Bioorgansko istraživanje kemijskih profila i markera odabranih vrsta meda

Kranjac, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:907878

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu

KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

Marina Kranjac

BIOORGANSKO ISTRAŽIVANJE KEMIJSKIH PROFILA I MARKERA ODABRANIH VRSTA MEDA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2018.

University of Split

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Marina Kranjac

BIOORGANIC RESEARCH OF CHEMICAL PROFILES AND MARKERS FROM SELECTED HONEY TYPES

DOCTORAL THESIS

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

Marina Kranjac

BIOORGANSKO ISTRAŽIVANJE KEMIJSKIH PROFILA I MARKERA ODABRANIH VRSTA MEDA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Marina Kranjac

BIOORGANIC RESEARCH OF CHEMICAL PROFILES AND MARKERS FROM SELECTED HONEY TYPES

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Dr. Igor Jerković, full prof.

Split, 2018.

UDK:	638.162(043.3).
Znanstveno područje:	Prirodne znanosti
Znanstveno polje:	Kemija
Znanstvena grana:	Organska kemija
Institucija:	Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Zavod za organsku kemiju
Voditelj rada:	Prof. dr. sc. Igor Jerković
Broj stranica:	134
Broj slika:	20
Broj tablica:	39
Broj priloga:	0
Broj literaturnih referenci:	269
Datum obrane:	2. veljače 2018.
Sastav povjerenstva za obranu:	Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split Doc. dr. sc. Marin Roje, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković, Zagreb Prof. dr. sc. Igor Jerković, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split
Rad je pohranjen u:	Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35; Knjižnici Sveučilišta u Splitu, Ruđera Boškovića 31; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb.

Tema doktorske disertacije je odobrena na 14. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog Fakulteta Sveučilišta u Splitu, održanoj dana 30. listopada 2014. godine.

JEDNE NOĆI

Te noći pisah sjedeć posve mirno,
Da ne bih majci u susjednoj sobi
Škripanjem stolca u san dirno.

A kad mi koja ustrebala knjiga,
Sasvim sam tiho išao po sagu.
U svakoj kretnji bila mi je briga
Da staričicu ne probudim dragu.

I noć je tekla spokojna i nijema.
A tad se sjetih da je više nema.

Dobriša Cesarić

Ovaj doktorski rad je posvećen

mojoj majci,

suprugu Anti i sinu Krunu.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću na stručnim savjetima tijekom doktorskog studija i izrade doktorske disertacije.

Posebno hvala doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći kod izrade dijela eksperimenata iz ovog rada.

Također, hvala prof. dr. sc. Carlu I. G. Tuberosu koji mi je omogućio izradu dijela eksperimentalnog rada na Il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di Cagliari u Italiji. Zahvaljujem se i njegovom timu.

Ovim putem se želim zahvaliti i doc. dr. sc. Marinu Roji, višem znanstvenom suradniku, koji mi je omogućio eksperimentalni rad u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju na Institutu Ruđer Bošković. Hvala i na korisnim savjetima tijekom pregleda doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Draganu Bubalu i suradnicima sa Agronomskog fakulteta u Zagrebu na pomoći oko prikupljanja i izbora uzoraka.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na korisnim savjetima tijekom pregleda doktorske disertacije.

Hvala prof. dr. sc. Davoru Rušiću koji me potaknuo na upis doktorskog studija.

Moj rad na ovoj doktorskoj disertaciji sufinacirala je Hrvatska zaklada za znanost („Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti"). Zahvaljujem se Hrvatskoj zakladi za znanost na financiranju ovog istraživanja u okviru istraživačkog projekta HRZZ-IP-11-2013-8547 naziva "Research of Natural Products and Flavours: Chemical Fingerprinting and Unlocking the Potential".

HRZZ
Hrvatska zaklada za znanost

SAŽETAK

Bioorgansko istraživanje 8 različitih uniflornih vrsta meda je temeljeno na primjeni plinske (GC) i tekućinske kromatografije (HPLC) s ciljem određivanja kemijskih profila i ciljanih organskih spojeva, među kojima su istaknuti potencijalni markeri botaničkog podrijetla. Primjena komplementarnih metoda ekstrakcije (HS-SPME, mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi; USE, ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalima; SPE, ekstrakcija na krutoj fazi) je omogućila dobivanje potpunijih kemijskih profila isparljivih i poluisparljivih spojeva. Glavni spojevi identificirani u vršnim parama *Taraxacum officinale* Weber meda su nitrili, posebice 3-metilpentanonitril (do 29,9%) i fenilacetonitril (do 20,9%). Pored nitrila, drugi značajni spojevi vršnih para identificirani u manjem postotku su razgranate alifatske kiseline i norizoprenoidi. Glavni spojevi identificirani u ekstraktima, feniloctena kiselina (do 24,0%) i dehidrovomifoliol (do 19,3%), nisu prethodno pronađeni u ovoj vrsti meda. Za razliku od feniloctene kiseline, dehidrovomifoliol se može smatrati karakterističnim spojem za med od maslačka. U kemijskim profilima isparljivih/poluisparljivih spojeva meda *Coriandrum sativum* L., identificirano je nekoliko korisnih kemijskih markera, posebno *cis*/*trans*-anhidrolinalool oksidi (ukupno 5,9%) u vršnim parama i 3,4,5-trimetoksibenzil-alkohol (do 26,3%) u ekstraktima. 3,4,5-Trimetoksibenzil-alkohol se može istaknuti kao specifičan kemijski marker, budući da do sada nije pronađen u drugim vrstama meda. Glavni spojevi vršnih para meda *Trifolium pratense* L. su izomeri aldehida jorgovana (7,6%-21,4%), nakon kojih slijede fenilacetaldehid (10,1-31,2%) i benzaldehid (7,0-15,7%). Profil vršnih para je važan za karakterizaciju navedene vrste meda, budući da se glavni spojevi ekstrakata, viši alifatski alkoholi i ugljikovodici, mogu povezati sa okolišem i sastavom saća. Glavni spojevi vršnih para meda *Satureja subspicata* Vis. su fenilacetaldehid (30,2%) i benzaldehid (23,8%). Spojevi identificirani u ekstraktima (pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*); diklormetan) meda *Satureja subspicata* Vis. su metil-siringat (46,7%; 53,0%,), manji postotak drugih isparljivih derivata prefenata, te viši alifatski spojevi. Primjećena je značajna sličnost sa kemijskim profilom ekstrakata (pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*)) meda *Satureja montana* L., u kojima je glavni spoj metil-siringat (53,8%), a potom siringaldehid (18,9%) i benzojeva kiselina (5,6%). Hotrienol je glavni spoj identificiran u vršnim parama (75,9-81,7%). U vršnim parama meda *Satureja hortensis* L. identificirani su, hotrienol (22,8%) i drugi derivati linaloola, benzaldehid (6,1%), fenilacetaldehid (4,9%) i nekoliko norizoprenoida, među kojima je safranal (7,6%) glavni spoj. Glavni spoj identificiran u ekstraktu (pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*)), uz ostale derivate benzena, je metil-siringat (54,7%). HPLC-DAD se pokazala kao korisna metoda koja nadopunjuje dobivene GC-MS/FID rezultate

kemijskog profiliranja uzoraka meda *Satureja* vrsta. HPLC-DAD analizom, u uzorcima meda *Satureja subspicata* Vis. je pronađen 3-4 puta viši sadržaj metil-siringata u usporedbi sa drugim *Satureja* vrstama meda. U *Coffea* spp. medu identificirani su glavni derivati ksantina (teobromin i kofein HPLC-DAD analizom i kofein GC-MS/FID analizom). Fenilacetaldehid je glavni spoj vršnih para meda *Coffea* spp. Enantioselektivnom HPLC analizom ekstrakata *Galactites tomentosa* Moench. meda određen je visok enantiomerni višak (–)-3-fenilmliječne kiseline (e.v. > 95%). Visoka enatiomerna čistoća ovog kemijskog markera može poslužiti u karakterizaciji i utvrđivanju botaničkog podrijetla *Galactites tomentosa* Moench. meda.

Ključne riječi:

uniflorni med, botaničko podrijetlo, kemijski profili, kemijski biomarkeri, ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE), mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), ekstrakcija na krutoj fazi (SPE), GC-MS/FID analiza, HPLC-DAD analiza, enantiomeri, enantioselektivna HPLC analiza, CD/UV detektor, polarimetrijski (OR) detektor, enantiomerni višak

ABSTRACT

Bioorganic research of 8 different unifloral honeys was based on gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC) in order to determine chemical profiles and targeted organic compounds, among which potential markers of botanical origin were highlighted. The application of complementary extraction methodologies (HS-SPME, headspace solid-phase mixroextraction; USE, ultrasonic solvent extraction; SPE, solid-phase extraction) enabled comprehensive chemical profiles of volatile and semivolatile compounds. The dominant compounds of *Taraxacum officinale* Weber headspace were nitriles, particularly 3-methylpentanenitrile (up to 29.9%) and phenylacetonitrile (up to 20.9%). Besides nitriles, lower methyl branched aliphatic acids and norisoprenoids were relevant minor constituents of the headspace. Major compounds identified in the extracts, phenylacetic acid (up to 24.0%) and dehydrovomifoliol (up to 19.3%), were not previously found in this honey type. Dehydrovomifoliol can be considered as characteristic compound of dandelion honey in distinction from phenylacetic acid. In volatile/semivolatile chemical profiles of *Coriandrum sativum* L. honey, several useful chemical markers were identified, particularly *cis/trans*-anhydro-linalool oxides (total 5.9%) found in the headspace and 3,4,5-trimethoxybenzyl alcohol (up to 26.3%) found in the extracts. 3,4,5-Trimethoxybenzyl alcohol can be emphasized as a specific chemical marker, as it has not so far been found in other honey types. Lilac aldehyde isomers dominated in the headspace (7.6%-21.4%) of *Trifolium pratense* L. honey, followed by phenylacetaldehyde (10.1-31.2 %) and benzaldehyde (7.0-15.7 %). The HS-SPME profile is valuable for characterization of this honey type, as predominant constituents of the honey extracts, higher aliphatic alcohols and hydrocarbons, could be associated with the comb environment. Major compounds of *Satureja subspicata* Vis. honey headspace were phenylacetaldehyde (30.2%) and benzaldehyde (23.8%). The extracts (pentane:diethyl ether, 1:2 (*v*/*v*); dichloromethane) from *Satureja subspicata* Vis. honey contained methyl syringate (46.7%, 53.0%,) and minor abundance of other volatile prephenate derivatives, as well as higher aliphatic compounds. Significant composition similarity is noticed with the chemical profile of the extracts from *S. montana* L. honey samples, with methyl syringate (53.8%) as predominant compound, followed by syringaldehyde (18.9%) and benzoic acid (5.6%). Hotrienol was identified in headspace as the dominant compound (75.9-81.7%). Hotrienol (22.8 %) along with other linalool derivatives, benzaldehyde (6.1 %), phenylacetaldehyde (4.9 %) and few norisoprenoids (safranal (7.6 %) as the major) were identified in *Satureja hortensis* L. honey headspace. Dominant compound identified in the extract, along with other benzene derivatives,

was methyl syringate (54.7%). HPLC-DAD was useful method which supplements the results obtained by GC-MS/FID chemical profiling of *Satureja* honey types. HPLC-DAD analysis of the samples of *S. subspicata* Vis. honey revealed 3–4 times higher amount of methyl syringate compared with other *Satureja* honey types. In *Coffea* spp. honey dominant xanthine derivatives were identified (theobromine and caffeine with HPLC-DAD and caffeine by USE/GC-MS/FID). Phenylacetaldehyde was the major headspace compound of *Coffea* spp. honey. Using enantioselective HPLC analysis of *Galactites tomentosa* Moench. honey extracts high enantiomeric excess of (–)-3-phenyllactic acid (ee > 95%) was determined. High enantiomeric purity of this chemical marker can be useful for *Galactites tomentosa* Moench. honey characterization and determination of its botanical origin.

Key words:

unifloral honey, botanical origin, chemical profiles, chemical biomarkers, ultrasonic solvent extraction (USE), headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), solid-phase extraction (SPE), GC-MS/FID analysis, HPLC-DAD analysis, enantiomers, enantioselective HPLC analysis, CD/UV detector, polarimetric (OR) detector, enantiomeric excess

Sadržaj

1. UVOD ... 1
2. OPĆI DIO ... 3
2.1. Med ... 4
2.1.1. Osnovne značajke meda ... 5
2.1.2. Fizikalna svojstva ... 5
2.1.3. Kemijski sastav ... 8
2.2. Utjecaj toplinske obrade na kemijski sastav meda ... 10
2.3. Biološka aktivnost ... 11
2.4. Određivanje botaničkog podrijetla meda ... 13
2.5. Kemijsko profiliranje i identifikacija biomarkera ... 15
2.5.1. Podjela kemijskih markera ... 15
2.5.1.1. Isparljivi spojevi ... 16
2.5.1.2. Flavonoidi i ostali fenolni spojevi ... 34
2.5.1.3. Ugljikohidrati ... 38
2.5.1.4. Aminokiseline i ostali spojevi sa dušikom ... 41
2.5.1.5. Ostali organski spojevi i mikroelementi ... 44
3. MATERIJALI I METODE ... 48
3.1. Uzorci meda i biljni izvori ... 49
3.2. Primjena preparativnih metoda ekstrakcije ... 52
3.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) ... 53
3.2.2. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalima (USE) ... 54
3.2.3. Ekstrakcija na krutoj fazi (SPE) ... 55
3.3. Analiza ekstrakata plinskom kromatografijom ... 55
3.3.1. Plinska kromatografija sa plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) ... 56
3.3.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) ... 57
3.4. Analiza visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) ... 57
3.4.1. Enantioselektivna analiza visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom ... 59
4. REZULTATI ... 61
4.1. Rezultati GC-MS/FID analiza vršnih para ... 62
4.2. Rezultati GC-MS/FID analiza USE ekstrakata ... 69
4.3. Rezultati GC-MS/FID analiza SPE ekstrakta ... 80
4.4. Rezultati HPLC-DAD analiza ... 81

4.5. Rezultati enantioselektivne analize ... 83
5. RASPRAVA ... 85
5.1. Isparljivi spojevi vršnih para izolirani HS-SPME metodom ... 86
5.1.1. Vršne pare meda *Taraxacum officinale* Weber ... 86
5.1.2. Vršne pare meda *Coriandrum sativum* L. ... 88
5.1.3. Vršne pare meda *Trifolium pratense* L. ... 90
5.1.4. Vršne pare meda *Satureja subspicata* Vis. ... 91
5.1.5. Vršne pare meda *Satureja montana* L. ... 92
5.1.6. Vršne pare meda *Satureja hortensis* L. ... 92
5.1.7. Vršne pare meda *Coffea* spp. ... 93
5.2. Isparljivi spojevi izolirani USE metodom ... 94
5.2.1. USE ekstrakti meda *Taraxacum officinale* Weber ... 94
5.2.2. USE ekstrakti meda *Coriandrum sativum* L. ... 96
5.2.3. USE ekstrakti meda *Trifolium pratense* L. ... 98
5.2.4. USE ekstrakti meda *Satureja subspicata* Vis. ... 98
5.2.5. USE ekstrakti meda *Satureja montana* L. ... 99
5.2.6. USE ekstrakti meda *Satureja hortensis* L. ... 101
5.2.7. USE ekstrakti meda *Coffea* spp. ... 101
5.3. Isparljivi spojevi izolirani SPE metodom ... 102
5.3.1. SPE ekstrakti meda *Taraxacum officinale* Weber ... 102
5.4. Usporedba primijenjenih metoda ekstrakcije isparljivih spojeva ... 103
5.5. Ciljani organski spojevi određeni izravnom HPLC analizom uzoraka ... 105
5.5.1. HPLC analiza uzorka meda *Satureja subspicata* L. ... 105
5.5.2. HPLC analiza uzorka meda *Satureja montana* L. ... 107
5.5.3. HPLC analiza uzorka meda *Satureja hortensis* L. ... 107
5.5.4. HPLC analiza uzorka meda *Coffea* spp. ... 108
5.6. Enantioselektivna HPLC analiza ... 110
6. ZAKLJUČCI ... 112
7. LITERATURA ... 116
ŽIVOTOPIS ... 131

1. UVOD

Zbog razlike u botaničkom podrijetlu, različite vrste meda se odlikuju karakterističnim organoleptičkim svojstvima i kemijskim sastavom [1]. Organski spojevi u medu, podrijetlom iz biljaka, mogu poslužiti za razlikovanje botaničkog izvora različitih vrsta meda [2]. Stoga, bioorganska istraživanja meda koja su uglavnom usmjerena prema fitokemikalijama i njihovim transformacijama mogu značajno doprinijeti ispitivanju autentičnosti meda [3]. Za određivanje botaničkog podrijetla meda tradicionalno se koristi melisopalinološka analiza. Međutim, navedena metoda ponekad nije pouzdana, osobito u slučajevima analize medljikovaca ili vrsta meda koje sadrže malu količinu peludi ili veoma slična peludna zrnca [4,5]. Kako bi se postigao što ispravniji zaključak o botaničkom podrijetlu meda, obično se uz melisopalinološku analizu provodi senzorska analiza, kao i rutinsko određivanje fizikalno-kemijskih parametara utvrđenih propisima EU i Codex Alimentarius standardima, kao i nacionalnim Pravilnicima. U novije se vrijeme ove klasične metode pokušavaju upotpuniti različitim metodama kemijskog profiliranja. Kemijsko profiliranje te potraga za specifičnim (karakteristični samo za jednu vrstu meda) i nespecifičnim (prisutni u više vrsta meda) kemijskim markerima, mogu značajno doprinijeti karakterizaciji meda, a time olakšati i prepoznavanje patvorenja. Detekcija i identifikacija artefakata (uglavnom produkata Maillardovih reakcija i Streckerovih degradacija) nastalih uslijed skladištenja, termičke obrade meda i predobrade uzorka je od velikog značaja. Identifikacija artefakata je važna kako ne bi dobili pogrešnu predodžbu o izvornom sastavu uzorka ili ih pogrešno označili kao kemijske biomarkere. Nadalje, među identificiranim spojevima meda mogu se pronaći tvari (npr. fitokemikalije) s korisnom biološkom aktivnosti (s antioksidacijskim i/ili antimikrobnim djelovanjem i sl.). Stoga, med može predstavljati prirodni izvor bioaktivnih spojeva, čime se pojedinim vrstama meda dodatno povećava vrijednost.

Ovo istraživanje je provedeno u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-11-2013-8547 naziva "Research of Natural Products and Flavours: Chemical Fingerprinting and Unlocking the Potential". Temeljni cilj istraživanja je određivanje novih kemijskih profila i ciljanih organskih spojeva prisutnih u medu te identifikacija specifičnih i/ili nespecifičnih kemijskih markera. Bioorganska istraživanja su provedena na odabranim nedovoljno istraženim (ili potpuno neistraženim) uniflornim vrstama meda *Taraxacum officinale* Weber, *Coriandrum sativum* L., *Satureja montana* L., *Satureja hortensis* L., *Satureja subspicata* Vis., *Coffea* spp. i *Galactites tomentosa* Moench. Uzorci su obrađeni komplementarnim preparativnim metodama u cilju dobivanja detaljnih kemijskih profila isparljivih i poluisparljivih spojeva primjenom plinske kromatografije i visokodjelotvorne tekućinske kromatografije.

