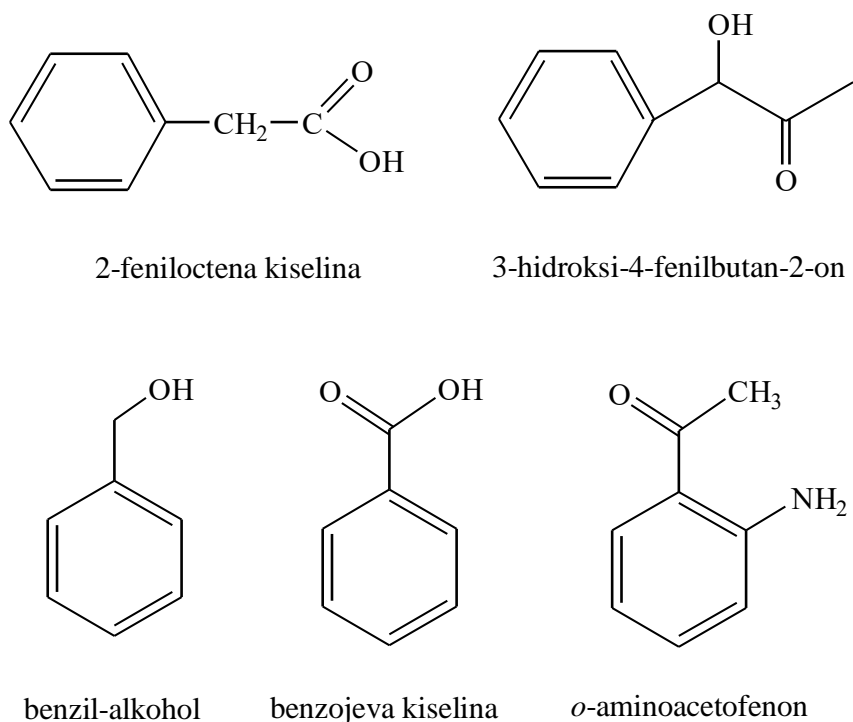
Usporedbom kemijskog sastava hlapljivih spojeva identificiranih u diklormetanskim ekstraktima kestenovog meda (tablice 1 – 5) mogu se izdvojiti spojevi koji su zajednički svim ekstraktima: benzil-alkohol, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on, benzojeva kiselina, terpendiol I, 2-feniloctena kiselina, *o*-aminoacetofenon, *p*-aminoacetofenon, 8-hidroksikinolin, vomifoliol, deoksivazikinon 4-hidroksikinolin i oktadekan-1-ol. Glavni hlapljivi spojevi u diklormetanskim ekstraktima su 4-hidroksikinolin i *p*-aminoacetofenon (slika 13). Izuzetak je ekstrakt 5 u kojem je glavni hlapljivi spoj 2-feniloctena kiselina, a karakterizira ga i visoki udio 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona.



