

# Profil hlapljivih spojeva meda kestena

---

**Bekan, Monika**

**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:167:171095>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA MEDA KESTENA**

**Završni rad**

**MONIKA BEKAN**

**Matični broj: 446**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA MEDA KESTENA**

**Završni rad**

**MONIKA BEKAN**

**Matični broj: 446**

**Split, rujan 2021.**

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

**VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF CHESTNUT HONEY**

**Bachelor thesis**

**MONIKA BEKAN**

**Parent number: 446**

**Split, september 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

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

### PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA MEDA KESTENA

Monika Bekan, 446

#### Sažetak:

Med je prirodno sladak proizvod kojeg proizvode pčele, iznimno važni mali kukci. Uz med, one proizvode i neke druge za ljude važne proizvode. Med je danas u najširoj primjeni u području prehrane, a u povijesti se smatrao važnim lijekom za veliki broj različitih infekcija. Za procjenu kvalitete meda, jedno od važnijih svojstava je njegova aroma. Za miris, odnosno aromu meda iznimno su važni hlapljivi spojevi.

U ovom radu su izolirani hlapljivi spojevi meda kestena pomoću ultrazvučne ekstrakcije organskim otapalom (USE) te je dobiveni ekstrakt analiziran plinskom kromatografijom uz masenu spektrometriju kao metodu detekcije i identifikacije. Kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi u ekstraktima meda kestena su derivati benzena. U tu skupinu spojeva spadaju glavni sastojci svih ekstrakata, *p*-aminoacetofenon i 2-feniloctena kiselina te 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on kao i benzil-alkohol, benzojeva kiselina i *o*-aminoacetofenon. Visoki udjeli 2-feniloctene kiseline i *p*-aminoacetofenona, kao i prisustvo *o*-aminoacetofenona, u ekstraktima meda kestena karakteristični su za taj med te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla.

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

**Rad sadrži:** 48 stranica, 15 slika, 5 tablica, 23 literaturne reference

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Igor Jerković	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član
3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	član – mentor

#### Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-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 PROFILE OF CHESTNUT HONEY

Monika Bekan, 446

#### Abstract:

Honey is a naturally sweet product produced by bees, exceptionally important little insects. Besides honey, they produce other products important to humankind. Nowadays, honey is mostly used in the food industry, but throughout history, it was considered important medicine for a large number of infections. For the quality assessment of honey, one of the most important properties is its aroma. For the scent (aroma) of honey, volatile compounds are exceptionally important.

In this thesis, volatile compounds of chestnut honey were extracted using ultrasonic extraction with organic solvent (USE), and the extracts obtained were analyzed using gas chromatography with mass spectrometry as a method of detection. Qualitatively and quantitatively the most important volatile compounds in all extracts of chestnut honey are benzene derivatives. The main constituents in all extracts, *p*-aminoacetophenone and 2-phenylacetic acid, as well as 3-hydroxy-4-phenylbutan-2-one, benzyl alcohol, benzoic acid and *o*-aminoacetophenone are all benzene derivatives. High content of 2-phenylacetic acid and *p*-aminoacetophenone, as well as the presence of *o*-aminoacetophenone, in chestnut honey extracts are characteristic of this honey and can be considered as markers of its botanical origin.

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

**Thesis contains:** 48 pages, 15 figures, 5 tables, 23 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

1. Igor Jerković - PhD, full prof.	chair person
2. Zvonimir Marijanović - 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.*



*Zahvaljujem se svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci i pomoći tijekom dosadašnjeg studiranja.*

*Osobito se zahvaljujem izv. dr. sc. prof. Ani Radonić na pruženoj prilici, mentorstvu i pomoći tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Marini Zekić na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela.*

***Monika Bekan***

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Izolirati hlapljive spojeve monoflornog meda kestena ultrazvučnom ekstrakcijom (USE, engl. *ultrasound- assisted extraction*) uz smjesu otapala pentan:dietil-eter 1:2 (v/v).
2. Analizirati dobivene ekstrakte vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) te odrediti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u ekstraktima.

## SAŽETAK

Med je prirodno sladak proizvod kojeg proizvode pčele, iznimno važni mali kukci. Uz med, one proizvode i neke druge za ljude važne proizvode. Med je danas u najširoj primjeni u prehrani, a u povijesti se smatrao i važnim lijekom za veliki broj različitih infekcija. Za procjenu kvalitete meda jedno od važnijih svojstava je njegova aroma. Aroma je, općenito, kombinirana impresija okusa i mirisa. Za miris meda iznimno su važni hlapljivi spojevi.

U ovom radu su izolirani hlapljivi spojevi meda kestena pomoću ultrazvučne ekstrakcije organskim otapalom (USE, engl. *ultrasound-assisted extraction*) te su dobiveni ekstrakti analizirani plinskom kromatografijom uz masenu spektrometriju kao metodu detekcije. Kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi u ekstraktima meda kestena su derivati benzena. U tu skupinu spojeva spadaju glavni sastojci svih ekstrakata, *p*-aminoacetofenon i 2-feniloctena kiselina te 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on kao i benzil-alkohol, benzojeva kiselina i *o*-aminoacetofenon. Visoki udjeli 2-feniloctene kiseline i *p*-aminoacetofenona, kao i prisustvo *o*-aminoacetofenona, u ekstraktima meda kestena karakteristični su za taj med te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla.

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

## SUMMARY

Honey is a naturally sweet product produced by bees, exceptionally important little insects. Besides honey, they produce other products important to humankind. Nowadays, honey is mostly used in the food industry, but throughout history, it was considered important medicine for a large number of infections. For the quality assessment of honey, one of the most important properties is its aroma. For the aroma of honey, volatile compounds are exceptionally important.

In this thesis, volatile compounds of chestnut honey are extracted using ultrasonic extraction with organic solvent (USE), and the extract obtained is analyzed using gas chromatography with mass spectrometry as a method of detection and identification. Qualitatively and quantitatively the most important volatile compounds in all extracts of chestnut honey are benzene derivatives. The main constituents in all extracts, *p*-aminoacetophenone and 2-phenylacetic acid, as well as 3-hydroxy-4-phenylbutan-2-one, benzyl alcohol, benzoic acid and *o*-aminoacetophenone are all benzene derivatives. High content of 2-phenylacetic acid and *p*-aminoacetophenone, as well as the presence of *o*-aminoacetophenone, in chestnut honey extracts are characteristic of this honey and can be considered as markers of its botanical origin.

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

# Sadržaj

Uvod.....	1
1. Opći dio.....	2
1.1. Povijesni pregled pčelarstva .....	2
1.2. Pčele.....	3
1.2.1. Sistematika.....	3
1.3. Med .....	4
1.3.1. Med kestena .....	5
1.4. Fizikalno-kemijska svojstva meda.....	6
1.4.1. Fizikalna svojstva .....	6
1.4.2. Kemijski sastav meda .....	7
1.5. Senzorska svojstva meda .....	8
1.6. Hlapljivi spojevi u medu.....	10
1.6.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva .....	10
1.6.2. Analiza hlapljivih spojeva .....	12
2. Eksperimentalni dio .....	14
2.1. Kemikalije i aparatura.....	14
2.2. Izolacija hlapljivih spojeva .....	15
2.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija (USE) .....	15
2.2.2. Koncentriranje uzorka frakcijskom destilacijom .....	16
2.3. Analiza hlapljivih spojeva .....	17
3. Rezultati .....	19
4. Rasprava.....	29
4.1. Hlapljivi spojevi meda kestena .....	29
5. Zaključak .....	34
6. Literatura.....	35

## Uvod

Med je svima poznata i široko upotrebljavana namirnica. Prirodno je sladak proizvod pčela, malih kukaca iznimno važnih za ljudski rod. Uz med, pčele proizvode još neke važne proizvode kao što su propolis, vosak, matičnu mliječ i druge.

Svojstva i učinci koje posjeduje med širokog su spektra. O tome puno govori i činjenica da se ranije u povijesti med smatrao lijekom za veliki broj različitih infekcija i bolesti, a u prehrani se koristio masovno sve do pojave šećera koji ga je, kao jeftinije sladilo, u velikoj mjeri zamijenio.