2. OPĆI DIO

2.1. Med

Definicija meda, vrste meda, zahtjevi kakvoće te metode analize meda utvrđeni su propisima Codex Alimentarius, EU te nacionalnim pravilnicima. Med je 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. Osnovne vrste meda, s obzirom na botaničko podrijetlo, su cvjetni ili nektarni med i medljikovac ili medun. Cvjetni ili nektarni med pčele proizvode od nektara medonosnih biljaka, dok medljikovac ili medun proizvode uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka [6–8].



Slika 1. Pčela na cvijetu trešnje

Med nikada ne potječe iz jednog biljnog izvora. Pojam unifloran (monofloran) se koristi za med koji je dobiven većinom iz jedne biljne vrste [9], dok poliflorni (multiflorni) med potječe iz nekoliko botaničkih izvora, od kojih ni jedan nije prevladavajući [10]. U odredbama Direktive Vijeća EU o medu istaknuto je da se naziv proizvoda može dopuniti podacima koji se odnose na cvjetno ili biljno podrijetlo ukoliko proizvod potječe potpuno ili većinom od navedenog izvora i posjeduje organoleptička, fizikalno-kemijska i mikroskopska svojstva tog izvora [8]. Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda med se smatra uniflornim ako u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste [11]. Zastupljenost peludi ovisi o uniflornom izvoru od kojeg med potječe; primjerice za utvrđivanje uniflornosti meda agruma (*Citrus* spp.), maslačka (*Taraxacum officinale* s.l.),

planike (*Arbutus unedo* L.) i lipe (*Tilia* spp.) taj postotak je 10% i manji, dok za med kestena (*Castanea sativa* Mill.) i eukaliptusa *(Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) iznosi iznad 90% [12–14].

2.1.1. Osnovne značajke meda

Općenito, med je sastavljen prvenstveno od ugljikohidrata (uglavnom fruktoze i glukoze) koji čine preko 95% suhe tvari i odgovorni su za osnovna fizikalna svojstva meda. Međutim, kemijski sastav meda je mnogo složeniji i iznimno varijabilan i ovisi o mnogim čimbenicima, prvenstveno o njegovom botaničkom i zemljopisnom podrijetlu. U medu se nalazi više od 20 različitih složenih ugljikohidrata, koji su nastali različitim vezivanjem fruktoze i glukoze [15]. Prisutni su i mnogi drugi spojevi kao što su organske kiseline, enzimi, vitamini, minerali, pigmenti te široki spektar aromatičnih spojeva [16]. Neobrađeni med sadrži pelud, nešto voskova, kvasce i često kristale glukoze monohidrata. Prilikom pripreme za komercijalnu upotrebu med se zagrijava i filtrira kako bi se odgodila njegova kristalizacija, smanjila viskoznost i izbjegla fermentacija (uništavanjem kvasaca). Termička obrada meda zahtijeva strogu kontrolu temperature i trajanja zagrijavanja [15,17], budući da nekontroliranim zagrijavanjem kao i produljenim skladištenjem meda dolazi do određenih promjena u kemijskom sastavu i senzorskim svojstvima [18].

Med, sa svjetskom godišnjom proizvodnjom od približno 1,4 milijuna tona, koristi se uglavnom kao zaslađivač i namaz. Njegova važna neizravna upotreba je u proizvodnji žitnih pahuljica, bombona, alkoholnih pića, farmaceutskih pripravaka te u pekarstvu [15,16]. Osim kao izvor energije, med je popularan zbog svojih ljekovitih svojstava. Terapeutski, kao i ostali blagotvorni učinci meda na zdravlje proizlaze iz antioksidacijskog, antibakterijskog, protuupalnog i antimutagenog djelovanja različitih sastojaka, osobito fenolnih spojeva, kao što su flavonoidi i fenolne kiseline [19].

2.1.2. Fizikalna svojstva

Med je viskozan i higroskopan proizvod. Glukoza iz meda, pri sobnoj temperaturi, spontano kristalizira u obliku glukoza monohidrata. Budući da je topljivost glukoze u vodi manja nego fruktoze, omjer fruktoze i glukoze (F/G) ukazuje na sklonost meda kristalizaciji.

Također, omjer glukoze i vode (G/M) je koristan parametar za predviđanje kristalizacije meda. Kada je G/M omjer ispod vrijednosti od 1,7, med sporo kristalizira [20]. Kristalizacija meda je nepoželjna jer utječe na teksturu meda i čini ga manje privlačnim za potrošača [21]. Viskoznost meda ovisi o botaničkom podrijetlu meda, sadržaju vode i temperaturi. Viskoznost je važan parametar u tehnologiji meda koji utječe na procese ekstrakcije, filtracije, miješanja, punjenja i dr. [22] Tijekom tehnoloških operacija i skladištenja meda treba uzeti u obzir njegovu higroskopnost budući da povećan sadržaj vode povećava sklonost fermentaciji. Kada je udio vode u medu manji od 17% fermentacija je neznatna. Sadržaj vode i aktivitet vode su glavni čimbenici koji utječu na trajnost proizvoda tijekom skladištenja [21,23]. Gustoća meda (pri 20˚C) ovisi o sadržaju vode i kreće se u rasponu od 1,4404 (14% vode) do 1,3550 (21% vode) [17]. Prema Codex Alimentarius (CA) standardima, EU Direktivi i Pravilniku o medu, sadržaj vode u medu ne smije prelaziti 20% (w/w).

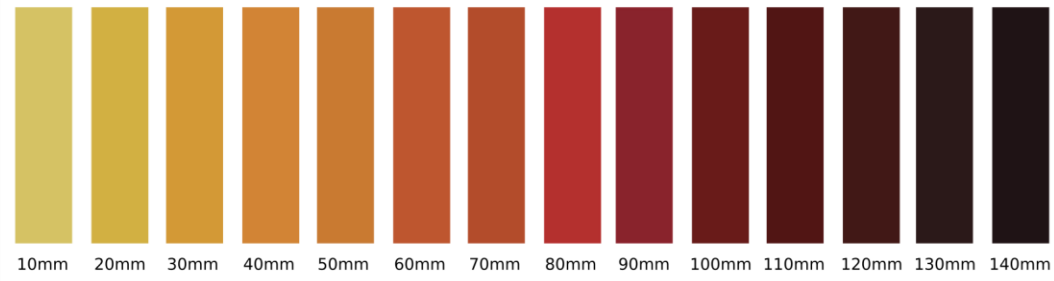
Tablica 1. Fizikalna svojstva meda (preuzeto i prilagođeno iz Arvanitoyannis i sur., 2005.) [24]

Fizikalne karakteristike	Vrijednost (raspon)
Specifična toplina	0,54-0,60 cal/g/˚C (za tekući med)
	0,73 cal/g/˚C (za kristalizirani med)
Točka ledišta	-1,42 do-1,53 ˚C (15%-tna otopina meda)
	-5,8 ˚C (68%-tna otopina meda)
Specifična težina (20 ˚C)	1,4350 (15% H_2O)
	1,4171 (18% H_2O)
Indeks refrakcije (20 ˚C)	1,4966 (16% H_2O)
	1,4927 (17,5% H_2O)
	1,4900 (18,6% H_2O)
Aktivitet vode (4-37 ˚C)	0,5 (16% H_2O)
	0,6 (18,3% H_2O)
pH	3,9
Boja	bezbojan med (proziran) (<8 mm prema Pfund ljestvici) do gotovo crn (>114 prema Pfund ljestvici)

Električna vodljivost je izuzetno važan parametar kakvoće koji se koristi za klasifikaciju monoflornih vrsta meda i ovisi o sadržaju minerala, organskih kiselina, proteina i nekih

ugljikohidrata [25]. U Codex Alimentariusu, Direktivi Vijeća EU te Pravilniku o medu navedene su vrijednosti ovog parametra za cvjetni med ($\leq$ 0,8 mS cm^{-1}) i medljikovac ($\geq$ 0,8 mS cm^{-1}) koje služe za njihovo razlikovanje. Međutim, navedene su i iznimke od ovog pravila i odnose se na vrste meda *Arbutus unedo* L., *Erica cinerea* L., *Eucalyptus* spp., *Tilia* spp., *Calluna vulgaris* (L.) Hull., *Leptospermum* spp. te *Melaleuca* spp. [6].

Boja je fizikalno svojstvo koje predstavlja koristan kriterij za klasifikaciju monoflornih vrsta meda. Boja meda varira od izrazito svijetle, preko boje poput jantara do gotovo crne sa karakterističnim svijetložutim, zelenim ili crvenim nijansama [26]. Najčešće metode koje se upotrebljavaju za određivanje boje meda se zasnivaju na jednostavnoj optičkoj usporedbi, upotrebom Pfund i Lovibond instrumenata. Med se prema boji uobičajeno klasificira koristeći Pfund ljestvicu (slika 2) [13,26]. Boja meda prvenstveno ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu [20]. Također ovisi i o sadržaju fenola, hidroksimetilfurfurala, peludi i minerala [21]. Tamne vrste meda imaju veći mineralni sadržaj i veću električnu vodljivost od svjetlijih vrsta meda [27]. Boja meda je prepoznata kao dobar pokazatelj njegove antioksidacijske aktivnosti [28]. Mnoga istraživanja pokazuju da tamnije vrste meda imaju veći sadržaj ukupnih fenola i bolju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi sa svijetlim vrstama meda [29–31]. Boja je jedan od parametara koji određuje cijenu meda na tržištu. Općenito, svijetle vrste meda su skuplje, dok su u nekim zemljama cjenjenije tamne vrste meda [26,32].



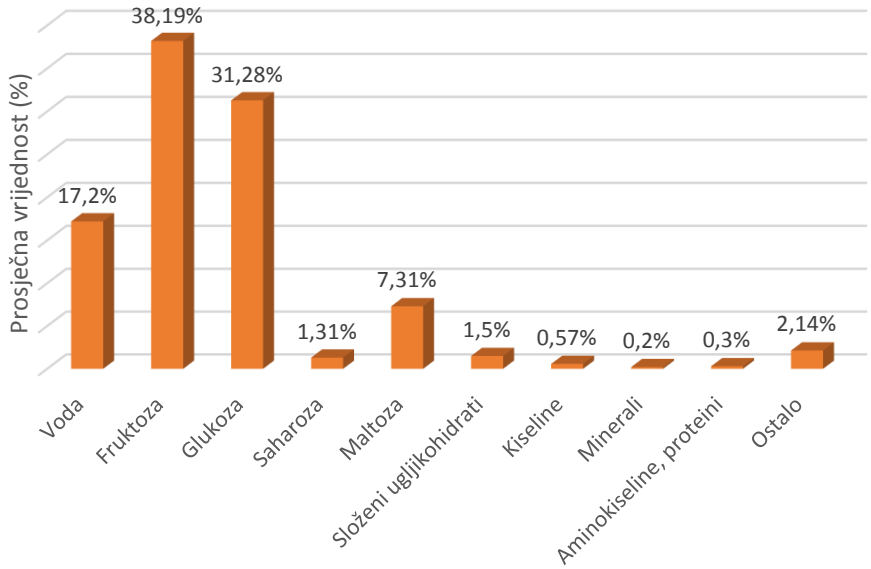
Slika 2. Različite boje meda prema Pfund ljestvici (mm)

Med ima svojstvo zakretanja ravnine polariziranog svijetla. Ukupna optička rotacija ovisi o vrsti i koncentraciji ugljikohidrata prisutnih u medu. Određivanje specifične optičke rotacije se prvenstveno koristi za razlikovanje cvjetnog meda (zakretanje u lijevo, negativne vrijednosti) od medljikovca (zakretanje u desno, pozitivne vrijednosti) [26]. U cvjetnom medu prevladava fruktoza, koja ima negativnu vrijednost specifične rotacije ($[\alpha_D^{20}] = -92{,}4^\circ$), a glukoza pozitivnu

vrijednost ($[\alpha_D^{20}] = +52{,}7^\circ$). Sadržaj fruktoze u medljikovcima je obično manji, a sadrže melicitozu ($[\alpha_D^{20}] = +88{,}2^\circ$) ili erlozu ($[\alpha_D^{20}] = +121{,}8^\circ$) koje zajedno sa glukozom, obično daju pozitivnu ukupnu optičku rotaciju [20].

2.1.3. Kemijski sastav

Raznolikost u sastavu uzoraka meda odraz je različitog botaničkog i geografskog podrijetla, klimatskih uvjeta i pčelarske prakse [15]. Priroda, količina i kombinacija različitih komponenti daju svakom medu karakteristična organoleptička i nutraceutska svojstva [33]. Dio komponenti meda nastaje tijekom dozrijevanja meda, neke potječu od pčela, a određeni spojevi iz biljaka [34]. Med sadrži oko 200 sastojaka, a najzastupljeniji su fruktoza (38%), glukoza (32%) i voda (18%). Ugljikohidrati prisutni u medu uključuju monosaharide (oko 70%), disaharide (10-15%) te manju količinu drugih ugljikohidrata [35,36]. Osim saharoze (oko 1%), u medu je identificirano preko 25 drugih oligosaharida kao što su disaharidi (maltoza, kojibioza, turanoza, palatinoza), trisaharidi (erloza, izopanoza, panoza), tetrasaharidi (izomaltotetraoza, maltotetraoza, nistoza) i dr. [15,37,38]. Složeni ugljikohidrati u medu nastaju uglavnom djelovanjem enzima tijekom zrenja meda [19]. Prosječni kemijski sastav meda prikazan je na slici 3.



Slika 3. Prosječan kemijski sastav meda (izražen u g/100 g) (preuzeto i prilagođeno iz Alvarez-Suarez i sur., 2010.) [37]

Glavni proteini u medu su globulin i albumin koji potječu iz faringealnih žlijezda pčela [39]. Prolin je najzastupljenija aminokiselina u medu (50-85%), koja u med dospijeva uglavnom od pčela i služi kao kriterij procjene zrelosti meda [26]. Osim esencijalnih aminokiselina, u medu su identificirane i druge aminokiseline kao što su γ-aminomaslačna kiselina, ornitin, α-aminoadipinska kiselina, homoserin i dr. [40,41]. Glavni enzimi u medu su α-glukozidaza (invertaza), glukoza oksidaza te smjesa α- i β-amilaza (dijastaza) koje pčele dodaju u med tijekom njegovog nastajanja. Ostali enzimi prisutni u medu su katalaza i kisela fosfataza za koje se smatra da potječu iz nektara i peludi [1]. Invertaza katalizira hidrolizu saharoze na glukozu i fruktozu, kao i reakcije transglukozilacije kojima nastaju složeni ugljikohidrati poput kojibioze, nigeroze, maltoze, izomaltoze, turanoze, α- i β-trehaloze i erloze [15]. Aktivnost dijastaze i invertaze se smanjuje uslijed zagrijavana i dugotrajnog skladištenja. Stoga, određivanje aktivnosti navedenih enzima, kao i sadržaja 5-hidroksimetilfurfurala, služi za procjenu svježine meda [15,20]. Glukoza oksidaza ima važnu ulogu u antibakterijskoj aktivnosti meda, budući da vodikov peroksid, nastao enzimskom oksidacijom glukoze, predstavlja antibakterijsko sredstvo i djelomično je odgovoran za antibakterijska svojstva meda. Navedenom enzimskom reakcijom nastaje i glukonska kiselina, glavna kiselina u medu [17,19]. Postotak organskih kiselina u medu je manji od 0,5% (w/w) [1]. Kiseline utječu na određena organonoleptička (boja, aroma) i fizikalno-kemijska (pH, kiselost, električna vodljivost) svojstva meda te doprinose otpornosti meda prema djelovanju mikroorganizama [19,42]. Osim glukonske kiseline, u medu su identificirane i druge alifatske organske kiseline kao što su mravlja, octena, maslačna, mliječna, oksalna, jantarna, vinska, maleinska, pirogrožđana, piroglutaminska, α-ketoglutarna, glikolna, limunska, jabučna, 2- ili 3-fosfoglicerinska kiselina, malonska i dr. [9,19,42]. Fenolne kiseline (derivati benzojeve, feniloctene i hidroksicimetne kiseline) zajedno sa flavonoidima (flavanoli, flavoni, flavonoli i flavanoni) čine važne klase fenolnih spojeva prisutnih u medu [19,43]. Sadržaj fenolnih spojeva u medu iznosi 0,1-0,5% i odgovorni su za mnoga bioaktivna svojstva meda. [1,43]

Sadržaj minerala u medu je varijabilan i kreće se u rasponu od 0,02 do 1,03 g/100 g. Kalij je najzastupljeniji element u medu i zauzima oko jedne trećine ukupnog mineralnog sadržaja. Osim makroelemenata (Na, K, Ca, Mg, P, S, Cl), u medu su prisutni i drugi, manje zastupljeni elementi poput Al, Cu, Pb, Zn, Mn, Cd, Tl, Co, Ni, Fe, Cr i dr. Teški metali (Pb, Cd, Hg, Cu, Mn, Zn, Ag) u medu imaju važnu ulogu kao bio-indikatori zagađenja okoliša. [44,45]

U medu su, u veoma niskim koncentracijama, prisutni i isparljivi spojevi. Oni predstavljaju više ili manje složene smjese spojeva relativno malih molekulskih masa, različitih fizikalno-kemijskih svojstava i stupnjeva stabilnosti te značajno doprinose aromi meda [46,47]. Istraživanje isparljivih spojeva meda započelo je početkom 1960-tih godina, a do sada je u ekstraktima i vršnim parama različitih vrsta meda identificirano više od 1000 različitih organskih spojeva. Identificirani isparljivi spojevi nastaju različitim biosintetskim putovima i uključuju različite funkcijske skupine [48]. Isparljivi spojevi u medu mogu potjecati od: 1) izravnog prijenosa iz biljke ili nektara (fitokemikalije); 2) pretvorbe fitokemikalija od strane pčela; 3) pčela; 4) pretvorbe spojeva tijekom zrenja meda; 5) zagrijavanja i skladištenja meda; 6) primijenjene metode izolacije (artefakti) te 6) mikrobiološke i/ili druge kontaminacije [49]. Med također sadrži i mali postotak hidroksimetilfurfurala (HMF), furfurala, melanoidina, akrilamida, glioksala i metilglioksala koji su veoma dobro poznati produkti Maillardove reakcije [1,28].