Slika 13. Glavni hlapljivi spojevi u ekstraktima kestenovog meda

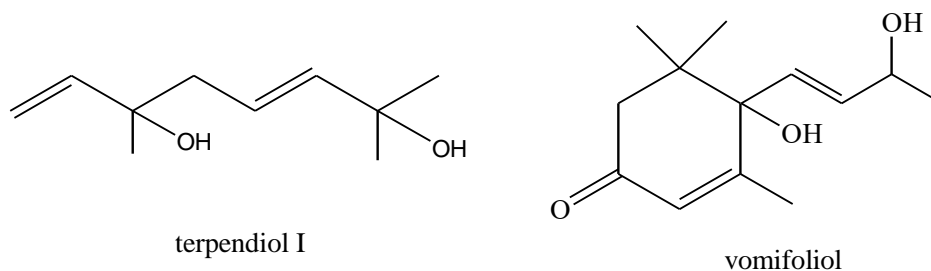
Hlapljivi organski spojevi (VOCs, od engl. *volatile organic compounds*) identificirani u različitim vrstama meda klasificiraju se na dva načina. S obzirom na funkcijske skupine, VOCs, pripadaju različitim skupinama organskih spojeva. To su: ugljikovodici, alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline, esteri, derivati benzena te derivati furana i pirana. Osim na navedeni način VOCs meda klasificiraju se i u različite skupine prirodnih organskih spojeva kao što su terpeni i norizoprenoidi. VOCs identificirani u različitim vrstama meda predstavljaju tzv. *fingerprint* određenog meda i mogu poslužiti za međusobno razlikovanje monofloernih vrsta meda i pružiti vrijedne podatke o botaničkom i zemljopisnom porijeklu meda. Međutim, samo VOCs i njihovi metaboliti koji su u med dospjeli iz biljaka mogu se koristiti kao markeri botaničkog porijekla meda. U tom smislu se u literaturi navode spojevi koji spadaju u tri skupine organskih spojeva, terpene, norizoprenoide i derivate benzena.<sup>26</sup>

Prema tome, glavni hlapljivi spojevi u diklormetanskim USE ekstraktima kestenovog meda su alkohol 4-hidroksikinolin i keton *p*-aminoacetofenon (slika 13). Nadalje, 4-hidroksikinolin je alkaloid, a *p*-aminoacetofenon je derivat benzena. U skupinu derivata benzena spadaju i glavni hlapljivi spoj ekstrakta 5, kiselina 2-feniloctena kiselina, kao i keton 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on te benzil-alkohol, benzojeva kiselina i keton *o*-aminoacetofenon (slika 14).



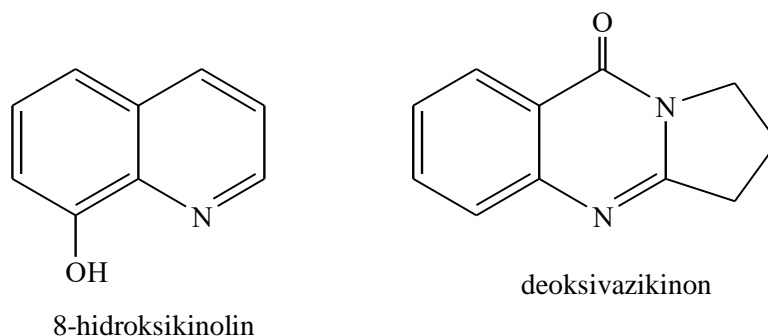
Slika 14. Derivati benzena u ekstraktima meda kestena

Alkohol terpendiol I i keton vomifoliol (slika 15) spadaju u veliku i raznoliku skupinu prirodnih organskih spojeva – terpene.



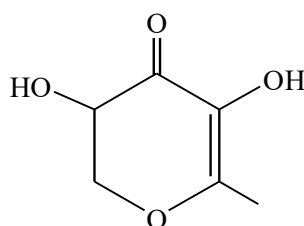
Slika 15. Glavni terpeniski spojevi u ekstraktima meda kestena

U svim ekstraktima meda kestena identificirana su, osim 4-hidroksikinolina, još dva alkaloida: alkohol 8-hidroksikinolin i keton deoksivazikinon (slika 16).



Slika 16. Alkaloidi u ekstraktima meda kestena

U derivate pirana, točnije 4*H*-piran-4-ona (4-pirona ili 4-piranona) spada 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on (slika 17). Taj spoj nastaje zagrijavanjem meda, odnosno toplinski je artefakt. Zagrijavanjem meda već pri temperaturi od 50 °C nastaju hlapljivi spojevi, koji nisu originalno prisutni u medu. Njihovo nastajanje najviše ovisi o temperaturi i duljini zagrijavanja, ali i o pH vrijednosti meda te o vrsta ugljikohidrata i aminokiselina ili proteina prisutnih u medu. U svim ekstraktima meda kestena identificiran je jedan viši alifatski alkohol, oktadekan-1-ol, trivijalnog imena stearil-alkohol.