U sastav meda ulazi veliki broj spojeva (preko 70 različitih spojeva). Iako taj veliki broj spojeva med čini vrlo kompleksnom smjesom, ipak se spojevi mogu svrstati u samo nekoliko skupina: ugljikohidrati, voda, organske kiseline, proteini i aminokiseline, enzimi, mineralne tvari i vitamini te fenolni spojevi. Najveći dio meda čine ugljikohidrati i voda.

Aroma meda jedno je od važnijih svojstava pri procjeni njegove kvalitete, a nju ponajprije određuje udio i sastav hlapljivih spojeva sadržanih u medu. Često zbog toga hlapljivi spojevi nose naziv „spojevi arome“. Za izolaciju i analizu hlapljivih spojeva potrebno je poznavati med kao namirnicu i pažljivo odabrati prikladnu metodu zbog već spomenutog složenog kemijskog sastava. Najčešće korištene metode u ovu svrhu su ultrazvučna ekstrakcija (USE) i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME, engl. *solid-phase microextraction*). Za analizu i identifikaciju hlapljivih spojeva najprikladnija je primjena vezanog sustava plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS, engl. *gas chromatography-mass spectrometry*).<sup>1-9</sup>

# 1. Opći dio

## 1.1. Povijesni pregled pčelarstva

Poveznica između čovjeka i pčele datira još iz doba neolitika (5 000 – 7 000 godina p.n.e). Najstariji takav dokaz pronađen je u pećini Cueva de la Aran u Španjolskoj (slika 1). U špilji se nalazi slika na kojoj je prikazan čovjek s posudom kako rukom uzima saće dok pčele lete oko njega.<sup>1</sup>



Slika 1. Pećina Cueva de la Aran (Španjolska)<sup>2</sup>

Važnost smještaja pčela u košnice su prvi proučavali i shvatili Egipćani te su se prve košnice koje su se izrađivale i postavljale u svrhu kontroliranog uzgoja pčela pojavile oko 2 600 godine p.n.e.

Med su u kozmetici počeli koristiti Sumerani još 2 000 – 3 000 godina p.n.e. Asirci i Babilonci su ga koristili za tretiranje kožnih, očnih, probavnih i mnogih drugih infekcija. U nekim kulturama se koristio još i prilikom obreda ukopa i pripreme tijela pokojnika, dok je u drugima predstavljao vrijedan zavjetni dar.

Pčelarstvo se brzo proširilo kroz razne narode zbog glavnih proizvoda, meda i voska, koji se koriste u prehrani (med) i za proizvodnju svijeća (vosak).

Posebice se isticala važnost meda u prehrani sve do pojave šećera koji je ekonomski gledano bio jeftiniji i zamijenio med. Razvoj pčelarstva je u tom periodu zastao do 17. stoljeća kada je nizozemski biolog Jan Swammerdan počeo proučavati pčele i uočio mnoge jedinstvene novitete kod njih.<sup>1</sup>

## 1.2. Pčele

Pčele se smatraju najvažnijim kukcima oprašivačima biljaka cvjetnjača. Procijenjeno je da 1/3 ljudske ishrane potječe od voća, povrća i orašastih plodova s biljaka koje su ponajviše ovisne o pčelama kao oprašivačima.

Pčele većinski žive u izuzetno organiziranim zajednicama gdje svaka pčela ima svoju zadaću čime doprinose kvaliteti života zajednice. Također, postoje i pčele koje preferiraju život izvan zajednice. One same obavljaju sve zadatke, nemaju maticu, ne roje se te rade i žive u različitim uvjetima.<sup>3</sup>

### 1.2.1. Sistematika

Porodica pčela obuhvaća preko 5 700 vrsta koje su prema načinu života vrlo raznolike.

Sistematika medonosnih pčela:

Carstvo:	Životinje ( <i>Animalia</i> )
Razred:	Kukci ( <i>Insecta</i> )
Porodica:	Pčele ( <i>Apidae</i> )
Potporodica:	<i>Apinae</i>
Rod:	<i>Apis</i>
Vrsta:	<i>Apis mellifera</i>

Vrstu pčela *Apis mellifera* je u skupinu *Insecta* uveo Carl von Linne. Ime roda potječe od latinske riječi za pčelu, *Apis*, a naziv vrste od grčke riječi *mellifera* što znači „medonosan“.

Broj poznatih i opisanih vrsta medonosnih pčela mijenjao se tijekom posljednjih 250 godina, a izvornima se smatraju četiri vrste: *Apis mellifera*, *Apis florea*, *Apis cerana* i *Apis dorsata*.<sup>3</sup>



### 1.3. Med

Med predstavlja jedan od proizvoda pčelinjeg rada. Uz to nam pčele donose još vosak, matičnu mliječ, propolis i pčelinji otrov. Pčele med proizvode na način da skupljenim biljnim sokovima, koje nakon hranjenja ostavljaju kao višak, dodaju vlastite specifične tvari i prevode ih u med. One skupljaju nektar i odnose ga u košnicu, a pritom obrađuju nektar u svom medenom mjehuru. Tu započinje odvijanje reakcija razgradnje saharoze pomoću pčelinih enzima pri čemu se također uklanja višak vode. Pčele po dolasku u košnicu ispunjavu saće dio po dio, a nakon punjenja, svaki šesterokut saća zatvaraju tankom opnom od voska (slika 2).<sup>4</sup>



Slika 2. Punjenje saća<sup>5</sup>

Prema Pravilniku o medu kojeg je izdalo Ministarstvo poljoprivrede RH, osnovne vrste meda s obzirom na podrijetlo su:

- cvjetni ili nektarni med (med dobiven od nektara biljaka)
- medljikovac ili medun (med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca koji žive na dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka).<sup>6</sup>

Prema botaničkom podrijetlu med se dijeli na:

- monoflorni (npr. med bagrema, kadulje, lipe, lavande, ružmarina, suncokreta, kestena...)
- poliflorni (mješavina meda različitog botaničkog porijekla).<sup>6</sup>

### 1.3.1. Med kestena

Med kestena se ističe među ostalim vrstama meda. Posjeduje specifičnu tamno crvenkastu boju i intenzivan okus, koji je nerijetko i gorkast (slika 3).

Sama proizvodnja meda kestena spada među najzahtjevnije zbog ograničenosti područja paše pčela. Šume kestena nisu toliko zastupljene kao druge kulture te je zbog vremenskih uvjeta u lipnju i srpnju (visoke temperature) kestenov med potrebno vrcati što prije.

Zahvaljujući bogatom mineralnom sadržaju, antioksidativnim i antibakterijskim svojstvima, jedan je od najzdravijih vrsta meda. Osebnim svojstvima djeluje na cjelokupni probavni sustav. Potiče rad crijeva, olakšava rad preopterećene jetre i žući te štiti želučanu i crijevnu sluznicu. Također, ima izvanrednu ulogu u oporavku od žutice, poslije operacije žući i sl.

Uz navedena djelovanja, ovaj med još ojačava imunitet, njeguje i pomlađuje kožu te je izvrsna zamjena za šećer.<sup>7</sup>



Slika 3. Med kestena<sup>8</sup>

## 1.4. Fizikalno-kemijska svojstva meda

### 1.4.1. Fizikalna svojstva

Pod fizikalnim svojstvima meda podrazumijevaju se kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, električna vodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije i specifična masa.

Fizikalna svojstva meda usko su povezana sa kemijskim sastavom meda. Na primjer, dokazano je da viskoznost, indeks refrakcije i specifična masa meda ovise o udjelu vode. Na optička svojstva utječu sastav i udio ugljikohidrata, dok je električna vodljivost povezana s udjelom mineralnih tvari.