2.2. Utjecaj toplinske obrade na kemijski sastav meda

Visoke koncentracije ugljikohidrata i mnoštvo slobodnih aminokiselina u medu stvaraju uvjete za odvijanje Maillardove reakcije. Određeni produkti Maillardove reakcije, poput 5-hidroksimetilfurfurala (HMF) su pokazatelji kvalitete meda i njegove svježine budući da njihova koncentracija raste tijekom zagrijavanja i skladištenja meda [28]. U Codex Alimentariusu i EU standardima utvrđena je maksimalna dozvoljena količina HMF-a od 40 mg kg^{-1}, te 80 mg kg^{-1} za vrste meda iz regija tropske klime [50]. Maillardova reakcija je veoma složena reakcija koja u prvom stupnju uključuje kondenzaciju karbonilne skupine reducirajućeg ugljikohidrata s amino skupinom aminokiseline, peptida ili proteina dajući Schiffovu bazu, a zatim glikolzilamin. Daljnji koraci uključuju pregradnje (Amadori/Heyns pregradnja), dehidratacije i deaminacije dajući različite produkte kao što su hidroksiketoni, dikarbonilni spojevi te derivati furfurala i furanona. Iz relativno jednostavnih početnih spojeva može brzo nastati široki raspon reaktivnih spojeva. Streckerovom degradacijom aminokiselina dolazi do dekarboksilacije i deaminacije aminokiselina u prisustvu dikarbonilnog spoja (koji može potjecati iz Maillardove reakcije) te formiranja Streckerova aldehida i α-aminoketona [51]. Hidroksifurfurali i dikarbonili, metilglioksal i glioksal su dobro poznati produkti Maillardove reakcije prisutni u medu. Tijekom Streckerove degradacije prolina i metilglioksala, nastaje 2-acetil-1-pirolin (2-AP). Navedeni aromatični spoj, zajedno sa metilglioksalom može biti

koristan parametar za kontrolu kvalitete manuka meda [52]. Konačni stupanj Maillardove reakcije je karakteriziran nastankom smeđih pigmenata sa dušikom – melanoidina [28]. Produkti Maillardovih reakcija utječu na aromatični profil [18,53], kao i na boju meda [54]. Također, Maillardova reakcija predstavlja izvor novih spojeva, koji mogu imati korisne ali i nepoželjne učinke [28].

2.3. Biološka aktivnost

Osim kao hrana, med se u mnogim kulturama tradicionalno upotrebljava u terapeutske svrhe, npr. u liječenju opeklina i rana. Med stvara zaštitnu barijeru i zahvaljujući svojoj velikoj osmolarnosti stvara vlažnu sredinu u obliku otopine koja se ne lijepi za oštećeno tkivo. Istraživanja pokazuju da med ublažava upalne procese na koži, smanjuje otekline i stvaranje eksudata te pospješuje zacjeljivanje rana, ublažava ožiljke i stimulira obnovu tkiva [37]. Imunološka aktivnost meda je također važna u zacijeljivanju rana, stvarajući istovremeno pro- i antiinflamatorne učinke [10]. Med sadrži mnoštvo spojeva, naročito fenolnih derivata, koji mogu, samostalno ili u kombinaciji, imati važnu ulogu u antitumorskim i antiinflamatornim učincima [37]. Smatra se da med može poslužiti kao sredstvo prijenosa mnogih ljekovitih tvari biljke iz koje potječe [10,37]. Prema podrijetlu, med se može svrstati u različite skupine od kojih su uniflorne vrste meda obećavajuće i zanimljive [10]. Na primjer, uniflorni manuka (*Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst) med poznat je po antibakterijskim i antioksidacijskim svojstvima [10].

Čimbenici odgovorni za antimikrobnu aktivnost meda su velika viskoznost, kiselost i osobito vodikov peroksid koji nastaje djelovanjem enzima glukoza oksidaze tijekom zrenja meda. Kada se vodikov peroksid ukloni djelovanjem katalaze, određene vrste meda i dalje pokazuju značajnu antibakterijsku aktivnost, a ta se aktivnost naziva neperoksidna antibakterijska aktivnost. Osim spomenutih, neperoksidne komponente meda uključuju i lizozim, fenolne kiseline i flavonoide [37]. Ostali antimikrobni spojevi u medu su pčelinji defenzin-1 (peptid) i složeni ugljikohidrati [10]. Med pokazuje baktericidnu aktivnost prema mnogim enteropatogenim organizmima, uključujući *Salmonella* i *Shigella* vrste te *E. colli* [37]. Postoje razlike u antibakterijskoj aktivnosti različitih uniflornih vrsta meda. Botaničko podrijetlo je najvažniji čimbenik koji utječe na antimikrobnu aktivnost meda [43]. Manuka med, dobiven iz nektara *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst., zavrijedio je znanstveni i ekonomski interes zbog neperoksidne antimikrobne aktivnosti [55], koja potječe uglavnom od

visokog sadržaja metilglikosala (MGO) [10]. Kwakman i suradnici (2010) su pokazali da, osim MGO i druge komponente manuka meda znatno doprinose neperoksidnom antibakterijskom učinku. Tako, i nakon neutralizacije MGO, manuka med zadržava baktericidnu aktivnost [56].

Antioksidacijska svojstva meda su povezana sa potencijalom i sposobnošću meda u smanjivanju reakcija oksidacije, što rezultira pozitivnim učincima meda na ljudsko zdravlje [19]. Antioksidacijski kapacitet (AOC) je predložen kao indikator prisutnosti korisnih bioaktivnih spojeva i značajno se razlikuje ovisno o botaničkom podrijetlu meda, vjerojatno zbog razlike u enzimskoj aktivnosti i sadržaju sekundarnih biljnih metabolita poput polifenola. Flavonoidi, fenolne kiseline, glukoza oksidaza, katalaza, askorbinska kiselina, organske kiseline, produkti Maillardove reakcije, aminokiseline i proteini značajno doprinose antioksidacijskom kapacitetu meda [19]. U mnogim istraživanjima je istaknuta pozitivna uzajamna veza između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja polifenola [28]. Polifenoli, kao antioksidansi, djeluju kao hvatači slobodnih radikala, donori vodika i kelatori metala [28], te kao genski modulatori tako što utječu na enzimski i neenzimski sustav koji regulira staničnu redoks ravnotežu [19]. Nekoliko istraživačkih skupina je ispitivalo antioksidacijski kapacitet meda koristeći različite metode za određivanje kapaciteta hvatanja reaktivnih kisikovih spojeva (npr. superoksid aniona, peroksil- i hidroksil-radikala) te enzimskog i neenzimskog kapaciteta inhibicije lipidne peroksidacije [19]. Istraživanja pokazuju da med sprječava mikrobni rast u hrani, okidacijske reakcije (npr. lipidna oksidacija u mesu), enzimsko posmeđivanje voća i povrća te osigurava učinkovitu zaštitu prema kemijski induciranoj lipidnoj peroksidaciji u homogenatima jetre, mozga i bubrega miševa [19]. Budući da med posjeduje sposobnost hvatanja slobodnih radikala i štiti od lipidne peroksidacije, može doprinijeti prevenciji i/ili ublažavanju upalnih bolesti za koje se smatra da su uzrokovane oksidativnim stresom [19].

Tablica 2. Sažeti prikaz biološke aktivnosti meda, primjeri aktivnih spojeva i predloženi mehanizmi djelovanja

Biološka aktivnost	Primjeri aktivnih grupa i/ili spojeva u medu	Predloženi mehanizam djelovanja	Literatura
antioksidacijska	▪ fenolne kiseline ▪ flavonoidi	▪ sprječavanje nastajanja slobodnih radikala ▪ hvatanje peroksil- i ostalih slobodnih radikala	[57]

antimikrobna (antibakterijska, antiviralna, antifungalna, antiparazitna)	▪ vodikov-peroksid i neperoksidne komponente (fitokemikalije)	▪ nastajanje vodikovog peroksida ▪ djelovanje neperoksidnih komponenti (fitokemikalija) ▪ kiselost ▪ velika viskoznost stvara fizičku barijeru koja ograničava izloženost okolišnim patogenima ▪ inhibicija i/ili mikrobicidno djelovanje	[57,58]
protuupalna	▪ fenolni spojevi i flavonoidi	▪ smanjuje upalu, ublažuje i umanjuje ožiljke kod rana ▪ visoka osmolarnost meda dovodi do istjecanja tekućine što stvara vlažne uvjete potrebne za zacijeljivanje i onemogućuje adheziju za površinu rane ▪ smanjenje leukocita vezanih za upalu ▪ inhibicija nastanka reaktivnih kisikovih intermedijera (ROI) kao rezultat antioksidacijske aktivnosti ▪ suzbijanje upalnih procesa hvatanjem slobodnih radikala pomoću antioksidansa	[57–59]
imunološka	▪ galna kiselina ▪ flavonoidi	▪ pro- i anti-inflamatorni učinci ▪ nastanak citokina ▪ osigurava substrat za glikolizu	[57,60]
antitumorna	▪ vodikov peroksid ▪ krizin ▪ feniletil-ester kavene kiseline (CAPE)	▪ stvaranje citotoksičnog H_2O_2 (i HO radikala nakon Fentonove reakcije) ▪ izravna inhibicija enzima ciklooksigenaze-2 (COX-2) ▪ hvatanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS)	[37]

2.4. Određivanje botaničkog podrijetla meda

Određivanje botaničkog podrijetla meda ima važnu ulogu u kontroli kvalitete [61]. Med koji potječe iz određenog botaničkog izvora posjeduje karakteristična organoleptička svojstva. Također, neke uniflorne vrste meda su veoma rijetke, a mogu imati i određena bioaktivna

svojstva [62,63]. Melisopalinološka analiza je tradicionalna metoda određivanja botaničkog podrijetla meda a zasniva se na kvalitativnom i kvantitativnom mikroskopskom pregledu peludi prisutne u netopljivom sedimentu meda [9,12]. Metodologija melisopalinološke analize je detaljno razrađena i predložena od strane International Commision for Bee Botany (ICBB) [64], a 1978. g. je izmijenjena i dopunjena [65] te se koristi u većini Europskih laboratorija kao dio rutinske analize meda [12,65]. Određivanje botaničkog podrijetla meda melisopalinološkom analizom se zasniva na relativnoj zastupljenosti različitih vrsta peludi medonosnih biljaka. Vrijeme potrebno za analizu i identifikaciju prisutne peludi ovisi o složenosti peludnog spektra te iskustvu analitičara (obično 30 min-1h) [12]. Općenito, smatra se da med potječe iz određenog botaničkog izvora (uniflorni med) ukoliko relativna zastupljenost peludi te vrste prelazi 45%. Međutim, potreban je poseban oprez prilikom interpretacije rezultata, budući da postoji velika raznolikost u zastupljenosti peludi u nektaru različitih biljnih vrsta. Stoga se, posebno u slučajevima nadzasupljenosti i podzastupljenosti peludi određenih biljnih vrsta u medu, uz melisopalinološku analizu, preporuča provesti i procjenu senzorskih svojstva te određena fizikalno-kemijska mjerenja kako bi se donijela ispravna odluka o botaničkom podrijetlu meda [12]. Mnogi autori navode nedostatke koji ograničavaju primjenu analize peludi za utvrđivanje botaničkog podrijetla meda. Tako, mogućnost kontaminacije meda peludom drugih biljnih vrsta izravno utječe na pouzdanost dobivenih rezultata. Također, određene vrste meda ne mogu biti identificirane analizom peludi, na primjer filtrirani med, medljikovac, te med dobiven iz kaučukovca, ricinusa, pamuka i dr. [66]. Primjenom melisopalinološke analize, zbog sličnosti u izgledu peludi, ne mogu se sa sigurnošću razlikovati vrste meda manuka (*Leptospermum scoparium*) i kanuka (*Kunzea ericoides*) [67].

Zbog ograničenja melisopalinološke analize, kao i složene prirode meda utvrđivanje autentičnosti često predstavlja izazov. Provedena su mnoga istraživanja u svrhu potrage za bržim i pouzdanijim metodama karakterizacije koje bi zamijenile ili nadopunile klasične metode ispitivanja botaničkog podrijetla meda. U posljednje se vrijeme sve više razvijaju metode kemijskog profiliranja s ciljem identifikacije individualnih spojeva koji samostalno ili u kombinaciji sa drugim spojevima mogu poslužiti za procjenu autentičnosti monoflornih vrsta meda. Prednost kemijske analize je u tome što omogućuje praćenje i identifikaciju komponenti (fitokemikalija) koje su izravno vezane za nektar iz kojeg je med dobiven [66]. Mnogi autori su identificirali iste spojeve, njihove prekursore i metabolite u medu, mednom mjehuru, nektaru, kao i u cvjetovima iz kojih je med dobiven [48,68–70].

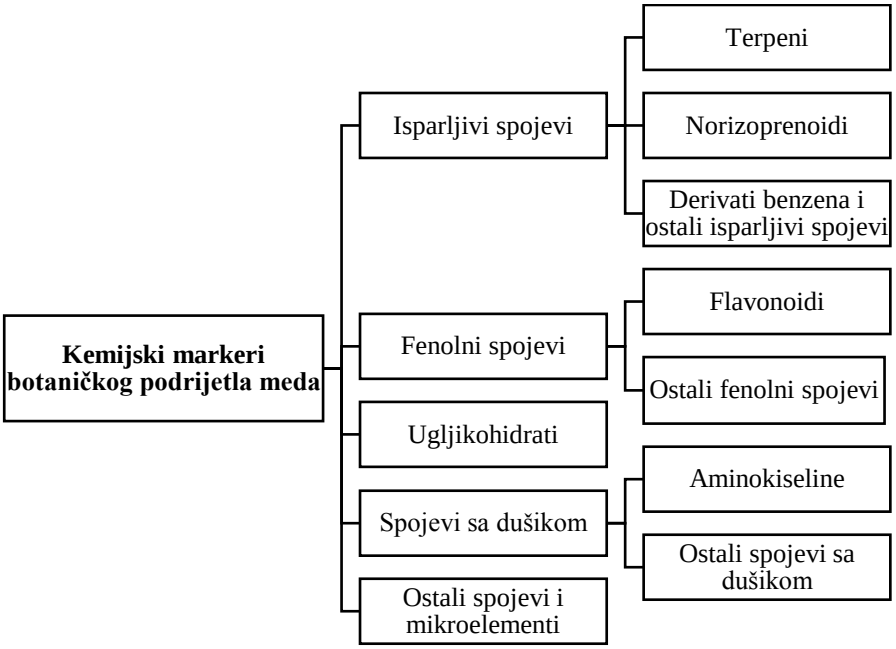
2.5. Kemijsko profiliranje i identifikacija biomarkera

U medu je, u manjoj količini prisutno mnoštvo kemijskih spojeva koji u osnovi predstavljaju „kemijski otisak“ (*chemical fingerprint*) različitih vrsta meda [43,71]. Bioorganska istraživanja meda su uglavnom usmjerena prema kvalitativnom i kvantitativnom određivanju raznih klasa organskih spojeva poput flavonoida, oligosaharida, organskih kiselina, aminokiselina, isparljivih i poluisparljivih spojeva upotrebom instrumentnih metoda analize poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz detektor sa nizom dioda (DAD), spetrometar masa (MS), detektor cirkularnog dikroizma (CD) i dr. ili plinske kromatografije (GC) uz spektrometar masa, plamenoionizaciji detektor (FID) i dr. [9,48]. Kada se razmatra više grupa organskih spojeva može se postići bolja klasifikacija različitih vrsta meda, posebno u kombinaciji sa statističkom obradom podataka [72]. Kemijsko profiliranje može značajno doprinijeti određivanju botaničkog podrijetla meda, posebice kada se mogu pronaći spojevi karakteristični za uniflorni med, odnosno specifični i nespecifični kemijski markeri [48,73]. Također, identifikacija većeg broja biomarkera za određenu vrstu meda otežava mogućnost patvorenja [74]. Da bi se definirao kao kemijski marker botaničkog podrijetla meda, spoj treba biti prisutan samo u uzorcima meda koji potječu iz određenog botaničkog izvora, ili, barem, treba biti prisutan u visokoj i prilično konstantnoj koncentraciji [63]. Specifični kemijski markeri su spojevi karakteristični samo za jednu vrstu meda, dok su nespecifični kemijski markeri pronađeni u više vrsta meda.

2.5.1. Podjela kemijskih markera

Primjenom različitih metoda analiziran je velik broj uzoraka meda s ciljem dobivanja detaljnih kemijskih profila i identifikacije pouzdanih kemijskih markera karakterističnih za pojedinu vrstu meda. Kemijski markeri botaničkog podrijetla meda mogu se svrstati u nekoliko skupina: isparljivi spojevi (terpeni, norizoprenoidi, derivati benzena i ostali isparljivi spojevi), fenolni spojevi (flavonoidi i ostali fenolni spojevi), ugljikohidrati, spojevi sa dušikom (aminokiseline i ostali spojevi sa dušikom) te ostali organski spojevi i mikroelementi (slika 4) [48,49]. Do sada je u medu identificirano samo nekoliko specifičnih kemijskih markera kao što su 3,4-dihidro-3-oksoedulan u vršnim parama meda *Centaurea cyanus* L. [3], kamahini A-C u medu *Weinmannia racemosa* Linn. f. [3], homogentizinska kiselina u medu *Arbutus unedo* L. [75,76], te γ-laktamski derivat 3-(2′-pirolidinil)-kinurenske kiseline (γ-LACT-3PKA) u medu

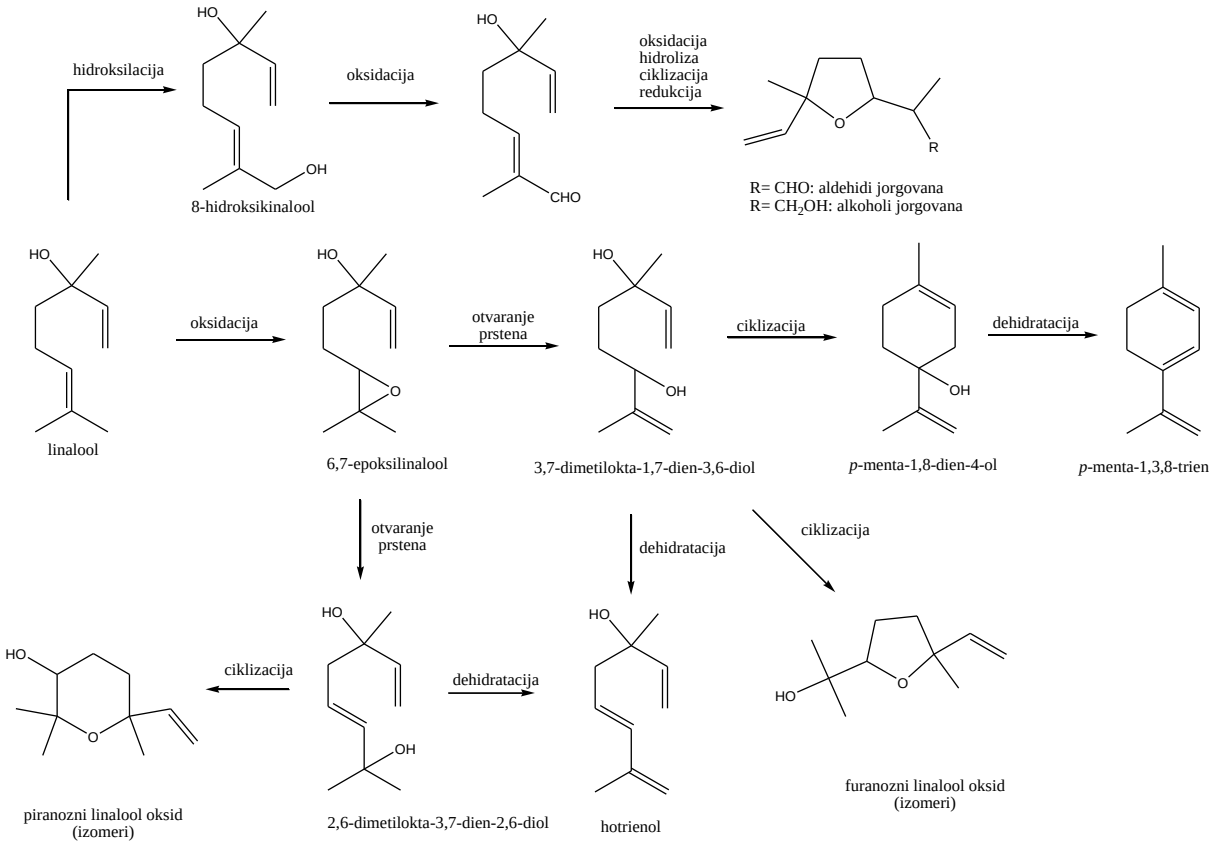
kestena [77]. Međutim, većina vrsta meda je karakterizirana s nekoliko kemijskih spojeva koji mogu poslužiti kao nespecifični kemijski markeri botaničkog podrijetla. Također, sastav izomera (količina i njihov omjer) može imati važnu ulogu u karakterizaciji određenih vrsta meda [75]. Raspodjela enantiomera u medu je ovisna o botaničkom podrijetlu [78]. Primjerice, spoj identificiran u medu timijana, 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on (smjesa 3*S* i 3*R* enantiomera u omjeru 1:1) je identificiran i u medu maslačka (*Taraxacu*m *officinale* Weber) i medu djeteline (*Trifolium repens* L.), ali u različitim enantiomernim omjerima [79].