Slika 17. 2,3-Dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on

Određivanje kemijskog sastava i udjela hlapljivih spojeva meda predstavlja tzv. *fingerprint* tog meda. *Fingerprint* meda i, posebno, identifikacija hlapljivih spojeva karakterističnih za taj med korisni su za određivanje botaničkog porijekla meda. Hlapljivi spojevi karakteristični za pojedinu vrstu meda mogu poslužiti kao markeri njegovog botaničkog porijekla. Prof. Jerkovića i suradnici objavili su niz radova u kojima su kao prikladne metode za izolaciju hlapljivih markera botaničkog porijekla meda i dobivanje tipičnih kemijskih profila meda istakli ultrazvučnu ekstrakciju otapalom (USE) i mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

U ovom radu je utvrđeno da su glavni sastojci USE ekstrakata meda kestena 4-hidroksikinolin i *p*-aminoacetofenon. Izuzetak je ekstrakt 5 kojeg, uz 4-hidroksikinolin i *p*-aminoacetofenon, karakterizira visoki udio 2-feniloctene kiseline i 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona. U literaturi se kao specifični hlapljivi markeri meda kestena navode *p*-aminoacetofenon i *o*-aminoacetofenon.<sup>26,27</sup> Jerković i suradnici su u USE ekstraktima monoflornog kestenovog meda identificirali 2-feniloctenu kiselinu i predložili ga kao novi hlapljivi marker mada kestena.<sup>28</sup> U ovom radu utvrđeno je da je alkaloid 4-hidroksikinolin također jedan od glavnih hlapljivih spojeva meda kestena. Poznato je da neke vrste meda sadrže značajne količine spojeva s dušikom koji mogu biti korisni kao markeri botaničkog porijekla meda.<sup>29</sup> Tako su Oelschlaegel i suradnici utvrdili prisustvo 4-hidroksikinolina u medu različka, a Khallouki i suradnici u medu divlje žižule (*Ziziphus lotus* L.).<sup>30,31</sup> Dakle, 2-feniloctena kiselina, *p*-aminoacetofenon, i *o*-aminoacetofenon karakteristični su za med kestena te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla. Prema rezultatima ovog rada 4-hidroksikinolin bi također mogao biti karakteristični marker botaničkog porijekla kestenovog meda.

## 5. ZAKLJUČAK

- Ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) organskim otapalom, diklormetanom, izolirani su hlapljivi spojevi iz pet uzoraka monoflornog meda kestena, a njihov kemijski sastav i sadržaj u dobivenim ekstraktima određen je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). U svim ekstraktima identificirani su sljedeći spojevi: benzil-alkohol, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on, benzojeva kiselina, terpendiol I, 2-feniloctena kiselina, *o*-aminoacetofenon, *p*-aminoacetofenon, 8-hidroksikinolin, vomifoliol, deoksivazikinon 4-hidroksikinolin i oktadekan-1-ol.
- Glavni hlapljivi spojevi u svim ekstraktima meda kestena su 4-hidroksikinolin i *p*-aminoacetofenon, uz izuzetak jednog uzorka u kojem je glavni hlapljivi spoj 2-feniloctena kiselina, a karakterizira ga i visoki udio 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona.
- Poznato je da hlapljivi spojevi karakteristični za pojedinu vrstu meda mogu poslužiti kao markeri njegovog botaničkog porijekla. Derivati benzena, 2-feniloctena kiselina i *p*-aminoacetofenon, glavni hlapljivi spojevi u USE ekstraktima kestenovog meda, karakteristični su za med kestena te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla. Prema rezultatima ovog rada i spoj s dušikom, alkaloid 4-hidroksikinolin bi također mogao biti karakteristični marker botaničkog porijekla kestenovog meda.