Električna vodljivost je karakteristika tvari da provodi električnu struju, a mjeri se konduktometrijski u 20 %-tnim otopinama meda. Prema Pravilniku, najveća dozvoljena električna vodljivost meda je 0,8 mS/cm.<sup>6</sup>

Viskoznost je fizikalna veličina koja prikazuje otpor tekućine prema tečenju. Viskoznost meda ovisi o sadržaju vode i to tako da manji postotak vode daje veću viskoznost meda. Na viskoznost još utječu količina i odnos između monosaharida i oligosaharida.

Higroskopnost meda je osobina da u ovisnosti o relativnoj vlažnosti i udjelu vode na sebe privlači ili otpušta vodu. Proces se odvija do nastanka ravnoteže.

Optička aktivnost meda podrazumijeva da zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u ovisnosti o sastavu ugljikohidrata. Fruktaza zakreće ravninu u lijevo, a ostali ugljikohidrati (glukoza, di-, tri- i oligosaharidi) je zakreću u desno.

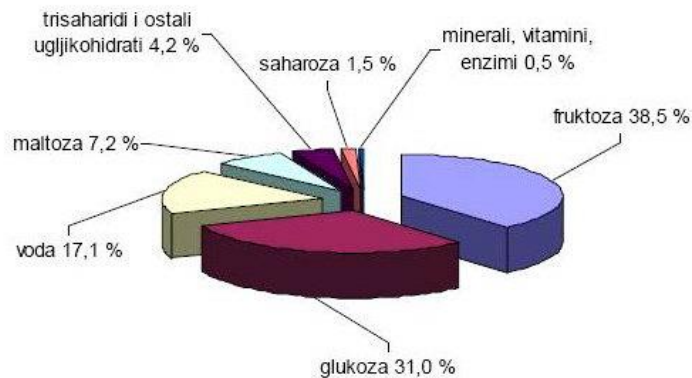
Indeks refrakcije je bezdimenzijska veličina koja opisuje širenje svjetlosti. Služi kao mjera za udio vode, odnosno topljive suhe tvari u medu.

Specifična masa meda predstavlja omjer mase meda prema masi iste količine vode. Ovisi najprije o udjelu vode u medu.

Kristalizacija je prirodno svojstvo meda. Med kristalizira zbog činjenice da je to zapravo prezasićena otopine glukoze. Zbog toga spontano prelazi u ravnotežno stanje kristalizacijom pri čemu glukoza gubi vodu i prelazi u kristalni oblik.<sup>9</sup>

### 1.4.2. Kemijski sastav meda

U kemijski sastav meda ulaze ugljikohidrati, voda, organske kiseline, proteini i aminokiseline, enzimi, mineralne tvari i vitamini te fenolni spojevi (slika 4).



Slika 4. Kemijski sastav meda<sup>10</sup>

Ugljikohidrati (šećeri) su glavni sastojci meda s udjelom od 73-83 % ukupne mase meda. Od toga, na fruktozu i glukozu otpada 85 % ukupnih ugljikohidrata. Pored toga, med sadrži još i disaharide (saharoza, maltoza, izomaltoza...) te nešto malo trisaharida i oligosaharida.

Drugi najzastupljeniji sastojak meda je voda s udjelom otprilike 13-25 %. Količina vode predstavlja glavni parametar stabilnosti meda, odnosno njegove otpornosti na kristalizaciju i fermentaciju.

Od organskih spojeva u medu izdvaja se hidroksimetilfurfural (HMF). To je organski spoj čija količina ukazuje na prekomjerno zagrijavanje meda tijekom prerade, dugo skladištenje (dolazi do povećanja količine HMF) kao i aktivnost enzima dijastaze (gubitak i/ili inhibicija enzima). i.

Ostali sastojci meda se nalaze u manjim postotcima, a doprinose mirisu, okusu, mikrobiološkoj stabilnosti i drugim svojstvima te su pokazatelji kakvoće, trajnosti, čuvanja meda i sl.<sup>11</sup>

Prema Pravilniku o medu dozvoljene vrijednosti određenih komponenti su\*:

1. količina šećera

a) količina fruktoze i glukoze (zbroj) - najmanje 60 g/100 g

b) količina saharoze - najviše 5 g/100 g

2. količina vode - najviše 20 %

3. količina tvari netopljivih u vodu - najviše 0,1 g/100 g

4. slobodne kiseline - najviše 50 mEq kiseline na 1000 g

5. količina HMF - najviše 40 mg/kg<sup>6</sup>

## **1.5. Senzorska svojstva meda**

Najvažnija senzorska svojstva meda su boja, okus i miris. Ova svojstva ponajviše ovise o biljnom podrijetlu meda te o uvjetima prerade i čuvanja. Analiza senzorskih svojstava igra važnu ulogu u definiranju ukupnih svojstava meda.

Boja meda razlikuje se u ovisnosti o botaničkom podrijetlu, a može biti svijetložuta, žuta, smeđa do tamnosmeđa (slika 5). Med poslije kristalizacije postaje svjetliji (kristali glukoze su bijeli), ali potamni tijekom čuvanja i to intenzivnije potamni ako se čuva pri višoj temperaturi. Na boju meda utječu kemijski sastav te udio karotenoida, flavonoida, klorofila, antocijanina, tanina i šećera. Pronađena je još i poveznica između boje meda i količine pepela, posebice željeza, bakra i mangana.

---

\* Za pojedine vrste meda zadane vrijednosti se mogu razlikovati (*Pravilnik o medu*, Ministarstvo poljoprivrede, NN br. 30/2015)<sup>6</sup>



Slika 5. Različite boje meda (rastući intenzitet obojenja)<sup>12</sup>

Miris meda potječe od preko pedeset spojeva. Većinom ovisi o biljci (ili biljkama) sa koje su pčele sakupljale nektar. Mirisne tvari su lako hlapljive pa čuvanjem ili zagrijavanjem, miris meda slabi ili se u potpunosti gubi. Mirisne tvari se mogu podijeliti u tri skupine: karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni; uključuju HMF), alkoholi i esteri. Aroma meda potječe od eteričnih ulja (terpena), aromatičnih aldehida, diacetila, metilacetilkarbamata, hlapljivih i nehlapljivih kiselina. Aroma slabi kristalizacijom meda zbog uklapanja kiselina u kristale glukoze.

Okus meda je usko povezan s njegovim mirisom. Naime, miris i okus zajedno čine aromu. Za med je karakteristična njegova slatkoća koja je posljedica određenog udjela i omjera glukoze, fruktoze, aminokiselina, eteričnih ulja i organskih kiselina. Tako med varira od slatkog do gorkog, u ovisnosti o navedenom omjeru i udjelima određenih skupina. Med nakon fermentacije poprimi kiseli okus.

Da bi med imao zadovoljavajuća svojstva, potrebno je paziti kako se s njime postupa (način obrade, skladištenje i sl.). Ako se ne postupa na pravilan način, dolazi do tamnjenja, slabljenja arome te pojave neželjenih okusa.<sup>13</sup>

## **1.6. Hlapljivi spojevi u medu**

Hlapljivi spojevi su u medu prisutni u vrlo niskim koncentracijama, odgovorni su za njegovu aromu te se često, iako netočno, nazivaju i „spojevima arome“ Hlapljivi spojevi čine složenu smjesu spojeva relativno malih molekulskih masa, a pripadaju sljedećim skupinama organskih spojeva: alkoholima, aldehidima, ketonima, esterima i karboksilnim kiselinama.<sup>14</sup>

Ponajprije nastaju direktnim prijenosom iz biljke, pa profil (kemijski sastav i sadržaj) ovakvih spojeva najviše ovisi o vrsti biljke s koje su pčele skupljale nektar, o vremenskim uvjetima i zemljopisnom položaju ispaše pčela.

Nastanak ovih spojeva moguć je također pretvorbom biljnih sastojaka i proizvodnjom od strane pčela, pretvorbama spojeva prisutnih u nezrelom medu te dodatnim postupcima obrade.<sup>15</sup>

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

S obzirom da je med složena smjesa spojeva, izolacija hlapljivih spojeva može biti izazov. Potrebno je poznavati med kao namirnicu i izabrati najoptimalniju metodu izolacije.<sup>13</sup>

U svrhu izolacije hlapljivih spojeva iz meda najčešće se biraju metode iz sljedećih skupina:

- ekstrakcije otapalima
- destilacijske tehnike
- tehnike „vršnih“ para
- sorpcijske tehnike.<sup>17</sup>

Pritom su najčešće korištene metode ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE) i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME).