Slika 4. Podjela kemijskih markera (preuzeto i prilagođeno iz Kaškonienė i Venskutonis, 2010.) [48]

2.5.1.1. Isparljivi spojevi

Uniflorni med posjeduje različita senzorska svojstva, a time i karakterističan profil isparljivih organskih spojeva [48]. Većinu isparljivih spojeva kao što su fenilacetaldehid, 2-feniletanol, benzil-alkohol, benzaldehid je moguće identificirati u različitim vrstama meda što ograničava njihovo korištenje kao specifičnih markera [80]. Međutim, njihova povećana koncentracija kao i različit omjer može poslužiti za razlikovanje vrsta meda dobivenih iz različitih botaničkih izvora [81].

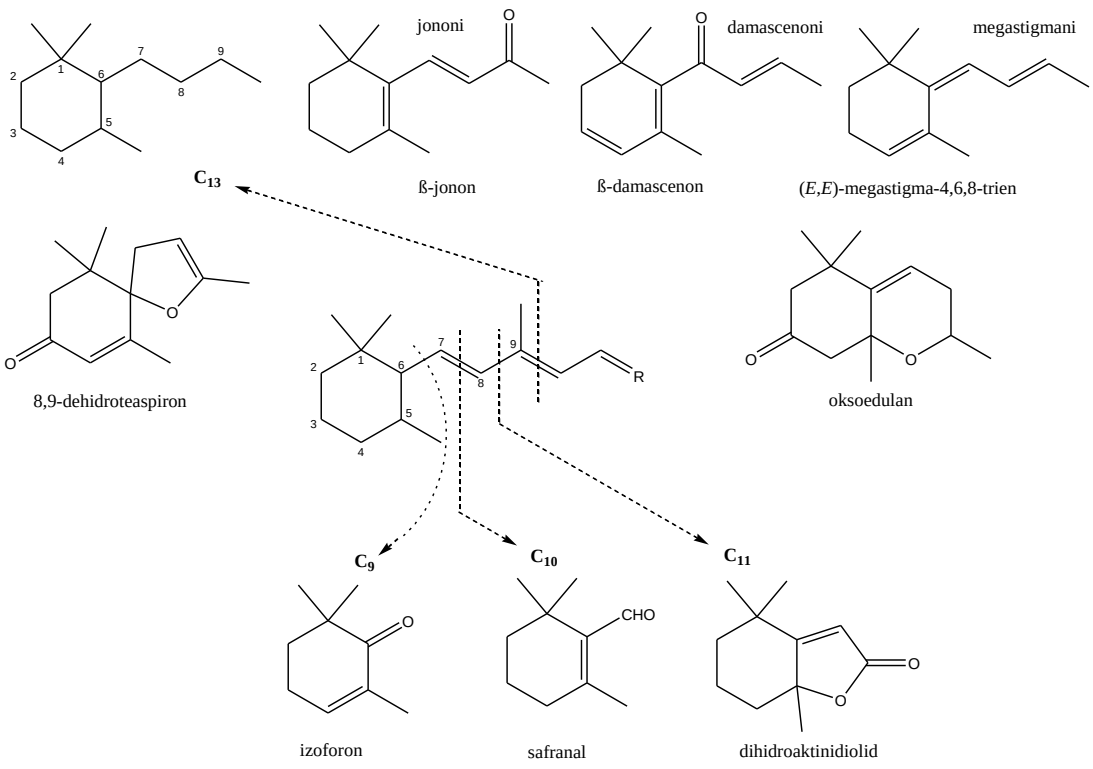


Slika 5. Nastanak derivata linaloola [3,82]

Glavni isparljivi spojevi identificirani u medu mogu se, općenito, svrstati u tri glavne skupine organskih spojeva: terpeni, norizopreniodi i derivati benzena [49]. Određeni spojevi iz navedenih klasa su predloženi kao potencijalni markeri botaničkog podrijetla, dok se spojevi poput nekih razgranatih alkohola i aldehida povezuju sa metabolizom mikroorganizama, a derivati furana/pirana sa termičkom obradom meda i uvjetima skladištenja [2,83]. Primjerice, metil-antranilat je veoma dobro poznat marker za utvrđivanje meda od agruma, dok su 3,9-epoksi-1,4(8)-*p*-mentadien (eter lipe), *trans*-8-*p*-menten-1,2-diol i tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-2*H*-piran (*cis*-oksid ruže) predloženi markeri meda od lipe [84,85]. Naef i suradnici (2004) su u cvijetu i medu od lipe identificirali monoterpenske kiseline 4-izopropenilcikloheksa-1,3-dien-1-karboksilnu kiselinu i 4-(1-hidroksi-1-metiletil)-cikloheksa-1,3-dien-1-karboksilnu kiselinu [86]. Slično, analizom ekstrakata cvijeta i meda od agruma identificirani su različiti monoterpeni. U ekstraktima četiri vrste cvijeta agruma linalool je glavni spoj, a pretvorbama linaloola mogu nastati različiti derivati linaloola identificirani u medu (slika 5) [87]. Također, odsutnost određenih isparljivih spojeva može biti koristan

parametar u karakterizaciji meda. Tako, odsutnost 3-metilbutan-1-ola (izoamilnog alkohola) može potvrditi autentičnost meda lipe [47,88].

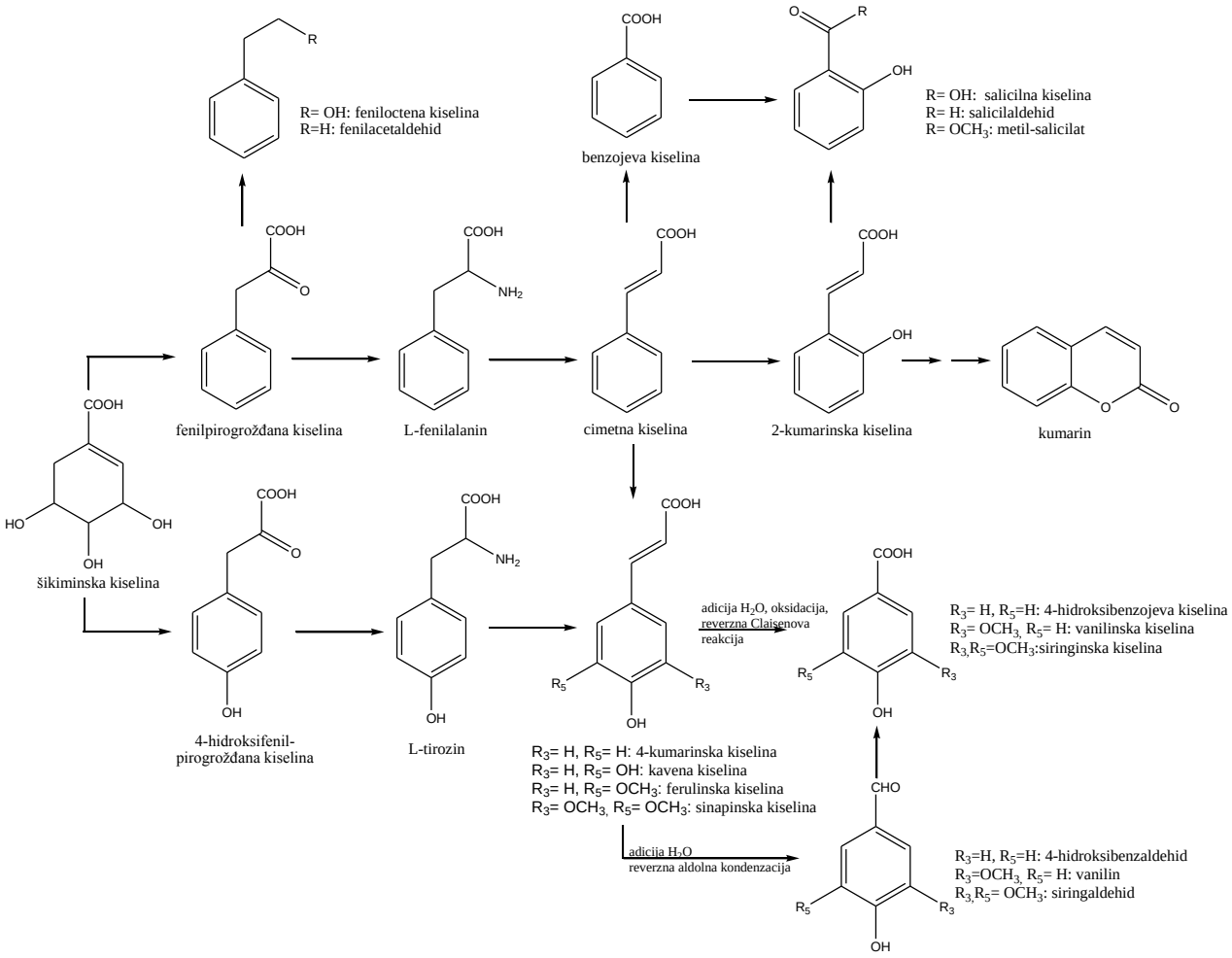
Pojedina skupina spojeva može dominirati kromatografskim profilom određene vrste meda poput terpena u profilu isparljivih i poluisparljivih spojeva meda od agruma (više od 80%) [2,4,87] ili fenola (oko 60% identificiranih spojeva) u profilu aromatičnih spojeva meda od pamuka [89]. U ekstraktima meda od vrijeska (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) identificirani su različiti aromatični spojevi izvedeni iz karotenoida koji mogu poslužiti kao biomarkeri botaničkog podrijetla među kojima se ističe dehidrovomifoliol [90,91]. Također, različiti norizoprenoidi su identificirani i u ekstraktima meda od eukaliptusa [92], a α-izoforon, ß-izoforon i 4-oksoizoforon su predloženi biomarkeri botaničkog podrijetla meda od planike (*Arbutus unedo* L.).



Slika 6. Nastanak C_9-, C_{10}-, C_{11}-, C_{13}- norizoprenoida razgradnjom karotenoida [93]

Analiza više od 200 ekstrakata novozelandskih vrsta meda ukazuje da je prisutnost 1-(3-okso-*trans*-1-butenil)-2,6,6-trimetilcikloheksan-*trans*,*cis*-1,2,4-triola vezana za med timijana [94]. C_{13}-Norizoprenoid 3,4-dihidro-3-oksoedulan je dominantan spoj vršnih para meda različka

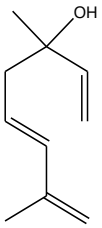
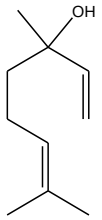
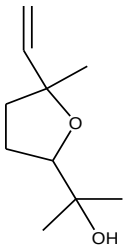
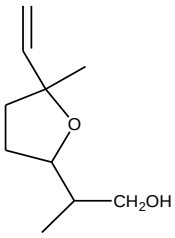
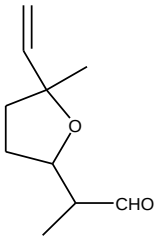
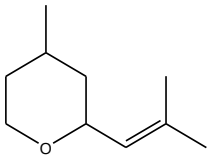
(*Centaurea cyanus* L.) [95]. Na slici 6 je prikazana opća shema razgradnje karotenoida i nastanak C_9-, C_{10}-, C_{11}-, C_{13}- norizoprenoida, a na slici 7 je prikazan nastanak derivata benzena.

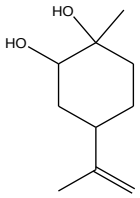
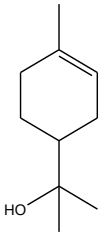
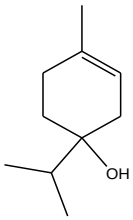
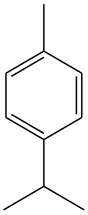
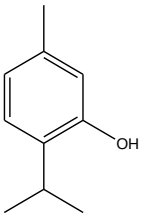
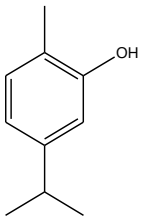
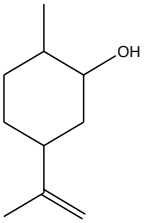


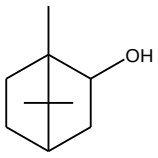
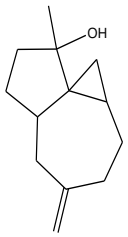
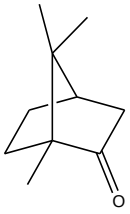
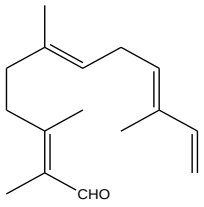
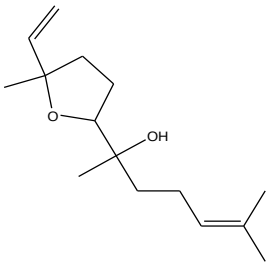
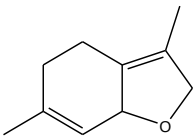
Slika 7. Nastanak derivata benzena [96]

Sastav isparljive frakcije istraživan je u mnogim vrstama meda [97]. U posljednje vrijeme se za izolaciju isparljive frakcije meda upotrebljavaju metode koje ne uključuju intenzivno zagrijavanje kao što su statička (*static headspace*, SHS) i dinamička izolacija vršnih para (*dynamic headspace*, DHS), mikroekstrakcija na krutoj fazi (*solid-phase microextraction*, SPME), ekstrakcija na krutoj fazi (*solid-phase extraction*, SPE), ultrazvučna ekstrakcija (*ultrasound extraction*, USE) [98]. Dobiveni rezultati analize isparljivih spojeva ovise o primijenjenoj metodi izolacije i identifikacije [9]. U tablicama 3, 4, 5 i 6 su strukturnim formulama prikazani odabrani primjeri isparljivih kemijskih markera različitih vrsta meda.

Tablica 3. Odabrani primjeri kemijskih markera različitih vrsta meda: **terpeni**

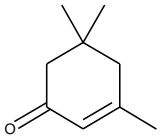
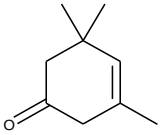
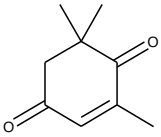
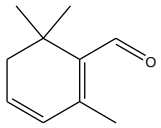
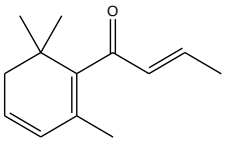
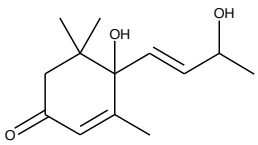
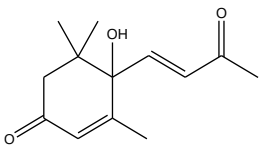
Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
3,7-dimetilokta-1,5,7-trien-3-ol (hotrienol)		*Lavandula* spp.	DHS-GC-MS	[100]
		Citrus sinensis L .	HS-SPME-GC-MS	[101]
		Lavandula spp.	SDE-GC-MS	[2]
		Eucryphia lucida (Labill.) Baill	SE, *deriv*./SD/DHS-GC-MS	[68]
		Mentha spp.	HS-SPME-GC-MS	[83]
		Salix spp.	HS-SPME, USE-GC-MS	[102]
		Citrus unshiu Marc.	HS-SPME-GC-MS/FID	[70]
linalool		*Hedysarium coronarium* L.	HS-SPME-GC-MS	[101]
		Mentha spp.	HS-SPME-GC-MS	[83]
		Salix spp.	HS-SPME, USE-GC-MS	[102]
		Citrus unshiu Marc.	HS-SPME-GC-MS/FID	[70]
oksidi linaloola (izomeri)		*Citrus* spp.	SDE-GC-MS	[2,4]
		Mentha spp.	HS-SPME-GC-MS	[83]
		Salix spp.	HS-SPME, USE-GC-MS	[102]
		Citrus unshiu Marc.	HS-SPME-GC-MS/FID	[70]
alkoholi jorgovana (izomeri)		*Citrus* spp.	HS-SPME-GC-MS SDE-GC-MS	[103] [2,4]
		Salix spp.	HS-SPME, USE-GC-MS	[102]
aldehidi jorgovana (izomeri)		*Citrus* spp.	HS-SPME-GC-MS SDE-GC-MS	[103] [2]
		Salix spp.	HS-SPME, USE-GC-MS	[102]
		Paliurus spina-christi Mill.	HS-SPME-GC-MS	[104]
		Citrus unshiu Marc.	HS-SPME-GC-MS/FID	[70]
oksidi ruže (izomeri; tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-2*H*-piran)		*Tilia* spp.	HS-SPME-GC-MS	[103]
			SE, SDE-HRGC-MS	[85]
			HS-SPME-GC-MS	[46]