## 6. LITERATURA

1. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Med> (pristupljeno 14.09.2021. )
2. <https://www.pcelarstvo-radosevic.hr/blog/sve-o-medu/> (pristupljeno 14.09.2021. )
3. <https://www.centarzdavlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/kratka-povijest-meda/> (pristupljeno 14.09.2021.)
4. Narodne novine, *Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda*, Ministarstvo poljoprivrede RH, br. 30/2015
5. Kapš P. *Liječenje pčelinjim proizvodima – Apiterapija*, Geromar d.o.o. Rijeka, 2014
6. <https://www.tportal.hr/lifestyle/clanak/i-s-medom-treba-oprezno-a-evo-i-zasto-20141028> (pristupljeno 15.09.2021.)
7. I. Mujić, V. Alibabić, D. Travljanin *Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda*, veleučilišni udžbenik, Veleučilište u Rijeci, Rijeka, 2014
8. Narodne novine, *Pravilnik o medu*, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH, broj 46/07, 155/08
9. K. Batinić, D. Palinić, *Priručnik o medu*, Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet u Mostaru, Mostar, 2014
10. <https://gospodarski.hr/casopis/medun-ili-med-medljikovac/> (pristupljeno 16.09.2021)
11. F. Herceg *Fizikalno-kemijska analiza meda kestena, lipe i livade*, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017, str ta i ta
12. A. Crnoja *Kemijska, fizikalna i antioksidativna svojstva meda*, diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2018
13. <https://medjimurje.hr/aktualno/ziva-zemlja/pogresno-misljenje-o-kristaliziranom-medu-3700/> (pristupljeno 16.09.2021.)
14. [http://www.zzjzpgz.hr/obavijesti/natjecaj2008/Marijanovic\\_i\\_Jerkovic.pdf](http://www.zzjzpgz.hr/obavijesti/natjecaj2008/Marijanovic_i_Jerkovic.pdf) (pristupljeno 20.)
15. I. Jerković *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2011, str. 122-126. str. 122
16. A. M. Machado, M. G. Miguel, M. Vilas – Boas, A. C. Figueiredo *Honey Volatiles as a Fingerprint for Botanical Origin*, 2020
17. H. Drmić, A. Režek Jambrak *Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva*, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2010
18. C.E. Manyi-Loh, R.N. Ndip, A.M. Clarke, *Int J Mol Sci*, 12 (2011), 9514-9532

19. <https://www.hielscher.com/hr/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>  
(pristupljeno 17.09.2021.)
20. <https://www.inspecto.hr/hr/wiki/G/gc-msms> (pristupljeno 18.09.2021.)
21. Nj. Radić, L. Kukoč Modun *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 631, 654-655
22. [https://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography%E2%80%93mass\\_spectrometry](https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry)  
(pristupljeno 18.09.2021.)
23. I. Jerković, A. Radonić *Praktikum iz organske kemije*, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2009, str. 60-62
24. [https://hr.wikipedia.org/wiki/Pitomi\\_kesten](https://hr.wikipedia.org/wiki/Pitomi_kesten) (pristupljeno 19.09.2021.)
25. <https://pcelar-grobotek.hr/med-od-kesten/> (pristupljeno 19.09.2021.)
26. L. Piasenzotto, L. Gracco, L. Conte, *J. Sci. Food Agric.* **83** (2003) 1037-1044.
27. J. S. Bonvehi, F. V. Coll, *J. Sci. Food Agric.* **83** (2003) 275-282.
28. I. Jerković, J. Mastelić, Z. Marijanović, Ž. Klein, M. Jelić, *Ultrason. Sonochem.*, **14** (2007) 750-756.
29. P. M. Kuš, *Molecules* **25** (2020) 847-857.
30. S. Oelschlaegel, L. Pieper, R. Staufenbiel, M. Gruner, L. Zeippert, B. Pieper, I. Koelling-Speer, K. Speer, *J. Agric. Food Chem.*, **60** (2012) 11811-11820.
31. F. Khallouki, M. Akdad, T. Bouddine, L. Hajji, R. W. Owen, *J. Apic. Sci.* **64** (2020) 287-299.