#### → Ekstrakcijske tehnike

Ekstrakcija predstavlja metodu pročišćavanja i izolacije tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Organsko otapalo koje se pritom koristi mora zadovoljavati određene uvjete (inertnost prema prisutnim tvarima, dobra topljivost tvari u otapalu, zadovoljavajuća razlika u gustoći otapala i tvari i sl.).<sup>16</sup>

Najčešće korištena otapala u tu svrhu su diklormetan, smjesa pentana i dietil-etera, heksan, etanol, aceton a koriste se i tzv. superkritični fluidi (CO<sub>2</sub> ili N<sub>2</sub>).

Česte ekstrakcijske tehnike su ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija kruto-tekuće, ultrazvučna ekstrakcija, ubrzana ekstrakcija otapalom, itd.<sup>17</sup>

#### → Destilacijske metode

Destilacija je postupak kojim se tekućina zagrijavanjem prevodi u paru, a nastala para se hlađenjem kondenzira te skuplja kao destilat (kondenzat). Provodi se u svrhu pročišćavanja tekućih tvari, razdvajanja smjesa tekućina različitih vrelišta, otparavanja organskog otapala te identifikacije tekućih tvari.

Destilacijske metode se dijele na: vodene destilacije (hidrodestilacije), vodeno-parne destilacije i destilacije vodenom parom.<sup>16</sup>

#### → Tehnike izolacije vršnih para

Vršnim parama se naziva skupina najisparljivijih spojeva koji se nalaze u ravnoteži s uzorkom. Njihovo sakupljanje predstavlja jedan od najjednostavnijih načina izolacije aromatičnih spojeva. Ove tehnike se općenito dijele na statičke i dinamičke.

Karakteristike ovih tehnika su povoljna brzina i jednostavnost, izvođenje bez otapala i s malom količinom uzorka čime se izbjegava nastajanje artefakata.<sup>17</sup>



→ Sorpcijske tehnike

Ove tehnike omogućuju ekstrakciju bez korištenja otapala te predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Zasnivaju se na raspodjeli organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma.

Najčešće korištene tehnike iz ove skupine su mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (SPME, (engl. *headspace solid-phase microextraction*) i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću (SBSE, engl. *stir bar sorptive extraction*).<sup>17</sup>

### **1.6.2. Analiza hlapljivih spojeva**

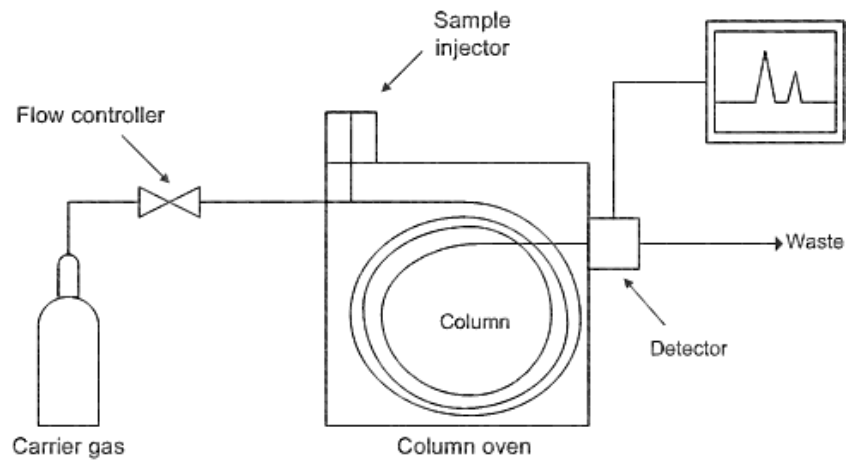
Analiza hlapljivih spojeva obuhvaća identifikaciju pojedinih sastojaka smjese (kvalitativna analiza) te određivanje udjela identificiranih sastojaka (kvantitativna analiza).

Instrumentna metoda koja je najprikladnija i pretežito se koristi za analizu hlapljivih spojeva je plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom kao detekcijskom metodom (GC-MS).<sup>13</sup>

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je separacijska tehnika koja se temelji na različitoj raspodjeli pojedinih sastojaka između dviju faza koje se ne miješaju. Pokretna (mobilna) faza se u plinovitom stanju kreće preko ili kroz nepokretnu (stacionarnu) fazu koja se nalazi u koloni. Može se koristiti za izravno izdvajanje i analizu plinovitih i tekućih uzoraka te hlapljivih krutina.

Najčešći princip rada kod ove tehnike podrazumijeva da se uzorak najprije prevedu u plinovito stanje te se pomoću plina nositelja (pokretna faza) prenosi kroz kolonu u kojoj se nalazi nepokretna faza. Plinovi koji u ovom slučaju služe kao nositelji uzorka najčešće su He, Ar, N<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>.

Uređaj u kojem se provodi ova tehnika naziva se plinski kromatograf (slika 6). Osnovni dijelovi uređaja su: sustav za dopremu plinova, injektor, pećnica, kolona, detektor i sustav za obradu podataka (računalo).



Slika 6. Plinski kromatograf <sup>18</sup>

Primjenom plinske kromatografije moguće je razdvojiti hlapljive i poluhlapljive sastojke smjese, ali ih nije moguće identificirati. U tu svrhu se najčešće s plinskom kromatografijom kombinira masena spektrometrija (engl. *mass spectrometry*, MS). Ova detekcijska metoda omogućava identifikaciju pojedinih komponenata pomoću strukturnih podataka na molekulskoj razini.

GC i MS su kompatibilne tehnike iz razloga što obje zahtijevaju uzorak u plinovitom stanju. Međutim, postoje i neke razlike, npr. u uvjetima rada. GC se odvija pri atmosferskom tlaku i uz plin nositelj, dok se MS izvodi u vakuumu. Iz navedenog razloga se komponente nakon razdvajanja na GC koloni provode kroz povoljnu međufazu i tek onda ulaze u spektrometar masa. Međufaze koje se najčešće koriste su EI (elektronska ionizacija) i CI (kemijska ionizacija).<sup>19</sup>

## 2. Eksperimentalni dio

Med korišten u ovom radu je monoflorni med kestena, dobiven od Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Monoflornost meda potvrđena je melisopalinološkom analizom.

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu projekta Agronomskog fakulteta s nekoliko sveučilišnih ustanova u Hrvatskoj, uključujući Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, na kojem je izrađen ovaj rad.

Analizirano je ukupno pet uzoraka meda kestena, a svaki uzorak obrađen je istim otapalom, istom metodom i uz pomoć iste aparature.

### 2.1. Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- destilirana voda
- natrijev sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), bezvodni, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska.

Aparature:

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

## 2.2. Izolacija hlapljivih spojeva

U svrhu izolacije hlapljivih spojeva iz uzorka meda korištena je metoda ultrazvučne ekstrakcije, a izolirani spojevi su analizirani vezanim sustavom GC-MS. Koncentriranje uzorka, odnosno otparavanje otapala nakon ekstrakcije provedeno je frakcijskom destilacijom preko vodene kupelji.

### 2.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija (USE)

Ultrazvučna ekstrakcija predstavlja ekstrakciju organskim otapalom potpomognutu ultrazvučnim valovima. Organsko otapalo korišteno za ekstrakciju hlapljivih spojeva je smjesa pentan:dietil-eter = 1:2 (v/v).

Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju sastoji se od Erlenmeyerove tikvice, povratnog Liebigovog hladila i ultrazvučne kadice (kupelji) (slika7).



Slika 7. Aparatura za USE

Pomoću tehničke vage odvagano je 40 g meda i otopljeno u Erlenmeyerovoj tikvici uz dodatak 22 ml destilirane vode. Smjesa je intenzivno miješana u svrhu bržeg otapanja.