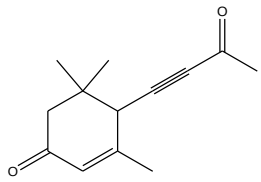
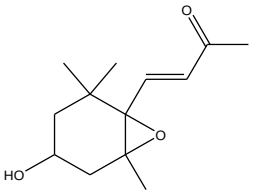
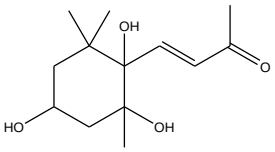
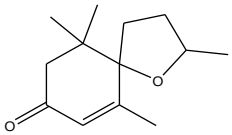
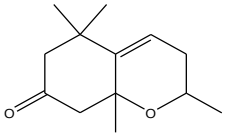
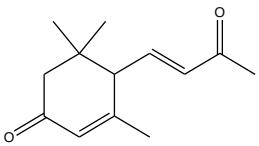
limonen-1,2-diol (8-*p*-meten-1,2-diol)		*Citrus* spp. *Tilia* spp.	HS-SPME-GC-MS SE, SDE-HRGC-MS SDE-GC-FID	[103] [85] [105]
α-terpineol		*Hedysarium coronarium* L. *Citrus* spp.	HS-SPME-GC-MS SDE-GC-MS	[101] [4]
terpinen-4-ol		*Hedysarium coronarium* L. *Salix* spp.	HS-SPME-GC-MS HS-SPME, USE-GC-MS	[101] [102]
1-metil-4-(metiletil)benzen (*p*-cimen)		*Tilia* spp.	HS-SPME-GC-MS	[46]
timol		*Thymus* spp. *Thymus capitatus* L. *Tilia* spp.	HS-SPME-GC-MS HS-SPME-GC-MS SDE-GC-FID	[106] [107] [105]
karvakrol		*Thymus* spp. *Tilia* spp.	HS-SPME-GC-MS HS-SPME-GC-MS SDE-GC-FID HS-SPME-GC-MS	[106] [108] [105] [103]
dihidrokarveol		*Eucalyptus camaldulensis* L.	HS-SPME-GC-MS	[101]

borneol		*Salix* spp. *Eucalyptus camaldulensis* L.	HS-SPME-GC-FID/MS HS-SPME-GC-MS	[109] [101]
spatulenol		*Eucalyptus* spp.	SDE-GC-MS	[2]
kamfor		*Castanea sativa* L.	HS-SPME-GC-MS	[101]
sinensal (α,ß-izomeri)		*Citrus* spp.	SDE-GC-MS	[2,4]
nerolidol oksid		*Lavandula* spp.	SDE-GC-MS	[2]
eter lipe (3,9-epoksi-1,4(8)-*p*-mentadien)		*Tilia* spp.	SE, SDE-HRGC-MS	[85]

HS-SPME-mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi; USE-ultrazvučna ekstrakcija; DHS-dinamička ekstrakcija vršnih para; SD-parna destilacija; SDE-simultana destilacija-ekstrakcija, SE-ekstrakcija otapalom; *deriv.*-derivatizacija; GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa, FID-plamenoionizacijski detektor; HRGC-plinska kromatografija visokog razlučivanja

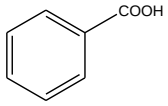
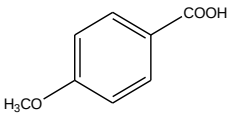
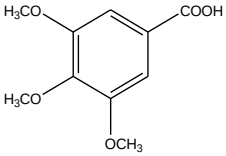
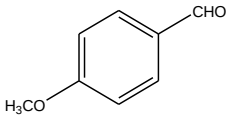
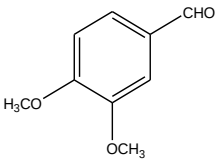
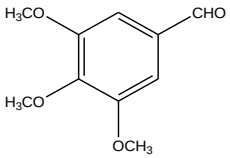
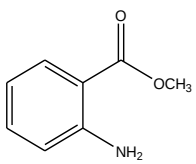
Tablica 4. Odabrani primjeri kemijskih markera različitih vrsta meda: **norizoprenoidi**

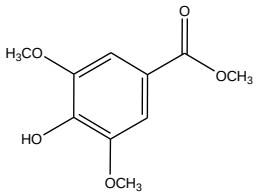
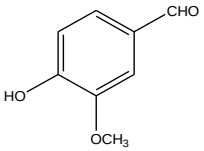
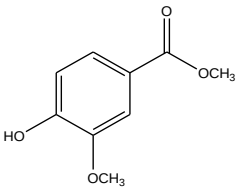
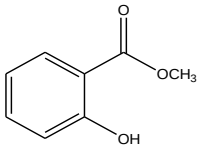
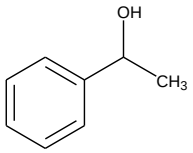
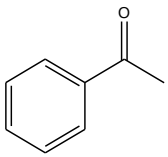
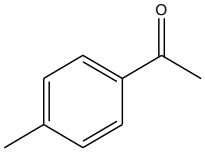
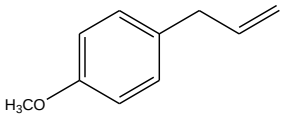
Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
α-izoforon (3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1-on)		*Salvia officinalis* L.	USE-GC-MS	[81]
		Calluna vulgaris/Erica spp.	HS-SPME-GC-MS	[46]
		Calluna vulgaris (L.) Hull	HS-SPME-GC-MS/O	[110]
		Arbutus unedo L.	DHS-GC-MS	[111]
		Centaurea cyanus L.	HS-SPME-GC-MS/FID	[95]
		Arbutus unedo L.	SPME-GC-MS	[112]
		Salix spp.	HS-SPME/USE-GC-MS	[102]
		Hedysarum coronarium L.	USE-GC-MS	[113]
β-izoforon		*Arbutus unedo* L.	DHS-GC-MS	[111]
4-oksoizoforon		*Salvia officinalis* L.	USE-GC-MS	[81]
		Eucalyptus spp.	SDE-GC-MS	[2]
		Arbutus unedo L.	DHS-GC-MS	[111]
		Centaurea cyanus L.	HS-SPME-GC-MS/FID	[95]
		Arbutus unedo L.	SPME-GC-MS	[112]
		Salix spp.	HS-SPME/USE-GC-MS	[102]
		Hedysarum coronarium L.	USE-GC-MS	[113]
safranal		*Escallonia pulverulenta* (Ruiz et Pav.) Pers.	SPME-GC-MS	[114]
		Salix spp.	HS-SPME/USE-GC-MS	[102]
		Prunus mahaleb L.	HS-SPME-GC-MS	[115]
β-damascenon		*Salix* spp.	HS-SPME-GC-FID/MS	[109]
		Calluna vulgaris/Erica spp.	HS-SPME-GC-MS	[46]
		Salix spp.	HS-SPME/USE-GC-MS	[102]
vomifoliol		*Salix* spp.	USE-GC-FID/MS	[109]
		Prunus mahaleb L.	USE-GC-MS	[115]
		Mentha spp.	USE-GC-MS	[83]
		Hedysarum coronarium L.	USE-GC-MS	[113]
dehidrovomifoliol (4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-cikloheks-2-en-1-on)		*Salvia officinalis* L.	USE-GC-MS	[81]
		Calluna vulgaris/Erica spp.	HS-SPME-GC-MS	[46]
		Calluna vulgaris (L.) Hull.	SOL, SDE-GC-MS SE, *deriv*.-GC-FID/MS	[91] [90]
		Eucalyptus globulus Labill.	USE-GC-MS	[116]
		Eucalyptus spp.	SE,SPE,SOL-NMR	[33]

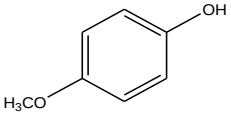
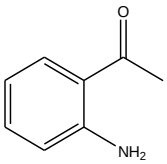
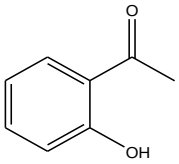
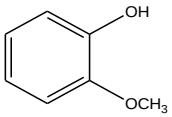
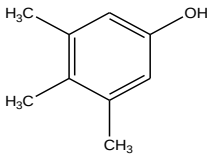
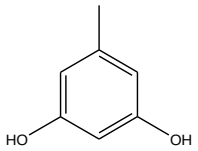
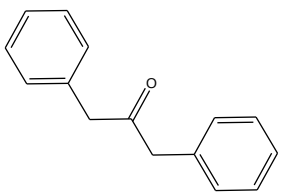
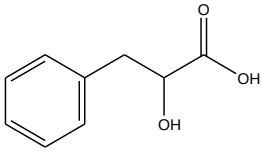
4-(3-okso-1-butinil)-3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1-on		*Calluna vulgaris* (L.) Hull.	SOL, SDE-GC-MS	[91]
		Calluna vulgaris (L.) Hull.	SE, *deriv*.-GC-FID/MS	[90]
3-hidroksi-5,6-epoksi-β-jonon		*Thymus* spp.	SE, *deriv*.-GC-FID/MS	[94]
(4-(4-hidroksi-2,2,6-trimetil-7-oksabiciklo[4.1.0]hept-1-il)-3-buten-2-on)		*Thymus* spp.	USE-GC-MS	[117]
1-(3-okso-*trans*-1-butenil)-2,6,6-trimetilcikloheksan-1,2,4-triol		*Thymus* spp.	SE, *deriv*.-GC-FID/MS	[94]
8,9-dehidroteaspiron		*Eucalyptus leucoxylon* F. Muell.	SE-GC-MS	[92]
3,4-dihidro-3-oksoedulan (izomeri)		*Centurea cyanus* L.	HS-SPME-GC-MS/FID	[95]
3-okso-α-jonon		*Eucalyptus leucoxylon* F. Muell.	SE-GC-MS	[92]
		Eucalyptus globulus Labill.	USE-GC-MS	[116]
		Eucalyptus spp.	SE, SPE, SOL-NMR	[33]
		Hedysarum coronarium L.	USE-GC-MS	[113]

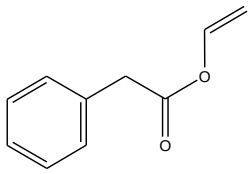
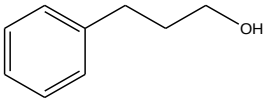
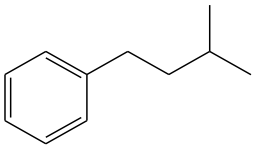
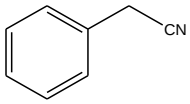
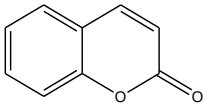
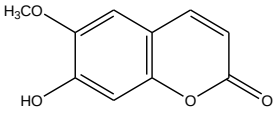
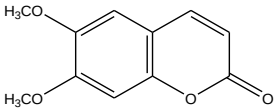
HS-SPME-mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi; USE-ultrazvučna ekstrakcija; DHS-dinamička ekstrakcija vršnih para; SD-parna destilacija; SDE-simultana destilacija-ekstrakcija, SOL-vodena otopina; SE-ekstrakcija otapalom; *deriv*.-derivatizacija; GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa; FID-plamenoionizacijski detektor; O-olfaktometrija

Tablica 5. Odabrani primjeri kemijskih markera različitih vrsta meda: **derivati benzena**

Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
benzojeva kiselina		*Salvia officinalis* L.	USE-GC-MS	[81]
		Calluna vulgaris/Erica spp.	HS-SPME-GC-MS	[46]
		Calluna vulgaris (L.) Hull	HS-SPME-GC/O SE, *deriv*.-GC-FID/MS	[110] [90]
		Salix *spp.*	HS-SPME/USE-GC-MS	[102]
4-metoksi-benzojeva kiselina		*Erica arborea* L.	SOL, SDE-GC-MS	[91]
		Paliurus spina-christi Mill.	USE-GC-MS	[104]
		Castanea crenata Sieb.	SE, SPE-HPLC-ESI-MS/NMR	[118]
3,4,5-trimetoksibenzojeva kiselina		*Thymus* spp.	USE-GC-MS	[117]
		Leptospermum scoparium J.R. et G.Forst.	SPE-LC–MS/MS	[67]
p-anisaldehid (4-metoksibenzaldehid)		*Salvia officinalis* L.	USE-GC-MS	[81]
		Calluna vulgaris/Erica spp.	SDE-GC-MS	[2]
		Erica arborea L.	SOL, SDE-GC-MS	[91]
		Kunzea ericoides (A. Rich.) J. Thompson	HS-SPME-GC-MS	[5]
3,4-dimetoksibenzaldehid		*Thymus capitatus* L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
3,4,5-trimetoksibenzaldehid		*Thymus* spp.	USE-GC-MS HS-SPME-GC-MS	[117] [103,106]
		Thymus capitatus L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
		Bursaria spinosa Cav.	SE-GC-MS	[119]
metil-antranilat		*Citrus sinensis* L.	HS-SPME-GC-MS	[101]
		Citrus spp.	HS-SPME-GC-MS SDE-GC-MS	[103] [2]

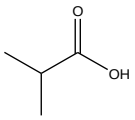
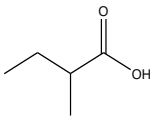
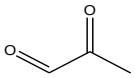
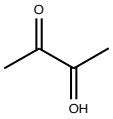
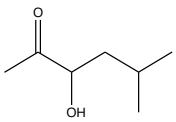
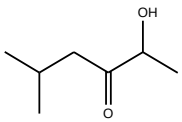
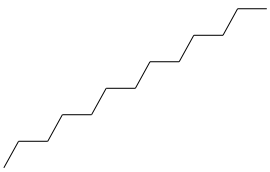
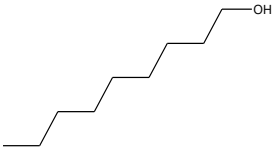
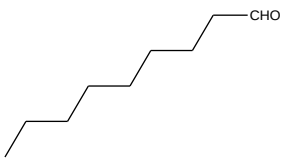
metil-siringat		*Bursaria spinosa* Cav.	SE-GC-MS	[119]
		Salix spp.	USE-GC-FID/MS	[109]
		Mentha spp.	USE-GC-MS	[83]
		Asphodelus microcarpus Salzm. et Viv.	HS-SPME, USE-GC-MS	[120]
		Hedysarum coronarium L.	USE-GC-MS	[113]
		Centaurea cyanus L.	USE- GC–MS/FID	[121]
vanilin		*Thymus capitatus* L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
		Thymus spp.	USE-GC-MS	[117]
metil-vanilat		*Erica arborea* L.	SOL, SDE-GC-MS	[91]
metil-salicilat		*Salix* spp.	SPME-GC-MS	[112]
		Salix spp. (medljikovac)	HS-SPME-GC-MS	[80]
		Rosmarinus officinalis L.	DHS-GC-MS	[122]
1-feniletanol		*Castanea sativa* L.	HS-SPME-GC-MS	[101]
			USE-GC-MS	[116]
		Castanea sativa Mill.	SDE-GC-FID	[105]
acetofenon		*Castanea sativa* L.	HS-SPME-GC-MS	[101]
		Castanea sativa Mill.	SDE-GC-FID	[105]
4´-metilacetofenon		*Tilia* spp.	HS-SPME-GC-MS	[103]
			SDE-GC-FID	[105]
			HS-SPME-GC-MS	[46]
1-metoksi-4-prop-2-enilbenzen (estragol)		*Tilia* spp.	SDE-GC-FID	[105]

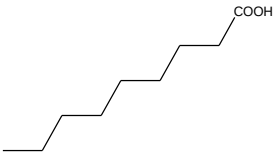
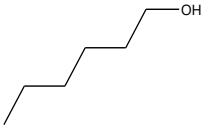
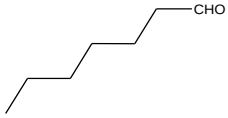
4-metoksifenol		*Thymelaea hirsuta* L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
2′-aminoacetofenon		*Calluna vulgaris/Erica* spp.	SDE-GC-MS	[2]
			HS-SPME-GC-MS	[101]
		Castanea sativa Mill.	SDE-GC-FID	[105]
		Castanea sativa L.	USE-GC-MS	[116]
2′-hidroksiacetofenon		*Calluna vulgaris/Erica* spp.	SDE-GC-MS	[2]
		Leptospermum scoparium J. R. et G. Forst	HS-SPME-GC-MS	[5]
gvajakol		*Calluna vulgaris/Erica* spp.	SDE-GC-MS	[2]
3,4,5-trimetilfenol		*Calluna vulgaris/Erica* spp.	HS-SPME-GC-MS	[46]
		Leptospermum polygalifolium Salisb.	HS-SPME-GC-MS	[5]
3,5-dihidroksitoluen		*Tolpis virgata* (Desf.) Bertol.	HS-SPME-GC-MS	[107]
1,3-difenil-propan-2-on		*Thymus capitatus* L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
		Thymus spp.	HS-SPME-GC-MS	[106]
		Lavandula spp.	SDE-GC-FID/MS	[123]
		Eucalyptus spp.	SDE-GC-FID/MS	[123]
		Castanea sativa Mill.	SDE-GC-FID	[105]
2-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina		*Thymus* spp.	HS-SPME-GC-MS	[103]
		Calluna vulgaris (L.) Hull	SE, *deriv*.-GC-FID/MS	[90]
		Galactites tomentosa Moench.	SOL-HPLC-DAD	[124]
		Centaurea cyanus L.	SOL-HPLC-DAD	[121]

etenil-fenilacetat		*Thymus* spp.	HS-SPME-GC-MS	[103]
3-fenilpropanol		*Thymelaea hirsuta* L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
3-metilbutilbenzen		*Thymus capitatus* L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
fenilacetonitril		*Thymus* spp.	HS-SPME-GC-MS	[108]
		Taraxacum spp.	HS-SPME-GC-MS	[103]
		Salix spp.	HS-SPME, USE-GC-MS	[102]
		Citrus unshiu Marc.	HS-SPME-GC-MS/FID	[70]
kumarin		*Lavandula* spp.	SDE-GC-MS	[2]
		Prunus mahaleb L.	HS-SPME,USE-GC-MS	[115]
		Lavandula spp.	SDE-GC-FID/MS	[123]
skopoletin (7-hidroksi-6-metoksi-kumarin)		*Gossypium hirsutum* L.	USE-GC-MS	[89]
skoparon (6,7-dimetoksi-kumarin)		*Gossypium hirsutum* L.	USE-GC-MS	[89]

HS-SPME-mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi; USE-ultrazvučna ekstrakcija; DHS-dinamička ekstrakcija vršnih para; SDE-simultana destilacija-ekstrakcija, SOL-vodena otopina; SE-ekstrakcija otapalom; *deriv.*-derivatizacija; GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa; FID-plamenoionizacijski detektor; O-olfaktometrija; ESI-ionizacija elektroraspršenjem