Zatim je odvagano i u tikvicu dodano 1,5 g bezvodnog natrijevog sulfata te je miješanje nastavljeno. Nakon što je med potpuno otopljen, u tikvicu je dodano 20 ml otapala za ekstrakciju (smjesa pentana i dietil-etera).

Nakon toga je tikvica uronjena u vodom napunjenu ultrazvučnu kupelj, na nju je postavljeno povratno hladilo te je započeta ekstrakcija. Ekstrakcija se provodila 30 minuta pri temperaturi  $25 \pm 3$  °C. Po završetku ekstrakcije tikvica je uklonjena iz kupelji.

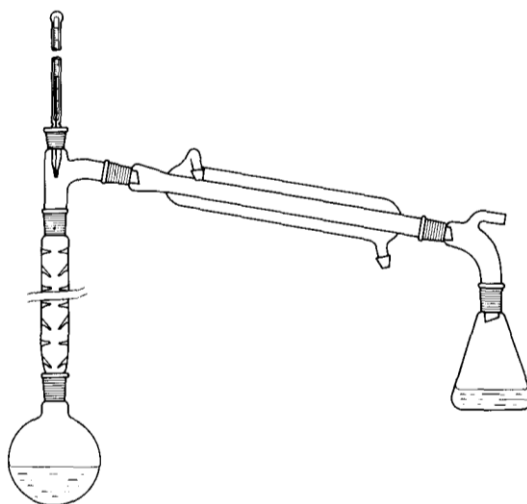
Kada su se slojevi dovoljno oštro odvojili, pomoću kapaljke je odvojen gornji, organski sloj i filtriran preko lijevka za filtraciju. Lijevak je pripremljen na način da je na vrh vrata stavljeno malo pamučne vata i iznad nje sloj bezvodnog natrijevog sulfata. Na ovaj način se organski ekstrakt (otapalo s izoliranim spojevima) suši prolaskom preko sloja  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Ovaj postupak je ponovljen ukupno 3 puta po uzorku uz dodavanje nove količine otapala. Dobiveni organski ekstrakti su udruženi i dalje obrađeni frakcijskom destilacijom.

### 2.2.2. Koncentriranje uzorka frakcijskom destilacijom

Otparavanje otapala provodi se u svrhu uklanjanja viška organskog otapala i koncentriranja uzorka. Takav uzorak je prikladniji za GC-MS analizu.

Organski ekstrakt je koncentriran frakcijskom destilacijom (slika 8) na volumen od oko 2-3 ml. Zagrijavanje je vršeno preko vodene kupelji. Nakon otparavanja uzorak je prebačen u staklene bočice i čuvan u hladnjaku do GC-MS analize.



Slika 8. Aparatura za frakcijsku destilaciju<sup>16</sup>

### 2.3. Analiza hlapljivih spojeva

Dobiveni ekstrakti s hlapljivim spojevima analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) (slika 9).



Slika 9. Vezani sustav GC-MS u Zavodu za organsku kemiju  
Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu

Analize su provedene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS, Agilent Technologies) kemijskog sastava: 5 % difenil i 95 % dimetilpolisiloksan. Dimenzije kolone su 30 m x 0,25 mm, a debljina sloja stacionarne faze je 0,25  $\mu\text{m}$ . 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: zadržavanje 3,5 min na 70 °C, potom 70 do 200 °C brzinom od 3 °C/min i zadržavanje od 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 najsličniji spektru nepoznatog spoja koji je predstavljen pikom na kromatogramu,
- vrijeme zadržavanja pojedinog sastojka u minutama,
- udio pojedinog sastojka u postotcima, % (izračunat iz površine pikova na kromatogramu koristeći metodu normalizacije bez korekcijskih faktora).

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

Hlapljivi spojevi izolirani su iz meda kestena (pet uzoraka meda označenih K1 – K5) ultrazvučnom ekstrakcijom, USE, smjesom otapala pentan:dietil-eter 1:2, v/v (poglavlje 2.2.). Dobiveno je pet ekstrakata, koji su radi jednostavnosti označeni na isti način, K1 – K5. Ekstrakti su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 1 - 5. Spojevi u tablicama poredani su prema redosljedu 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

tr. – spoj prisutan u tragovima, < 0,1 %.

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak K1

Redni broj	Ime spoja	$t_R$ (min)	RI	Udio (%)
1.	3-metilbutanska kiselina	3,130	< 900	1,01
2.	furfural	3,300	< 900	0,43
3.	2-metilbutanska kiselina	3,279	< 900	0,57
4.	2-furanmetanol	3,561	< 900	0,30



5.	nonan	4,250	901	5,01
6.	benzaldehyd	5,759	950	0,38
7.	heksanska kiselina	5,953	977	0,28
8.	benzil-alkohol	7,839	1041	3,24
9.	linalol	10,124	1103	0,37
10.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on	11,699	1148	3,95
11.	benzojeva kiselina	12,798	1174	5,34
12.	terpendiol I	13,650	1193	0,69
13.	2-feniloctena kiselina	16,151	1256	1,27
14.	nonanska kiselina	16,982	1275	0,39
15.	2,6,11-trimetildodekan <sup>a</sup>	17,347	1283	0,76
16.	<i>o</i> -aminoacetofenon	18,213	1302	2,46
17.	3-fenilprop-2-en-1-ol (cinamil-alkohol)	18,437	1308	0,71
18.	( <i>Z</i> )-cimetna kiselina*	21,212	1377	0,74
19.	3,7-dimetilokt-1-en-3,6,7-triol <sup>a</sup>	21,847	1391	0,58
20.	tetradekan	22,348	1400	0,84
21.	( <i>E</i> )-cimetna kiselina*	23,476	1432	1,66
22.	<i>p</i> -hidroksiacetofenon	24,129	1446	1,14
23.	dodekan-1-ol	25,347	1478	0,42
24.	pentadekan	26,202	1498	0,78

25.	<i>p</i> -aminoacetofenon	27,103	1522	18,09
26.	5-aminoindan-1-on	29,690	1589	1,83
27.	heksadekan	30,218	1602	0,61
28.	<i>o</i> -aminobenzojeva kiselina	32,164	1656	1,57
29.	8-hidroksikinolin <sup>a</sup>	33,792	1699	3,81
30.	heptadekan	34,257	1713	0,53
31.	etil-3-indolilacetat <sup>a</sup>	35,562	1751	0,94
32.	tetradekanska kiselina	36,168	1771	1,71
33.	vomifoliol	37,219	1797	1,73
34.	oktadekan	37,412	1803	0,49
35.	diizobutil-ftalat	39,714	1872	0,48
36.	heksadekan-1-ol	40,107	1884	2,32
37.	deoksivazikinin <sup>a</sup>	42,187	1948	4,79
38.	dibutil-ftalat	42,775	1967	4,04
39.	heksadekanska kiselina	42,829	1968	3,78
40.	izopropil-palmitat	44,778	2029	1,23
41.	( <i>Z</i> )-9-oktadecen-1-ol	45,771	2060	0,83
42.	oktadekan-1-ol	46,619	2086	3,36

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak K2

Redni broj	Ime spoja	$t_R$ (min)	RI	Udio (%)
1.	furfural	3,300	< 900	0,38
2.	nonan	4,250	901	4,56
3.	benzaldehyd	5,759	950	0,47
4.	limonen	7,703	1037	0,51
5.	benzil-alkohol	7,839	1041	1,82
6.	metil-2-furoat	9,448	1086	0,71
7.	2-feniletanol	10,638	1119	0,54
8.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on	11,699	1148	1,56
9.	benzojeva kiselina	12,798	1174	5,37
10.	terpendiol I	13,650	1193	4,90
11.	2,3-dihidrobenzofuran <sup>a</sup>	14,859	1200	0,80
12.	5-hidroksimetilfurfural	15,171	1209	1,24
13.	2-feniloctena kiselina	16,151	1256	15,77
14.	<i>o</i> -aminoacetofenon	18,213	1302	1,81
15.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	20,064	1350	4,14
16.	( <i>E</i> )-8-hidroksilinalol	20,823	1368	1,45
17.	3,7-dimetilokt-1-en-3,6,7-triol <sup>a</sup>	21,847	1391	1,68