Tablica 6. Ostali isparljivi kemijski markeri različitih vrsta meda

Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
2-metilpropanska kiselina		*Thymus* spp.	USE-GC-MS	[117]
2-metilbutanska kiselina		*Calluna vulgaris* (L.) Hull	HS-SPME-GC-MS/O	[110]
metilglioksal		*Leptospermum scoparium* J.R. et G. Forst	SPE-UPLC-PDA/MS-MS	[125]
acetoin		*Eucalyptus* spp. *Eucalyptus globulus* Labill.	SDE-GC-MS SDE-GC-MS/FID USE-GC-MS	[2] [123] [116]
3-hidroksi-5-metilheksan-2-on		*Eucalyptus* spp. *Eucalyptus globulus* Labill.	SDE-GC-MS HS-SPME-GC-MS USE-GC-MS	[2] [126] [116]
2-hidroksi-5-metilheksan-3-on		*Eucalyptus* spp. *Eucalyptus globulus* Labill.	SDE-GC-MS HS-SPME-GC-MS USE-GC-MS	[2] [126] [116]
tridekan		*Tolpis virgata* (Desf.) Bertol.	HS-SPME-GC-MS	[107]
nonanol		*Thymelaea hirsuta* L. *Eucalyptus camaldulensis* L. *Castanea sativa* L.	HS-SPME-GC-MS HS-SPME-GC-MS HS-SPME-GC-MS	[107] [101] [101]
nonanal		*Eucalyptus camaldulensis* L. *Hedysarium coronarium* L. *Castanea sativa* L. *Eucalyptus globulus* Labill. *Paliurus spina-christi* Mill.	HS-SPME-GC-MS HS-SPME-GC-MS HS-SPME-GC-MS USE-GC-MS HS-SPME-GC-MS	[101] [101] [101] [116] [104]

nonanska kiselina		*Eucalyptus* spp.	HS-SPME-GC-MS	[103]
		Paliurus spina-christi Mill.	HS-SPME, USE-GC-MS	[104]
		Citrus unshiu Marc.	HS-SPME-GC-MS/FID	[70]
heksan-1-ol		*Thymelaea hirsuta* L.	HS-SPME-GC-MS	[107]
		Lavandula spp.	DHS-GC-MS	[100]
		Hedysarium coronarium L.	HS-SPME-GC-MS	[101]
		Lavandula spp.	SDE-GC-MS	[2]
			SDE-GC-FID/MS	[123]
heksanal		*Lavandula* spp.	DHS-GC-MS	[100]
			SDE-GC-MS	[2]
			SDE-GC-FID/MS	[123]

HS-SPME-mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi; USE-ultrazvučna ekstrakcija; DHS-dinamička ekstrakcija vršnih para; SDE-simultana destilacija-ekstrakcija, GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa; FID-plamenoionizacijski detektor; O-olfaktomerija; UPLC-tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti; PDA-detektor sa nizom fotodioda

Kiralni isparljivi spojevi

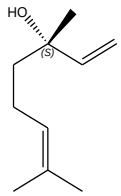
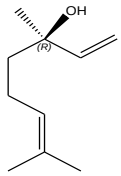
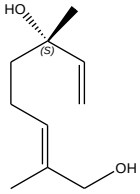
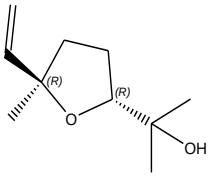
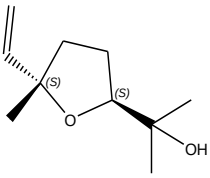
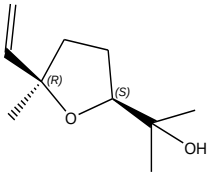
Kiralne molekule u prirodi su prisutne kao čisti enantiomeri (npr. aminokiseline, ugljikohidrati) ili kao smjese enantiomera u specifičnom omjeru (npr. karboksilne kiseline, alkoholi) [127]. Svaka promjena ovih omjera ukazuje na nedozvoljenu manipulaciju ili na dodatak sintetskih spojeva [78]. Stoga, kiralna analiza ima razne primjene u kontroli kvalitete, kao što su prepoznavanje patvorenja, kontrola procesa fermentacije, procjena trajnosti proizvoda, ispitivanje autentičnosti, kontrola tehnoloških procesa te ispitivanje biološke aktivnosti [128,129].

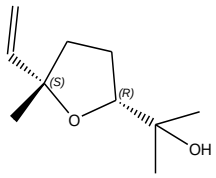
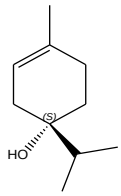
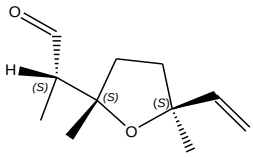
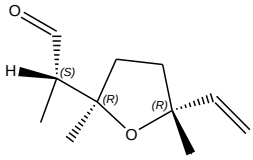
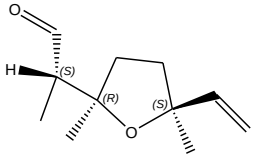
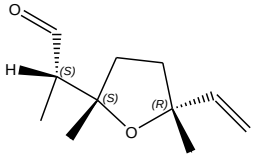
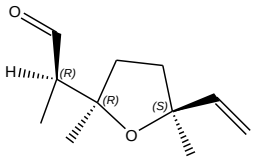
Kiralne molekule se razdvajaju upotrebom modernih tehnika (npr. plinska kromatografija, GC; superkritična fluidna kromatografija, SFC; tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC) [129] koristeći kolone (npr. MEGA-DEX DMP [128]; ßDEXse [79]; Chirasil Dex [78]) sa kiralnom stacionarnom fazom (npr. dimetilpentil-ß-ciklodekstrin [128]; permetil-ß-ciklodekstrin vezan na silikonski polimer [78]), a detektiraju se uporabom različitih detektora poput spektrometra masa (MS, engl. *mass spectometer*), detektora apsorpcije ultraljubičastog zračenja (engl. *ultraviolet (UV) detector*), polarimetrijskog detektora optičke rotacije (engl. *optical rotation (OR) detector*) i detektora cirkularnog dikroizma (engl. *circular dichroism (CD) detector*) [129].

Određivanje odnosa enantiomera određenih kiralnih isparljivih spojeva, kao što su terpeni, predstavlja alternativni analitički pristup određivanja botaničkog podrijetla meda. Kiralni aromatični spojevi prirodnog podrijetla imaju karakterističnu raspodjelu (distribuciju) enantiomera što se pripisuje stereoselektivno kontroliranim biogenetskim mehanizmima njihovog nastajanja. Pažitna i suradnici (2012) su pokazali da jednodimenzionalna plinska kromatografija (GC) sa kiralnom stacionarnom fazom ima ograničenu moć razdvajanja kiralnih isparljivih spojeva u složenoj matrici. Upotrebom multidimenzionalne (dvodimenzionalne) plinske kromatografije mogu se odrediti točni enantiomerni omjeri [127]. Verzera i suradnici (2014) su odredili enantiomerni odnos linaloola i njegovih oksida, te su dobili analogne rezultate usporedbom cvijeta i meda od agruma. Odnos enantiomera linaloola i njegovih oksida je ostao stabilan u istraženim uzorcima meda od agruma i stoga manje podložan utjecaju raznih čimbenika poput vremena skladištenja meda i pčelarske prakse. U svim uzorcima meda od agruma su najzastupljeniji (+)-enantiomeri linaloola i linalool oksida [128]. Također, usporedbom ekstrakta cvijeta naranče, identificiran je isti (+)-enantiomer 8-hidroksilinaloola kao u ekstraktu odgovarajućeg meda [79]. Primjena kombinacije markera, kao u slučaju meda od agruma (metil-antranilat, kofein, (+)-8-hidroksilinalool) može još pouzdanije ukazati na određeni botanički izvor [79]. Također, kao dodatni isparljivi markeri botaničkog podrijetla meda od agruma su predloženi i izomeri sinensala [2].

Raspodjela (distribucija) enantiomera kiralnih isparljivih spojeva je korištena i u karakterizaciji meda od repice (*Brassica napus* L.), divljeg kestena (*Aesculus hippocastanum* L.), gorke naranče (*Citrus aurantium* L.), bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.), suncokreta (*Helianthus annuus* L.), sitnolisne lipe (*Tilia cordata* Mill.), maline (*Rubus idaeus* L.) upotrebom multidimenzionalne plinske kromatografije [78,127]. Razlike u omjerima aldehida jorgovana (izomer B) i hotrienola su zapažene za bagremov med, dok se suncokretov med razlikovao od ostalih istraživanih vrsta meda različitim izomernim omjerom *trans*-linalool oksida (prevladava 2*R*,5*R*-izomer) [127]. Od istraživanih vrsta meda, jedino u medu od kestena prevladava *trans*-(2*S*,5*S*)-enantiomer linalool oksida. Stoga, omjer enantiomera *trans*-linalool oksida može poslužiti kao marker suncokretovog i kestenovog meda [78]. Također, za razliku od ostalih istraživanih vrsta meda, u suncokretovom medu prevladava (4*S*)-enantiomer terpinen-4-ola [78]. Značajne razlike u enantiomernom omjeru linaloola su opažene u medu od repice (veći sadržaj (*R*)-linaloola), a enantiomerni omjeri aldehida jorgovana su poslužili za karakterizaciju meda od agruma, lipe i bagrema [78]. U tablici 7 su prikazani odabrani kiralni isparljivi markeri različitih vrsta meda.

Tablica 7. Strukture i apsolutna konfiguracija odabranih kiralnih isparljivih markera botaničkog podrijetla meda

Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
(3*S*)-linalool		*Citrus* spp. *Aesculus hippocastanum* L.	HS-SPME-GC-MS SPME-GCxGC-FID	[128] [78]
(3*R*)-linalool		*Brassica napus* L.	SPME-GCxGC-FID	[78]
(6*S*)-2,6 dimetilokta-2,7-dien-1,6-diol (8-hidroksilinalool)		*Citrus* spp.	SE-GC–MS	[79]
trans-(2*R*,5*R*)-linalool oksid		*Citrus* spp. *Helianthus annuus* L.	HS-SPME-GC-MS SPME-GCxGC-FID	[128] [78]
trans-(2*S*,5*S*)-linalool oksid		*Aesculus hippocastanum* L.	SPME-GCxGC-FID	[78]
cis-(2*S*,5*R*)-linalool oksid		*Citrus* spp.	HS-SPME-GC-MS	[128]

cis-(2*R*,5*S*)-linalool oksid		*Tilia cordata* Mill.	SPME-GCxGC-FID	[78]
(4*S*)-terpinen-4-ol		*Helianthus annuus* L.	SPME-GCxGC-FID	[78]
(2*S*,2´*S*,5´*S*) aldehid jorgovana A		*Citrus aurantium* L. *Tilia cordata* Mill.	SPME-GCxGC-FID	[78]
(2*S*,2´*R*,5´*R*) aldehid jorgovana B		*Citrus aurantium* L. *Robinia pseudoacacia* L.	SPME-GCxGC-FID	[78]
(2*S*,2´*R*,5´*S*) aldehid jorgovana C		*Citrus aurantium* L. *Robinia pseudoacacia L*.	SPME-GCxGC-FID	[78]
(2*S*,2´*S*,5´*R*) aldehid jorgovana D		*Aesculus hippocastanum* L.	SPME-GCxGC-FID	[78]
(2*R*,2´*R*,5´*S*) aldehid jorgovana D		*Citrus aurantium* L. *Tilia cordata* Mill.	SPME-GCxGC-FID	[78]

HS-SPME-mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi; SE-ekstrakcija otapalom; GCxGC-dvodimenzionalna plinska kromatografija; GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa, FID-plamenoionizacijski detektor

2.5.1.2. Flavonoidi i ostali fenolni spojevi

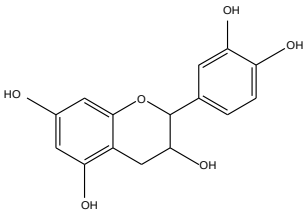
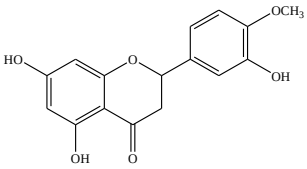
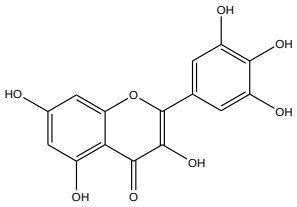
Fenolni spojevi čine veliku skupinu fitokemikalija koje pčele putem nektara, medne rose i peludi iz biljaka prenose u med [19,125]. Kvalitativni i kvantitativni profil fenolnih spojeva ima važnu ulogu u ispitivanju podrijetla uniflornih vrsta meda [43]. Fenolne kiseline i polifenoli su sekundarni biljni metaboliti i koriste se kao kemotaksonomski markeri u sistematizaciji biljaka [26], a isto tako mogu poslužiti za razlikovanje uniflornih vrsta meda dobivenih iz različitih sorti i/ili različitog geografskog podrijetla [125]. Razvijene su mnoge metode određivanja polifenola u medu i propolisu, a zasnivaju se na primjeni kolorimetrije, tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kormatografije (GC), tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i kapilarne elektroforeze (CE) [71].

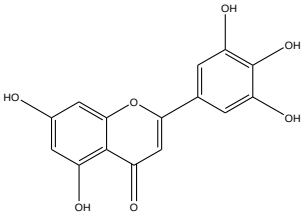
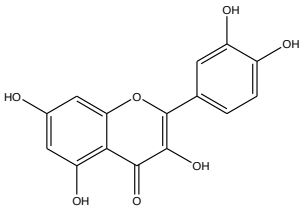
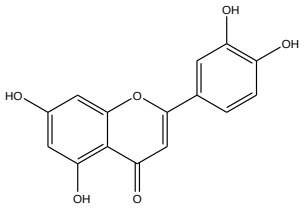
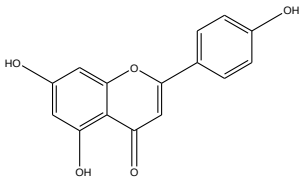
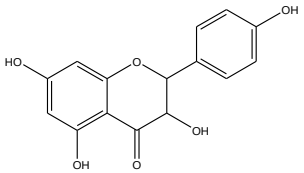
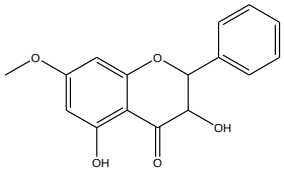
Različite vrste meda mogu se razlikovati u flavonoidnom profilu, kao i u koncentracijama flavonoida [130]. Uniflorne vrste meda od agruma, lavande, timijana, kadulje, bagrema i dr. se odlikuju niskim sadržajem flavonoida (0,66-1,6 mg kg^{-1}), dok vrste meda od heljde, facelije, maslačka, ružmarina, cvijeta trešnje i dr. imaju relativno visok sadržaj ukupnih flavonoida (3,26-6,9 mg kg^{-1}) [130]. Visok sadržaj pinocembrina i krizina karakterističan je za bagremov med. Također, u bagremovom medu Schievano i suradnici (2013) su izolirali i identificirali flavonoid alpinon i to po prvi put u medu [33]. Smatra se da je botaničko podrijetlo osnovni razlog raznolikosti u sadržaju flavonoida u medu, ali sadržaj flavonoida je također uvelike ovisan o vrsti i sastavu propolisa [130]. Količina propolisa u medu ovisi o količini i raspodjeli propolisa u košnici [131]. Karakteristični flavonoidi meda od eukaliptusa su miricetin (3,5,7,3′,4′,5′-heksahidroksiflavon), tricetin (5,7,3′,4′,5′-pentahidroksiflavon), kvercetin (3,5,7,3′,4′-pentahidroksiflavon), luteolin (5,7,3′,4′-tetrahidroksiflavon) i kempferol (3,5,7,4′-tetrahidroksiflavon) [132]. Također, flavonoidi koji potječu iz propolisa, kao što su flavononi pinobanksin i pinocembrin te flavon krizin su identificirani u većini uzoraka meda od eukaliptusa, kao i u većini drugih istraživanih vrsta meda [132–134]. Miricetin (3,5,7,3′,4′,5′-heksahidroksiflavon), luteolin (5,7,3′,4′-tetrahidroksiflavon) i tricetin (5,7,3′,4′,5′-pentahidroksiflavon) su glavni flavonoidi identificirani u medu *Leptospermum polygalifolium* Salisb. [135]. Hesperetin je koristan marker u određivanju botaničkog podrijetla meda od agruma, budući da je navedeni flavanon, u obliku glikozida hesperidina (hesperetin-7-*O*-rutinozid), identificiran u nektaru agruma [136].

Pažljiva procjena profila fenolnih kiselina, fenolnih estera i aromatskih karbonilnih spojeva je korisna u određivanju botaničkog podrijetla meda [9]. Fenolne kiseline, poput elaginske u

medu vrijeska, ružmarinske u medu timijana, kavene, *p*-kumarinske, ferulinske u medu od suncokreta i bagrema, imaju važnu ulogu u karakterizaciji uniflornih vrsta meda [134,137]. Jedan od najistaknutijih primjera fenolne kiseline kao specifičnog kemijskog markera botaničkog podrijetla meda je homogentizinska kiselina (2,5-dihidroksifeniloctena kiselina) identificirana u medu planike (*Arbutus unedo* L.) [43]. Razlike u relativnoj zastupljenosti fenolnih kiselina u kromatografskim profilima mogu poslužiti za razlikovanje manuka i kanuka vrsta meda. Povećana koncentracija 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline karakteristična je za manuka med, dok je 4-metoksifenilmliječna kiselina karakteristika kromatografskog profila kanuka meda [67]. Također, usporedbom kromatografskih profila fenolnih kiselina meda od vrijeska (*Erica* sp.) i lavande (*Lavandula stoechas* L.), povećana koncentracija *p*-kumarinske kiseline (39%) može ukazivati na botaničko podrijetlo meda od vrijeska [138]. Primjeri flavonoida i ostalih fenolnih spojeva kao kemijskih markera različitih vrsta meda su prikazani u tablicama 8 i 9.