18.	<i>p</i> -aminoacetofenon	27,103	1522	8,95
19.	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	27,513	1533	5,03
20.	<i>o</i> -aminobenzojeva kiselina	32,164	1656	3,53
21.	siringaldehid	32,471	1665	3,11
22.	8-hidroksikinolin <sup>a</sup>	33,792	1699	1,53
23.	benzil-benzoat	36,163	1768	3,11
24.	metil-siringat	36,495	1777	1,59
25.	vomifoliol	37,219	1797	4,98
26.	oktadekan	37,412	1803	0,62
27.	heksadekan-1-ol	40,107	1884	0,63
28.	nonadekan	40,447	1893	1,62
29.	deoksivazikinon <sup>a</sup>	42,187	1948	1,90
30.	heksadekanska kiselina	42,829	1968	3,28
31.	oktadekan-1-ol	46,619	2086	1,38

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak K3

<b>Redni broj</b>	<b>Ime spoja</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b>RI</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	furfural	3,300	< 900	0,29
2.	nonan	4,250	901	7,72
3.	benzil-alkohol	7,839	1041	2,05
4.	2-feniletanol	10,638	1119	0,60
5.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on	11,699	1148	1,59
6.	benzojeva kiselina	12,798	1174	4,30
7.	terpendiol I	13,650	1193	0,94
8.	2-feniloctena kiselina	16,151	1256	15,40
9.	<i>o</i> -aminoacetofenon	18,213	1302	2,05
10.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	20,064	1350	3,40
11.	<i>p</i> -aminoacetofenon	27,103	1522	13,15
12.	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	27,513	1533	2,86
13.	5-aminoindan-1-on	29,690	1589	1,15
14.	<i>o</i> -aminobenzojeva kiselina	32,164	1656	5,89
15.	8-hidroksikinolin <sup>a</sup>	33,792	1699	2,00
16.	benzil-benzoat	36,163	1768	2,35
17.	vomifoliol	37,219	1797	4,28

18.	oktadekan	37,412	1803	2,59
19.	heksadekan-1-ol	40,107	1884	0,79
20.	deoksivazikinon <sup>a</sup>	42,187	1948	2,09
21.	heksadekanska kiselina	42,829	1968	3,97
22.	oktadekan-1-ol	46,619	2086	1,85

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak K4

<b>Redni broj</b>	<b>Ime spoja</b>	<b><i>t<sub>R</sub></i> (min)</b>	<b>RI</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	3-metilbutanska kiselina	3,130	< 900	0,47
2.	furfural	3,300	< 900	tr.
3.	2-metilbutanska kiselina	3,279	< 900	0,71
4.	2-furanmetanol	3,561	< 900	tr.
5.	nonan	4,250	901	7,27
6.	limonen	7,703	1037	0,58
7.	benzil-alkohol	7,839	1041	1,43
8.	2-feniletanol	10,638	1119	0,38
9.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on	11,699	1148	1,52
10.	benzojeva kiselina	12,798	1174	4,58

11.	terpendiol I	13,650	1193	1,07
12.	2,3-dihidrobenezofuran <sup>a</sup>	14,859	1200	0,96
13.	2-feniloktana kiselina	16,151	1256	5,23
14.	nonanska kiselina	16,982	1275	0,48
15.	<i>o</i> -aminoacetofenon	18,213	1302	1,81
16.	3-fenilprop-2-en-1-ol (cinamil-alkohol)	18,437	1308	0,65
17.	2-metoksi-4-vinilfenol	18,779	1318	0,53
18.	8- <i>p</i> -menten-1,2-diol	19,888	1345	3,63
19.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	20,064	1350	2,26
20.	<i>p</i> -hidroksifeniletanol	23,463	1432	1,31
21.	( <i>E</i> )-cimetna kiselina*	23,476	1432	0,88
22.	dodekan-1-ol	25,347	1478	0,42
23.	<i>p</i> -aminoacetofenon	27,103	1522	17,86
24.	5-fenilpent-4-enska kiselina <sup>a</sup>	28,657	1563	0,51
25.	5-aminoindan-1-on	29,690	1589	1,56
26.	<i>o</i> -aminobenzojeva kiselina	32,164	1656	2,03
27.	8-hidroksikinolin <sup>a</sup>	33,792	1699	2,72
28.	heptadekan	34,257	1713	0,49
29.	etil-3-indolilacetat <sup>a</sup>	35,562	1751	0,26
30.	benzil-benzoat	36,163	1768	1,23
31.	tetradekanska kiselina	36,168	1771	0,53

32.	vomifoliol	37,219	1797	2,37
33.	oktadekan	37,412	1803	1,66
34.	heksadekan-1-ol	40,107	1884	0,97
35.	deoksivazikinon <sup>a</sup>	42,187	1948	2,39
36.	heksadekanska kiselina	42,829	1968	3,98
37.	oktadekan-1-ol	46,619	2086	2,09
38.	oktadekanska kiselina	49,729	2166	1,17

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u medu kestena – uzorak K5

<b>Redni broj</b>	<b>Ime spoja</b>	<b><i>t<sub>R</sub></i> (min)</b>	<b>RI</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	3-metilbutanska kiselina	3,130	< 900	0,31
2.	furfural	3,300	< 900	tr.
3.	2-metilbutanska kiselina	3,279	< 900	0,31
4.	benzaldehyd	5,759	950	0,40
5.	1,8-cineol	7,758	1039	0,98
6.	benzil-alkohol	7,839	1041	1,97
7.	2-feniletanol	10,638	1119	tr.
8.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on	11,699	1148	1,61



9.	benzojeva kiselina	12,798	1174	4,18
10.	terpendiol I	13,650	1193	1,99
11.	2,3-dihidrobenzofuran <sup>a</sup>	14,859	1200	0,62
12.	2-feniloctena kiselina	16,151	1256	47,83
13.	<i>o</i> -aminoacetofenon	18,213	1302	0,85
14.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	20,064	1350	17,10
15.	<i>p</i> -aminoacetofenon	27,103	1522	9,18
16.	5-aminoindan-1-on	29,690	1589	tr.
17.	8-hidroksikinolin <sup>a</sup>	33,792	1699	1,89
18.	tetradekanska kiselina	36,168	1771	0,22
19.	vomifoliol	37,219	1797	2,14
20.	heksadekan-1-ol	40,107	1884	0,54
21.	deoksivazikinin <sup>a</sup>	42,187	1948	1,77
22.	dibutil-ftalat	42,775	1967	0,93
23.	oktadekan-1-ol	46,619	2086	1,06

## 4. Rasprava

Cilj ovog rada bio je istražiti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva, nositelja arome monoflornog meda kestena. Pet uzoraka meda kestena (K1 – K5) dobivenih od Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, podvrgnuto je ultrazvučnoj ekstrakciji smjesom otapala pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Na taj je način dobiveno pet ekstrakata, K1 – K5. Ekstrakti meda kestena analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni. Kemijski sastav i udio hlapljivih i poluhlapljivih (teže hlapljivih) spojeva u ekstraktima prikazan je u tablicama 1 – 5.

### 4.1. Hlapljivi spojevi meda kestena

U USE ekstraktu meda kestena K1 identificirana su 42 hlapljiva (i poluhlapljiva) spoja (tablica 1). Najzastupljeniji hlapljivi spoj u ovom uzorku je *p*-aminoacetofenon (18,09 %). Ostali kvantitativno značajni spojevi identificirani u ekstraktu su: benzojeva kiselina (5,34 %), nonan (5,01 %), deoksivazikinon (4,79 %), 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on (3,95 %), 8-hidroksikinolin (3,81 %), heksadekanska kiselina (3,78 %), oktadekan-1-ol (3,36 %) i benzil-alkohol (3,24 %).

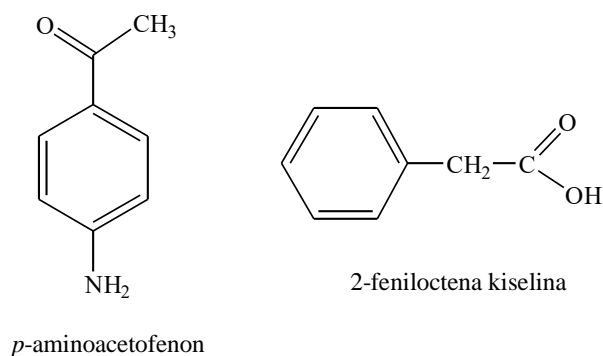
U tablici 2 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u ekstraktu meda kestena K2. U uzorku je identificiran 31 hlapljivi spoj, a glavni hlapljivi sastojci ekstrakta su 2-feniloctena kiselina (15,77 %) i *p*-aminoacetofenon (8,95 %). Ostali hlapljivi sastojci ovog ekstrakta, prisutni u većim količinama (udjelima) su: benzojeva kiselina (5,37 %), *p*-hidroksibenzojeva kiselina (5,03 %), vomifoliol (4,98 %), terpendiol I (4,90 %), nonan (4,56 %), 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on (4,14 %), *o*-aminobenzojeva kiselina (3,53 %), heksadekanska kiselina (3,28 %), benzil-benzoat (3,11 %) i siringaldehid (3,11 %).

U ekstraktu meda kestena K3 identificirana su 22 hlapljiva (i poluhlapljiva) spoja (tablica 3). Glavni hlapljivi spojevi u ekstraktu su 2-feniloctena kiselina (15,40 %) i *p*-aminoacetofenon (13,15 %), a slijede nonan (7,72 %), *o*-aminobenzojeva kiselina (5,89 %), benzojeva kiselina (4,30 %), vomifoliol (4,28 %), heksadekanska kiselina (3,97 %) i 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on (3,40 %).

Kemijski sastav i udio (sadržaj) hlapljivih spojeva u ekstraktu meda kestena K4 dan je u tablici 4. U ekstraktu su identificirana 38 hlapljivih spojeva. I u ovom ekstraktu, kao i u ekstraktima K1 i K3, glavni hlapljivi spoj je *p*-aminoacetofenon (17,86 %), a slijedi nonan (7,27 %). Udio 2-feniloctene kiseline, glavnog hlapljivog spoja u ekstraktima K2 i K3, u ovom ekstraktu je 5,23 %. Treba spomenuti još nekoliko, u kvantitativnom smislu, važnijih spojeva kao što su benzojeva kiselina (4,58 %) i heksadekanska kiselina (3,98 %) te 8-*p*-menten-1,2-diol (3,63 %). 8-*p*-Menten-1,2-diol je identificiran samo u ovom ekstraktu.

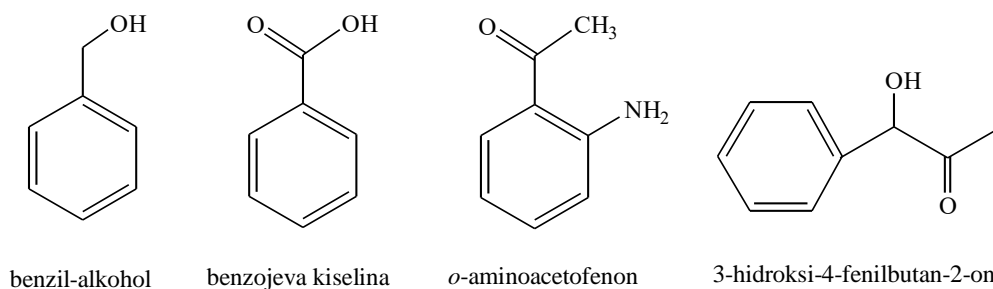
U tablici 5 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva identificiranih u ekstraktu meda kestena K5. Identificirana su 23 hlapljiva i poluhlapljiva spoja. Dominantan hlapljivi spoj u ovom ekstraktu je 2-feniloctena kiselina s udjelom od 47,83%, a kvantitativno značajan hlapljivi spoj je i 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on (17,10 %). Udio *p*-aminoacetofenona u ekstraktu K5 je također visok (9,18 %), a slijedi benzojeva kiselina (4,18 %). Ostali hlapljivi spojevi identificirani u ovom uzorku prisutni su u manjim količinama, < 2,0 %, uz izuzetak vomifoliola (2,14 %).

Usporedbom dobivenih rezultata GC-MS analiza ekstrakata meda kestena K1 – K5, vidljivo je da su u svim ekstraktima, ne uzimajući u obzir njihov udio, identificirani 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, heksadekan-1-ol, deoksivazikinon i oktadekan-1-ol. Ako se izuzme ekstrakt K5, koji je donekle različit od ostalih, u skupinu zajedničkih spojeva mogu se uvrstiti još i nonan, *o*-aminobenzojeva kiselina te heksadekanska kiselina. Naime tri navedena spoja nisu identificirana u ekstraktu K5. Glavni hlapljivi sastojci svih ekstrakata su *p*-aminoacetofenon i/ili 2-feniloctena kiselina (slika 10). Ono što ekstrakt K5 čini različitim od ostalih je izrazito visok udio 2-feniloctene kiseline i 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona.



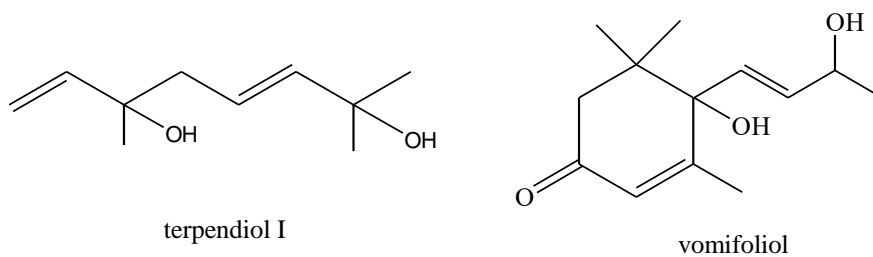
Slika 10. Strukture *p*-aminoacetofenona i 2-feniloctene kiseline

Glavni hlapljivi spojevi identificirani u različitim vrstama meda u literaturi se uobičajeno svrstavaju u tri skupine organskih spojeva, terpenoide, norizoprenoide i derivate benzena. Uzimajući u obzir navedeno, kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi u svim ekstraktima meda kestena su derivati benzena. U tu skupinu spojeva spadaju glavni sastojci svih ekstrakata, *p*-aminoacetofenon i 2-feniloctena kiselina (slika 10), kao i benzil-alkohol, benzojeva kiselina i *o*-aminoacetofenon (slika 11). Keton 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on se također može svrstati u derivate benzena (slika 11).



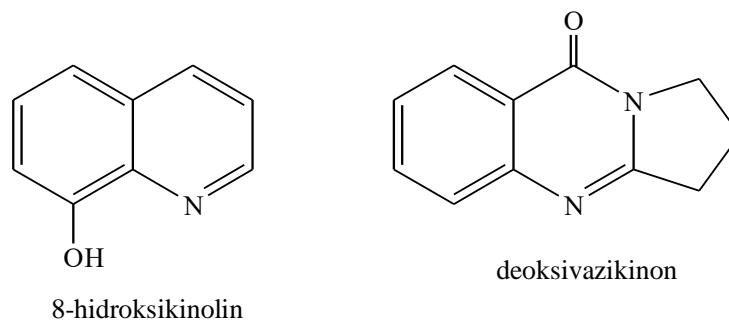
Slika 11. Strukture derivata benzena u ekstraktima meda kestena

Terpendiol I i vomifoliol (slika 12) su predstavnici terpena među zajedničkim spojevima u ekstraktima, dok norizoprenoidi nisu identificirani u ekstraktima meda kestena.