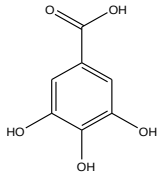
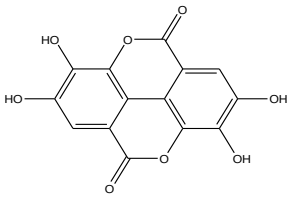
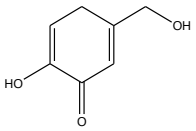
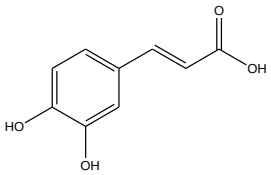
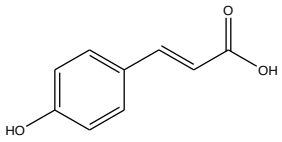
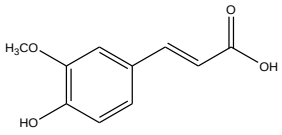
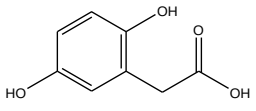
Tablica 8. Odabrani primjeri kemijskih markera meda: **flavonoidi**

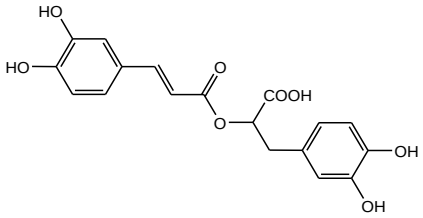
Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
katehin		*Melilotus officinalis* L.	SPE-HPLC-PDA	[139]
hesperetin		*Citrus sinensis* L. *Citrus* spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD SPE-HPLC-DAD	[134] [140]
miricetin		*Eucalyptus* spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[132]

tricetin		*Eucalyptus* spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[132]
		Eucalyptus camaldulensis Dehnh.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[141]
		Leptospermum polygalifolium Salisb.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[135]
kvercetin		*Eucalyptus* spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[132]
		Eucalyptus camaldulensis Dehnh.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Helianthus annuus L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Brassica spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Salvia officinalis L.	SPE, SOL, SE-RP-HPLC-DAD	[142]
luteolin		*Eucalyptus* spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[132]
		Eucalyptus pilligaensis Maiden	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[141]
		Leptospermum polygalifolium Salisb.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[135]
		Salvia officinalis L.	SPE, SOL, SE-RP-HPLC-DAD	[142]
apigenin		*Salvia officinalis* L.	SPE, SOL, SE-RP-HPLC-DAD	[142]
kempferol		*Eucalyptus* spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[132]
		Rosmarinus officinalis L.	SPE, SOL, SE-RP-HPLC-DAD	[143]
		Brassica spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Rosmarinus officinalis L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Salvia officinalis L.	SPE, SOL, SE-RP-HPLC-DAD	[142]
alpinon		*Robinia acacia* L.	SE, SPE, SOL-NMR	[33]

SPE-ekstrakcija na krutoj fazi; SOL-vodena otopina; SE-ekstrakcija otapalom; PDA-detektor sa nizom fotodioda; DAD-detektor sa nizom dioda; NMR-nuklearna magnetska rezonancija; HPLC-visokodjelotvorna tekućinska kromatografija; RP-HPLC-visokodjelotvorna tekućinska kromatografija reverznih faza

Tablica 9. Odabrani primjeri kemijskih markera meda: **ostali fenolni spojevi**

Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
galna kiselina		*Lavandula stoechas* L.	SPE, SPE-HPLC-DAD	[138]
		Melilotus officinalis L.	SPE-HPLC-PDA	[139]
		Leptospermum spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[135]
elaginska kiselina		*Erica* spp.	SPE-HPLC-DAD	[144]
			SPE, SPE-HPLC-DAD	[138]
			SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
kojična kiselina		*Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst	SPE-UPLC-PDA/MS-MS	[5,125]
kavena kiselina		*Castanea sativa* Mill.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
			SPE-HPLC	[145]
		Helianthus annuus L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Lavandula spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Robinia pseudoacacia L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Salvia officinalis L.	SPE, SOL, SE-RP-HPLC-DAD	[142]
p-kumarinska kiselina		*Castanea sativa* Mill.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Helianthus annuus L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Lavandula spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Robinia pseudoacacia L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Salvia officinalis L.	SPE, SOL, SE-RP-HPLC-DAD	[142]
ferulinska kiselina		*Helianthus annuus* L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Robinia pseudoacacia L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
homogentizinska kiselina		*Arbutus unedo* L.	SOL-HPLC- DAD	[75]

ružmarinska kiselina 	*Thymus capitatus* Hoffgg. i L.K	SPE-CZE-DAD	[137]
	Fagopyrum esculentum L.	SPE-HPLC- DAD	[146]

CZE-kapilarna zonska elektroforeza; SPE-ekstrakcija na krutoj fazi; SOL-vodena otopina; SE-ekstrakcija otapalom; UPLC-tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti; PDA-detektor sa nizom fotodioda; DAD-detektor sa nizom dioda; NMR-nuklearna magnetska rezonancija; HPLC-visokodjelotvorna tekućinska kromatografija; RP-HPLC-visokodjelotvorna tekućinska kromatografija reverznih faza

2.5.1.3. Ugljikohidrati

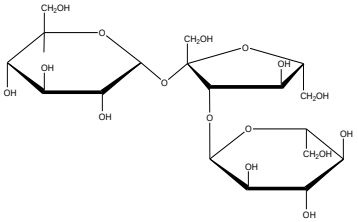
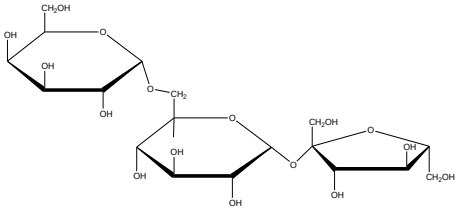
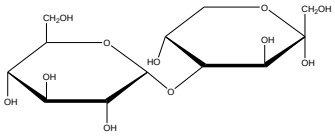
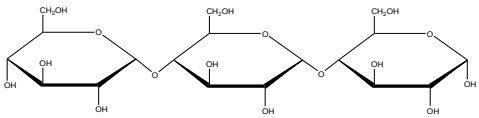
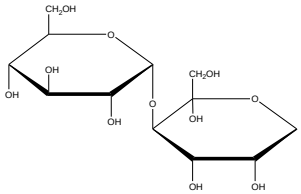
Istraživanje sastava ugljikohidrata u medu je korisno za ispitivanje autentičnosti [9]. Sadržaj i omjer glavnih monosaharida u medu, fruktoze i glukoze, te omjer glukoze i vode predstavljaju korisne parametre karakterizacije uniflornih vrsta meda [14]. U gotovo svim vrstama meda fruktoza je prevladavajući monosaharid, dok je glukoza obično zastupljenija samo u određenim vrstama meda, poput meda od repice i maslačka [48]. Uobičajene metode određivanja sastava ugljikohidrata u medu se zasnivaju na primjeni tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i plinske kromatografije (GC) [147]. Brokl i suradnici (2010) su, za analizu ugljikohidrata prisutnih u medu prvi upotrijebili metodu koja se zasniva na primjeni dvodimenzionalne plinske (GCxGC) kromatografije čime su, u usporedbi sa jednodimenzionalnom (1D) GC, postigli bolje razdvajanje složene smjese disaharida [148]. Primjenom plinske kromatografije, nakon derivatizacije uzoraka meda, Sanz i suradnici (2004) su identificirali 16 disaharida i 9 trisaharida [149], a de la Fuente i suradnici (2011) su kvantitativno odredili 14 disaharida i 21 trisaharid [147]. Ruiz-Matute i suradnici (2010) su detektirali 25 trisaharida i 10 tetrasaharida među kojima su trisaharidi planteoza (*α*-galaktopiranozil-(1→6)-*β*-fruktofuranozil-(2→1)-*α*-D-glukopiranozid) i *α*-3´-glukozil-izomaltoza identificirani prvi put u medu [38].

Uniflorne vrste meda posjeduju veoma slične kvalitativne kromatografske profile oligosaharida što se može objasniti činjenicom da oligosaharidi u medu nastaju uglavnom djelovanjem enzima invertaze [26,147]. Osim djelovanja enzima, na profil ugljikohidrata u medu utječe sastav ishodnih tvari (nektar, medna rosa) iz kojeg je med dobiven. Tako, ako je određeni monosaharid prisutan u većoj koncentraciji u nektaru, njegova koncentracija će biti

povećana i u medu [150]. U medu suncokreta, Mateo i suradnici (1997) nisu detektirali erlozu što se može objasniti niskom koncentracijom saharoze (ishodnog spoja) u nektaru suncokreta [151]. Također, Swallow i suradnici (1990) su iznimno nisku koncentraciju erloze u medu uljane repice doveli u vezu s niskim sadržajem saharoze u cvjetovima uljane repice [152]. Analiza ugljikohidrata može poslužiti za razlikovanje vrsta meda veoma sličnih fizikalno-kemijskih karakteristika (boja, pH, električna vodljivost) poput medljikovaca i meda od vrijeska, te meda od ružmarina i meda od agruma [151].

Rezultati istraživanja pokazuju da je teško izdvojiti jedan ili više ugljikohidrata koji bi mogli poslužiti kao markeri botaničkog podrijetla meda [48]. Međutim, postoje značajne razlike u profilu ugljikohidrata između nektarnih vrsta meda i medljikovaca [20,26]. S ciljem klasifikacije različitih vrsta meda analiza profila oligosaharida se obično koristi u kombinaciji sa statističkom obradom rezultata [9]. Medljikovci imaju veću koncentraciju oligosaharida, uglavnom trisaharida melicitoze (*O*-α-D-glukopiranozil-(1→3)-*O*-*β*-D-fruktofuranozil-(2→1)-*α*-D-glukopiranozid) i rafinoze (*O*-*α*-D-galaktopiranozil-(1→6)-*O*-*α*-D-glukopiranozil-*β*-D-fruktofuranozid), koji obično nisu prisutni u nektarnim vrstama meda [48]. Melicitoza se može istaknuti kao koristan marker medljikovca [20]. Također, u istraživanju Matea i suradnika (1997) sadržaj izomaltoze u medljikovcu je znatno veći nego u istraživanim nektarnim vrstama meda [151]. Srednja vrijednost ukupnih ugljikohidrata za nektarni med je veća nego za medljikovac [20]. U odredbama Direktive Vijeća EU, kao i u Pravilniku o medu, definirana je ukupna količina fruktoze i glukoze za cvjetni med (≥ 60%) i medljikovac (≥ 45%) [7,8]. Omjeri određenih ugljikohidrata mogu poslužiti kao korisni parametri za utvrđivanje botaničkog podrijetla meda. Omjer fruktoze i glukoze (F/G) za nektarni med je obično niži (1) nego za medljikovac (1,5-2), što se pripisuje većem sadržaju glukoze u nektarnom medu [20]. Bagremov i kestenov med su karakterizirani znatno većom vrijednošću F/G (1,7 i 1,5), za razliku od vrijednosti navedenog omjera za med od uljane repice (1) i suncokreta (1,1) [150]. Također, omjeri maltoze i izomaltoze, saharoze i turanoze, maltoze i turanoze, maltotrioze i ukupnog sadržaja rafinoze, erloze, melicitoze se koriste za određivanje autentičnosti uniflornih vrsta meda [48].

Tablica 10. Odabrani primjeri kemijskih markera meda: **ugljikohidrati**

Kemijski spoj	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
melicitoza (*O*-*α*-D-glukopiranozil-(1→3)-*O*-*β*-D-fruktofuranozil-(2→1)-*α*-D-glukopiranozid)		*Quercus ilex* L.	*deriv*.-GC-MS	[112]
		Quercus spp. (medljikovac)	*deriv*.-GC-MS	[151]
		Abies spp.	*deriv*.-GC-FID	[150]
		Nothofagus spp. (medljikovac)	SPE-HPAEC-PAD	[153]
		Rhododendron ferrugineum L.	SOL-NMR	[36]
rafinoza (*O*-*α*-D-galaktopiranozil-(1→6)-*O*-*α*-D-glukopiranozil-*β*-D-fruktofuranozid)		*Quercus ilex* L.	*deriv*.-GC-MS	[112]
		Abies spp.	*deriv*.-GC-FID	[150]
		Castanea sativa Mill.	SOL-NMR	[36]
maltuloza (*α*-D-glukopiranozil-(1→4)-D-fruktoza)		*Persea americana* Mill.	*deriv*.-GC-MS	[112]
		Quercus spp. (medljikovac)	*d*eriv.-GC-MS	[151]
		Castanea sativa Mill.	SOL-NMR	[36]
maltotrioza (*α*-D-glukopiranosil-(1→4)-*α*-D-glukopiranozil-(1→4)-D-glukopiranoza)		*Nothofagus* spp. (medljikovac)	SPE-HPAEC-PAD	[153]
turanoza (*O*-*α*-D-glukopiranozil-(1→3)-D-fruktoza)		*Abies* spp.	*deriv*.-GC-MS	[112]
		Robinia pseudoacacia L.	SOL-NMR	[36]

HPAEC-PAD-anionska izmjenjivačka kromatografija visoke djelotvornosti sa pulsnim amperometrijskim detektorom; SPE-ekstrakcija na krutoj fazi; SOL-vodena otopina; SE-ekstrakcija otapalom; *deriv*.-derivatizacija; NMR-nuklearna magnetska rezonancija; GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa; FID-plamenoionizacijski detektor

2.5.1.4. Aminokiseline i ostali spojevi sa dušikom

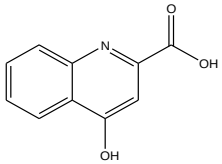
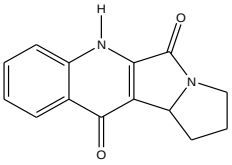
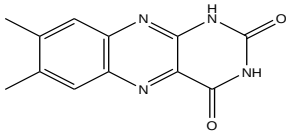
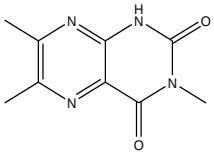
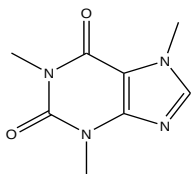
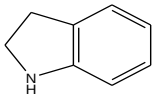
Istraživanje profila aminokiselinama prisutnih u medu može poslužiti za određivanje botaničkog, kao i zemljopisnog podrijetla te u kontroli kvalitete meda [40,48]. Pelud je za pčele najvažniji izvor proteina i aminokiselina [40]. Većina slobodnih aminokiselina u medu potječe od pčela, što može uzrokovati raznolikost sadržaja aminokiselina u vrstama meda istog botaničkog podrijetla [26]. Prolin, podrijetlom iz pčela, je glavna aminokiselina u medu [48]. Osim kao kriterij za procjenu zrelosti meda može poslužiti u otkrivanju patvorenja meda. Tako, med sa manje od 180 mg kg^{-1} prolina se smatra nezrelim ili patvorenim [20]. Smatra se da su visoke koncentracije prolina karakteristične za medljikovce [20]. Međutim, istraživanja pokazuju veliku raznolikost u koncentracijama prolina u različitim vrstama meda [26]. Tako, najveća koncentracija prolina, među istraživanim vrstama meda, je pronađena u medu *Thymus* ssp. (956 mg kg^{-1}), dok su najmanje koncentracije prisutne u vrstama meda *Robinia pseudoacacia* L. (222 mg kg^{-1}), *Brassica* spp. (235 mg kg^{-1}), *Rhododendron* spp. (264 mg kg^{-1}) i *Rosmarinus officinalis* L. (271 mg kg^{-1}) [14,48]. Kako bi se lakše utvrdile razlike u profilima aminokiselina meda s obzirom na botaničko podrijetlo često se rezultati analize obrađuju statističkim metodama, na primjer primjenom analize glavnih komponenata (PCA, *principal component analysis*) [154]. Iglesisas i suradnici (2004) su, primjenom različitih metoda multivarijantne analize, uspješno razlučili medljikovce od nektarnih vrsta meda na osnovu razlike u koncentracijama aminokiselina, posebice u sadržaju glutaminske kiseline i triptofana [41]. Profil aminokiselina u različitim vrstama meda je veoma sličan, ali postoje razlike u ukupnom sadržaju, kao i koncentracijama pojedinih aminokiselina prisutnih u medu [26,155]. Tako su Conte i suradnici (1998) usporedbom 17 različitih vrsta meda, u medu od timijana naveli najveći ukupni sadržaj aminokiselina [155]. Zatim, lavandin med, u usporedbi sa medom od eukaliptusa, sadrži visoku koncentraciju fenilalanina i tirozina [123,154]. Fenilalanin i tirozin se ističu kao korisni parametri za razlikovanje lavandinog meda od ostalih uniflornih vrsta meda. Tako, visoka koncentracija tirozina poslužila je za razlikovanje lavandinog meda od ružmarinovog meda, meda od timijana i meda cvijeta naranče [154], dok je visoka koncentracija fenilalanina poslužila za razlikovanje lavandinog meda od bagremovog meda, meda od kestena, uljane repice, lipe i suncokreta [156]. Fenilalanin je najzastupljenija aminokiselina identificirana u medu kineske konopljike (*Vitex negundo* L.) [157]. Povećana koncentracija treonina karakteristična je za suncokretov med te može poslužiti kao biomarker [156]. Pirini i suradnici (1998) su aminokiselinu arginin identificirali samo u medu kestena i istaknuli je kao važan parametar karakterizacije [158]. Iako su Gonzales Paramás i suradnici

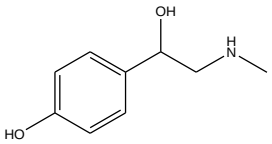
(2006) arginin identificirali i u ostalim istraživanim vrstama meda, u medu od kestena su ipak pronašli povećanu koncentraciju. Također su, u medu od kestena i hrasta, naveli povećane koncentracije γ-aminomaslačne kiseline [40]. U istom istraživanju su, po prvi put u medu, identificirali α-aminoadipinsku kiselinu i homoserin [40].

Osim aminokiselina, u medu su identificirani i ostali spojevi sa dušikom koji mogu poslužiti kao korisni markeri u određivanju botaničkog podrijetla. Kinolinski alkaloidi, poput kinurenske kiseline, su korisni markeri botaničkog podrijetla meda od kestena [159]. Beretta i suradnici (2009) su u medu od kestena, osim kinurenske kiseline (KA), identificirali i dva nova pirolidinil-kinolinska alkaloida, 3-pirolidinil-kinurensku kiselinu (3-PKA) i γ-laktamski derivat navedene kiseline (γ-LACT-3PKA). Također, u medu od kestena su identificirali, po prvi put, 4-kinolon (4-QUIN). U istom istraživanju, kvantitativni podaci ukazuju na najveći sadržaj navedenih alkaloida u medu od kestena [160]. Osim prethodno spomenutih kinolinonskih alkaloida, Jeong-Yong Cho i suradnici (2015) su, iz meda kestena izolirali i identificirali još dva nova spoja, spirodikinolinon i derivat kinurenske kiseline [118]. Metilksantini, odnosno *N*-metil derivati 2,6-dioksopurina (ksantina) poput teobromina, kofeina i teofilina predstavlju važne biomarkere iz grupe purinskih alkaloida. Kofein i teobromin su pronađeni u medu od agruma (*Citrus* spp.) [161]. Međutim, osim kofeina, u medu od mandarine su identificirani i drugi spojevi sa dušikom karakteristični za *Citrus unshiu* Marc. botanički izvor poput 1*H*-indola, 1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona i fenilacetonitrila [70]. Aromatski amin sinefrin, identificiran u cvijetu i medu od agruma, je također predložen kao biomarker [163]. Daniels i suradnici (2016) su u nektaru i medu *Leptospermum scoparium* sorti izolirali i identificirali biomarker lepteridin (3,6,7-trimetil-2,4(1*H*,3*H*)-pteridindion) [55]. Derivati pteridina, 3,6,7-trimetil-2,4(1*H*,3*H*)-pteridindion i 6,7-dimetil-2,4(*1H*,3*H*)-pteridindion, su značajni fluorescentni markeri novozelandskog manuka meda (*Leptospermum scoparium* J.R. Forst. & G. Forst) [74]. Budući da su dva navedena spoja strukturno slična riboflavinu i lumikromu, vjerojatno su dio biosinteze riboflavina [74]. Lumikrom (7,8-dimetilaloksazin) je glavni produkt razgradnje riboflavina (vitamina B2) u kiselom mediju. Kao marker botaničkog podrijetla, uz fenilmliječnu kiselinu, identificiran je po prvi put u medu *Galactites tomentosa* Moench. [124,164]. Visok sadržaj lumikroma identificiran je i u *Salvia officinalis* L. medu i mednom mjehuru pčela, te zajedno sa riboflavinom predstavlja koristan parametar karakterizacije. Odsutsvo fenilmliječne kiseline u HPLC profilu meda od kadulje može poslužiti za razlikovanje od ostalih uniflornih vrsta meda [165]. Istovremeno prisustvo riboflavina, lumikroma i fenilmliječne kiseline karakteristika je HPLC profila meda *Centaurea*

cyanus L. [121]. Lumikrom je također predložen kao dodatni marker meda *Kunzea ericoides* (A. Rich.) J. Thompson [5] te potencijalni marker meda *Mellilotus officinalis* L. [139].