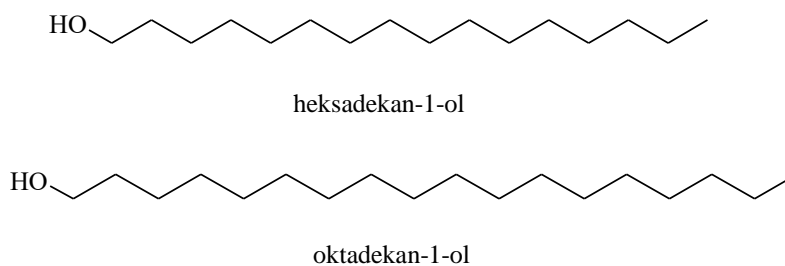


Slika 12. Glavni terpenški spojevi u ekstraktima meda kestena

Među hlapljivim spojevima koji su zajednički svim ekstraktima nalaze se dva alkaloida 8-hidroksikinolin i deoksivazikinon (slika 13) te viši alifatski alkoholi heksadekan-1-ol, trivijalnog imena palmitil-alkohol, i oktadekan-1-ol, trivijalnog imena stearil-alkohol (slika 14).

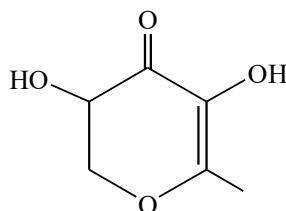


Slika 13. Alkaloidi u ekstraktima meda kestena



Slika 14. Viši alifatski alkoholi u ekstraktima meda kestena

Derivat 4*H*-piran-4-ona (4-pirona ili 4-piranona), 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on (slika 15) je spoj koji nastaje zagrijavanjem meda, odnosno toplinski je artefakt. Naime poznato je da zagrijavanje utječe na promjenu boje i arome, odnosno okusa i mirisa meda. 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.<sup>20</sup>



Slika 15. 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on

Određivanje kemijskog sastava i udjela hlapljivih spojeva meda te identifikacija karakterističnih hlapljivih spojeva korisni su za određivanje botaničkog porijekla meda. Hlapljivi spojevi karakteristični za pojedinu vrstu meda mogu poslužiti kao markeri njegovog botaničkog porijekla. Istraživački tim prof. Jerkovića je u nizu radova pokazao da su prikladne metode za izolaciju karakterističnih hlapljivih spojeva meda koji mogu poslužiti kao markeri njegovog botaničkog porijekla i dobivanje tipičnih kemijskih profila meda ultrazvučna ekstrakcija otapalom (USE) i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

U ovom radu je utvrđeno da su glavni sastojci svih ekstrakata meda kestena *p*-aminoacetofenon i 2-feniloctena kiselina, uz izuzetak ekstrakta K5 s visokim udjelom 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona. Navedeni spojevi su derivati benzena. Općenito, udio i omjer derivata benzena može poslužiti kao marker za specifičnu vrstu meda. Pregledom literature utvrđeno je da su upravo visoki udjeli 2-feniloctene kiseline i *p*-aminoacetofenona, kao i prisustvo *o*-aminoacetofenona, u ekstraktima meda kestena karakteristični za med kestena te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla.<sup>21-23</sup>

## 5. Zaključak

- Zadatak ovog istraživanja bio je odrediti kemijski sastav i udio (sadržaj) hlapljivih spojeva monoflornog meda kestena te identificirati karakteristične hlapljive spojeve - markere njegovog botaničkog porijekla.
- Ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) organskim otapalom, smjesom pentana i dietil-etera u omjeru 1:2, izolirani su hlapljivi i poluhlapljivi spojevi iz pet uzoraka meda, a njihov kemijski sastav i sadržaj u dobivenim ekstraktima određen je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).
- U svim ekstraktima, ne uzimajući u obzir njihov udio, identificirani su sljedeći spojevi: benzil-alkohol, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on, benzojeva kiselina, terpendiol I, 2-feniloctena kiselina, o-aminoacetofenon, p-aminoacetofenon, 8-hidroksikinolin, vomifoliol, heksadekan-1-ol, deoksivazikinon i oktadekan-1-ol.
- Glavni hlapljivi spojevi u svim ekstraktima meda kestena su p-aminoacetofenon i 2-feniloctena kiselina, a u jednom uzorku još i 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on.
- Kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi u svim ekstraktima meda kestena su derivati benzena. U tu skupinu spojeva spadaju glavni sastojci svih ekstrakata, p-aminoacetofenon i 2-feniloctena kiselina te 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on kao i benzil-alkohol, benzojeva kiselina i o-aminoacetofenon.
- Određivanje kemijskog sastava i udjela hlapljivih spojeva meda te identifikacija karakterističnih hlapljivih spojeva za pojedinu vrstu meda mogu poslužiti kao markeri njegovog botaničkog porijekla. Visoki udjeli 2-feniloctene kiseline i p-aminoacetofenona, kao i prisustvo o-aminoacetofenona, u ekstraktima meda kestena karakteristični su za taj med te se mogu smatrati markerima njegovog botaničkog porijekla.

## 6. Literatura

1. URL: <http://pcelari-bujstine.com/povijest-pcelarenja/> (11.08.2021.)
2. URL: <https://i0.wp.com/valencia-international.com/wp-content/uploads/2014/03/bees.jpg> (11.08.2021.)
3. M. Ošap, *Sistematika porodice pčela (Apidae, Insecta)*, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, 2017.
4. N. Plavša, N. Nedić, *Praktikum iz pčelarstva*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2015.
5. URL: [https://agrologistika.hr/media/34/2014/12/19/d896e030d18eb62e12b2b24218e58d38\\_1f0c7747ef35270a9f69859a47ee11a6\\_crop.jpg](https://agrologistika.hr/media/34/2014/12/19/d896e030d18eb62e12b2b24218e58d38_1f0c7747ef35270a9f69859a47ee11a6_crop.jpg) (18.08.2021.)
6. *Pravilnik o medu*, Zakon o poljoprivredi, Ministarstvo poljoprivrede, NN br. 30/2015.
7. URL: <http://pcelarstvokomljenovic.com/proizvodi/med-kesten/> (18.08.2021.)
8. URL: [https://webshop.gligora.com/images/shop/6972/med\\_kesten\\_daruvar\\_web.jpg](https://webshop.gligora.com/images/shop/6972/med_kesten_daruvar_web.jpg) (18.08.2021.)
9. P. Petričko, *Fizikalno-kemijski parametri cvjetnog meda kontinentalne Hrvatske*, Završni rad, Veleučilište u Karlovcu, 2015
10. M. Marković, *Upotreba meda u prehrambenoj industriji*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2014.
11. D. Gjuračić, *Fizikalno-kemijske karakteristike različitih vrsta meda hrvatskog i slovenskog podrijetla*, Završni rad, Veleučilište u Karlovcu, 2016.
12. URL: <https://gumdrop.ru/hr/ovoschnye/cvet-meda-v-zavisimosti-ego-proishozhdeniya-kakie-byvayut-sorta-meda-temnye/> (10.09.2021.)
13. A. Buzdovačić, *Hlapljivi spojevi meda od kadulje*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2020.
14. M. Trupina, *Profil hlapljivih spojeva cvjetnog meda*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2019.
15. I. Vlaić, *Hlapljivi spojevi meda od facelije prije i poslije zagrijavanja*, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
16. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2009.
17. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011.



18. [URL:https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/87/Gas\\_chromatograph.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/87/Gas_chromatograph.png) (16.09.2021.)
19. I. Dusper, *Pregled i razvoj spregnutih metoda plinske kromatografije u kontroli kakvoće farmaceutskih tvari i proizvoda*, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018.
20. S. I. F. S. Martins, W. M. F. Jongen and M. A. J. S. Van Boeckel, *Trends Food Sci. Techn.*, **11** (2001) 364-373.
21. I. Jerković, J. Mastelić, Z. Marijanović, Ž. Klein, M. Jelić, *Ultrason. Sonochem.*, **14** (2007) 750-756.
22. A. M. Machado, M. G. Miguel, M. Vilas-Boas, A. C. Figueiredo, *Molecules*, **25** (2020) 374-406.
23. 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.