Tablica 11. Odabrani primjeri kemijskih markera meda: **ostali spojevi sa dušikom**

Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
kinurenska kiselina (4-hidroksi kinaldinska kiselina)		*Salix* spp. (medljikovac)	SOL-RP-HPLC-DAD	[166]
		Castanea sativa Mill.	SOL/SPE-HPLC-DAD-MS-MS	[159]
		Castanea spp.	SPE-HPLC-DAD-ESI-MS/NMR	[160]
		Castanea crenata Sieb	SE, SPE-HPLC-ESI-MS/NMR	[118]
γ-laktam 3-(2´-pirolidinil)-kinurenske kiseline (γ-LACT-3PKA)		*Castanea* spp.	SPE-HPLC-DAD-ESI-MS/NMR	[160]
		Castanea sativa Mill.	SE, SPE, SOL-NMR	[33]
		Castanea crenata Sieb	SE, SPE-HPLC-ESI-MS/NMR	[118]
lumikrom (7,8-dimetilaloksazin)		*Melilotus officinalis* L.	SPE-HPLC-PDA	[139]
		Galactites tomentosa Moench.	SE, SOL-HPLC-DAD-MS/MS	[124]
		Centaurea cyanus L.	SOL-HPLC-DAD	[121]
		Salvia officinalis L.	SOL-HPLC–DAD	[165]
		Kunzea ericoides (A. Rich.) J. Thompson	SOL, SPE-UPLC-PDA-MS/MS	[5]
lepteridin (3,6,7-trimetillumazin)		*Leptospermum* spp.	SOL-FS/HPLC-DAD	[167]
		Leptospermum scoparium J.R. et G. Forst	SE, *prep*.-HPLC-UPLC- MS-MS/NMR	[74]
kofein		*Citrus sinensis* L.	SE, SPE, SOL-NMR	[33]
		Coffea spp.	SOL-NMR	[168]
		Citrus unshiu Marc.	USE-GC-MS/FID	[70]
1-*H*-indol		*Citrus unshiu* Marc.	USE-GC-MS/FID	[70]

sinefrin		*Citrus* spp.	USE-HPLC-MS/MS	[163]

SPE-ekstrakcija na krutoj fazi; SOL-vodena otopina; SE-ekstrakcija otapalom; UPLC-tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti; PDA-detektor sa nizom fotodioda; DAD-detektor sa nizom dioda; FS-fluorescentna spektroskopija; *prep*.-HPLC-preparativna HPLC; NMR-nuklearna magnetska rezonancija; GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa; ESI-ionizacija elektroraspršenjem

2.5.1.5. Ostali organski spojevi i mikroelementi

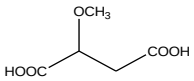
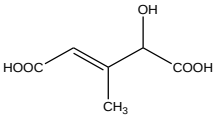
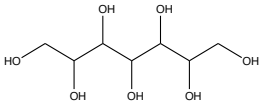
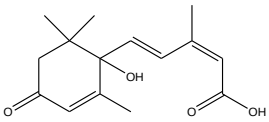
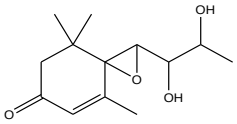
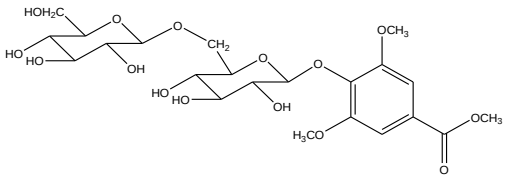
Osim prethodno navedenih, i ostale grupe kemijskih spojeva su također korisne za karakterizaciju meda [48]. Za karakterizaciju različitih vrsta meda koriste se i profili alifatskih organskih kiselina [42]. Del Nozal i suradnici (1998) su izdvojili limunsku, pirogrožđanu, glukonsku, jabučnu i kininsku kiselinu kao najkorisnije kiseline za klasifikaciju istraživanih vrsta meda [169]. Tako se med od vrijeska (*Erica* spp.) od ostalih vrsta meda razlikuje visokim sadržajem kininske kiseline, med od hrasta (*Quercus* spp.) niskim sadržajem pirogrožđane kiseline i visokim sadržajem jabučne i jantarne kiseline te med od timijana (*Thymus* spp.) visokim sadržajem limunske kiseline [169]. Wilkins i suradnici (1995) su u metiliranim dietil-eterskim ekstraktima novozelandskog meda *Knightea excelsa* R. Br. identificirali 32 alifatske dikarboksilne kiseline. Kao markere botaničkog podrijetla navedene vrste meda su predložili 2-metoksibutansku dikiselinu i 4-hidroksi-3-metil-*trans*-pent-2-ensku dikiselinu [170]. Istraživanjem ekstrakata 20 različitih vrsta meda, Beretta i suradnici (2008) su pokazali da prisustvo alifatske komponente u dobivenim ^{1}H NMR profilima može biti pouzdan marker u identifikaciji medljikovaca [171].

Biljni hormon abscisinska kiselina (ABA) je prisutna u nektaru i medu određenih biljnih vrsta te, obično uz određivanje kemijskih profila fenolnih kiselina i/ili flavonoida, može poslužiti kao dodatni biokemijski marker u određivanju botaničkog podrijetla meda [172,173]. Ferreres i suradnici (1996) su u nektaru i medu od vrijeska (*Erica* spp.) izolirali i identificirali izomere *cis*,*trans*- i *trans*,*trans*-abscisinske kiseline u koncentracijama od 2,5 do 16,6 mg/100 g meda te ih predložili kao korisne biomarkere [174]. Međutim, osim u navedenom medu, visoka koncentracija abscisinske kiseline može poslužiti kao važan fitokemijski marker *Arbutus unedo* L. (33,85 mg/100 g) [75], *Leptospermum scoparium* J. R. Forst. & G. Forst (32,8 mg/100 g) [135], *Leptospermum polygalifolium* Salisb. (11,6 mg/100 g) i *Heliantus annuus* L. (9,35 mg/100 g) [173] vrsta meda. Također, povećana koncentracija *cis*,*trans*- i *trans*,*trans*-ABA

izomera je pronađena u medu od kadulje (0,26-3,99 mg/100 g) [175], te australskim vrstama meda *Lophostemon conferta* (R. Br.) Peter G.Wilson & J. T. Waterh. (1,52 mg /100 g), *Banksia ericifolia* L. f. (2,62 mg /100 g), *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake (3,30 mg /100 g), te *Guioa semiglauca* F. Muell. (5,75 mg /100 g) [3,173]. Navedeni ABA-izomeri su u manjoj koncentraciji identificirani u medu od repice (0,025-0,25 mg/100 g), lipe (0,050-0,50 mg/100 g), bagrema (0,10-0,25 mg/100 g) [134] i heljde (0,035-0,38 mg/100 g) [172]. Zastupljenost pojedinog ABA izomera kao i njihov međusoban odnos također može poslužiti u karakterizaciji određenog botaničkog izvora. Primjerice stalan omjer (1:1) *cis*,*trans*- i *trans*,*trans*-ABA izomera karakterističan je za med od planike (*Arbutus unedo* L.) [75], dok je omjer (1:2) *cis*,*trans*- i *trans*,*trans*-ABA izomera pronađen u medu od vrbe (*Salix* spp.) [109]. Također, ABA-izomeri mogu poslužiti za razlikovanje nektarnog meda *Salix* spp. od medljikovca budući da ovi norizoprenoidi nisu prisutni u medljikovcu *Salix* spp. [3].

Truchado i suradnici (2008) su prvi put u sastavu meda identificirali flavonoidne glikozide [176]. U daljnjem istraživanju uniflornih vrsta meda, navedeni spojevi su identificirani u gotovo svim analiziranim uzorcima i karakteristični su za određeni botanički izvor. Stoga, istraživanje profila flavonoidnih glikozida povećava broj potencijalnih kemijskih markera botaničkog podrijetla. Primjerice, triglikozid izorhamnetin-3-*O*-rutinozid-7-*O*-heksozid je potencijalni marker *Mendicago sativa* L. vrste meda, dok je kvercetin-3-*O*-rutinozid-7-*O*-ramnozid glavni flavonolni glikozid identificiran u *Brassica napus* L. medu [177]. Truchado i suradnici (2010) su prvi put u sastavu meda identificirali glukozinolate. Razlike u zastupljenosti i sastavu alifatskih i indolnih glukozinolata u *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. zrelom i nezrelom medu, zajedno sa profilima flavonoidnih-*O*-glikozida i odgovarajućih aglikona mogu poslužiti kao bioindikatori botaničkog podrijetla i zrelosti meda [178]. I drugi glikozidi identificirani u medu, poput leptosperina (metil-siringil-4-*O*-*β*-D-gentiobioza) u manuka medu [179] te 6-*O*-(*β*-D-glukopiranozil)-*β*-D-glukopiranozil-4-(1-hidroksi-1-metiletil)cikloheksa-1,3-dien-1-karboksilat u medu od lipe [180], imaju značajnu ulogu u određivanju botaničkog podrijetla i karakterizaciji meda. Također i određeni šećerni alkoholi mogu poslužiti kao markeri botaničkog podrijetla. Na primjer, kvercitol za med hrasta crnike (*Quercus ilex* L.) i perseitol za med avokada (*Persea americana* Mill.) [112].

Tablica 12. Odabrani primjeri kemijskih markera meda: **ostali organski spojevi**

Kemijski marker	Struktura	Botaničko podrijetlo meda	Metoda analize	Literatura
2-metoksibutanska dikiselina		*Knightea excelsa* R.Br.	SE, *deriv*.-GC-MS	[170]
4-hidroksi-3-metil-*trans*-pent-2-en dikiselina		*Knightea excelsa* R.Br.	SE, *deriv*.-GC-MS	[170]
perseitol (D-glicero-D-galakto-heptitol)		*Persea americana* Mill.	*deriv*.-GC-MS	[112]
abscisinska kiselina (izomeri)		*Salix* spp.	SE, *deriv*.-GC-FID/MS	[94]
		Salix spp.	SOL-RP-HPLC-DAD	[166]
		Salix spp.	SOL-HPLC-DAD	[109]
		Arbutus unedo L	SE/SOL-HPLC- DAD/MS-MS	[75]
		Leptospermum spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[135]
		Tilia europaea L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Robinia pseudoacacia L.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Brassica spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Erica spp.	SPE, SOL, SE-HPLC-DAD	[134]
		Castanea crenata Sieb.	SE, SPE-HPLC-ESI-MS/NMR	[118]
unedon		*Arbutus unedo* L.	SE/SOL-HPLC- DAD/MS-MS	[75]
		Leptospermum scoparium J. R. et G. Forst	SPE-UPLC-PDA/MS-MS	[125]
leptosperin (metil-siringil-4-*O*-*β*-D-gentiobioza)		*Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst	SPE- UPLC-PDA-MS/MS	[5]
		Leptospermum scoparium J. R. et G. Forst.	SPE, *prep*. HPLC-NMR/LC-MS	[179]

SPE-ekstrakcija na krutoj fazi; SOL-vodena otopina; SE-ekstrakcija otapalom; UPLC-tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti; PDA-detektor sa nizom fotodioda; DAD-detektor sa nizom dioda; ESI-ionizacija elektroraspršenjem; *prep*. HPLC-preparativna HPLC; NMR-nuklearna magnetska rezonancija; GC-plinska kromatografija; MS-spektrometrija masa

Istraživanja pokazuju da razlike u sastavu makro- i mikroelemenata različitih vrsta meda uglavnom ovise o botaničkom podrijetlu, a navedene razlike su najizraženije između nektarnog meda i medljikovca [26,181]. Općenito, sadržaj pepela, koji odražava sadržaj minerala, je u nektarnom medu manji i iznosi ≤0,6% (w/w). Navedena vrijednost za medljikovac iznosi 0,64 - 1,1 % (w/w) [20]. Mineralni sastav meda je u uzajamnoj vezi (korelaciji) sa bojom meda. U usporebi sa tamnijim vrstama meda, svijetle vrste meda imaju niži sadržaj minerala [45]. Tamna boja meda (medljikovac, med od avokada, kestena i vrijeska) je u snažnoj međuvisnosti sa koncentracijom Ca i mikroelemenata poput As, Cd, Fe i Pb, a svijetlija i smeđa boja (med od agruma, ružmarina, lavande, eukaliptusa, timijana) je u vezi samo sa sadržajem Al i Mg [182]. Chudzinska i Baralkiewicz (2010) su uspjeli, primjenom multivarijantne analize, svrstati 55 uzoraka meda u dvije glavne skupine, to jest na nektarni med i medljikovac. Medljikovac se od nektarnog meda razlikovao na osnovu sadržaja K, Al, Ni, Cd i Zn, dok su Na, Ba i Pb istaknuti kao indikatori botaničkog podrijetla meda od uljane repice [48,183]. Ca, K, Mg, Li, Na, Rb i Sr su najučinkovitije varijable kod klasifikacije različitih vrsta meda. Prisustvo ovih metala u medu ovisi prvenstveno o botaničkom podrijetlu, karakteristikama tla i agronomskoj praksi. Također, za klasifikaciju su značajni i Fe, Zn, Cu, Cr, Ni i Al ,Cd ili Pb, ali njihovo prisutvo u medu je veoma ovisno o onečišćenju okoliša [184]. Stoga, prilikom istraživanja sastava elemenata u medu, potrebno je uzeti u obzir okolišne, zemljopisne i botaničke čimbenike [44].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci meda i biljni izvori

Za istraživanje je odabrano osam uzoraka uniflornih vrsta meda različitog botaničkog podrijetla. Uzorci meda su prikupljeni od profesionalnih pčelara u periodu od 2012. do 2015. godine. U tablici 13 su prikazane i kratko opisane medonosne biljke od kojih potječu istraživane uniflorne vrste meda.

Tablica 13. Biljni izvori uzoraka meda

Naziv biljke	Slika biljke	Opće karakteristike	Literatura
maslačak (*Taraxacum officinale* Weber)		▪ zeljasta biljka s duguljastim prizemnim listovima složenim u rozetu i svijetložutom cvjetnom glavicom ▪ cvate od ožujka do svibnja ▪ široko rasprostranjena vrsta ▪ raste na područjima od nizinskih do visokoplaninskih	[185,186]
korijandar (*Coriandrum sativum* L.)		▪ jednogodišnja zelen uspravne, glatke stabljike visoke 30-60 cm ▪ cvjetovi su bijeli ili ružičasti ▪ cvate od lipnja do kolovoza i izvrsna je paša za pčele ▪ dobro uspijeva na lakšoj zemlji, kojoj ne manjka vapno, na toplim sunčanim i zaštićenim položajima	[187,188]
crvena djetelina (*Trifolium pratense* L.)		▪ zeljasta višegodišnja biljka ▪ cvjetovi su skupljeni u glavičaste cvatove ▪ cvate od svibnja sve do jeseni ▪ medonosna biljka koja daje velike količine nektara ▪ uzgaja se kao ratarska kultura ▪ u sastavu livadnih zajednica te na ruderalnim staništima raste kao samonikla vrsta	[189–191]

klasoliki vrisak (*Satureja subspicata* Vis.)		▪ polegli ili pridignuti polugrm visine 8-20 cm ▪ 2-5 ljubičastih cvjetova nalazi se u gustim prividnim pršljenima koji su skupljeni poput klasa ▪ kasno ljetna medonosna paša ▪ obično raste na vjetru izloženim mjestima od 200 do 1800 m nadmorske visine	[192,193]
primorski vrisak (*Satureja montana* L.)		▪ trajni i gusti polugrm, visok 20-40 cm ▪ cvjetovi su bijeli i ljubičasto istočkani; razvijaju se po 3-5 u pazušcima listova ▪ cvate od kraja ljeta do jeseni (najčešće od kolovoza do kraja listopada) ▪ cvate u vrijeme kad su mnoge biljke već ocvale, pa je izvrsna pčelinja paša ▪ vrlo medonosna paša, ali je zbog česte suše i bure dosta nesigurna ▪ raste po suhim, toplim i kamenim tlima vapnenačkog područja ▪ izrazita mediteranska biljna vrsta koja raste do 1500 m nadmorske visine	[188,193,194]
vrtni čubar (*Satureja hortensis* L.)		▪ jednogodišnja biljka razvijena u obliku niskoga grma ▪ ljubičasti, ružičasti ili bijeli dosta sitni cvjetovi se razvijaju u pazušcima gornjih listova od lipnja do rujna ▪ raste kao samonikla vrsta na kamenim, suhim i sunčanim obroncima	[195]

kava *Coffea spp.*		▪ obično kultivirane vrste su *Coffea arabica* L. i *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner ▪ obično zimzeleni grm ili polugrm, a kao samonikla može biti i do 10 m visoko stablo ▪ cvjetovi su sitni, mirisni i bijeli ▪ biljci pogoduje sjenovito mjesto ▪ uspijeva u područjima veće nadmorske visine	[196–198]
galaktites (*Galactites tomentosa* Moench.)		▪ jednogodišnja ili dvogodišnja biljka, do 50 cm visine ▪ cvjetovi su cjevasti, skupljeni u glavičaste cvatove koji su okruženi trnovitim ovojnim listićima ▪ cvjeta u srpnju ▪ raste na suhom i pjeskovitom tlu	[199,200]

Botaničko podrijetlo istraživanih uzoraka meda je potvrđeno melisopalinološkom analizom, prema metodologiji von der Ohe i suradnika (2004) [12] na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Peludna zrnaca su analizirana svjetlosnim mikroskopom Hund h 500 (D-Wetzlar, Njemačka) pri povećanju od 400 do 1000 x i digitalnom kamerom Dino-Lite te softverom Dino Capture 2.0. Za identifikaciju vrste peludi korišteni su literaturni podaci [201,202] i palinoteka Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju.

Budući da su reprezentativni uzorci meda od kave dobiveni na plantažama kave (*Coffea* spp.) iz Guatemale (Co1) i Kolumbije (Co2), na navedenim uzorcima nije provedena melisopalinološka analiza. Stoga je uniflornost navedenog meda zasnovana na lokaciji košnica i osobnom iskustvu pčelara. U tablici 14 je naveden najmanji udio peludnih zrnaca iste biljne vrste prema kojem je utvrđena uniflornost istraživanih vrsta meda.

Tablica 14. Najmanji udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu uniflornih vrsta meda

Naziv biljne vrste	Udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu (%)	Literatura
maslačak (*Taraxacum officinale* Weber)	5%*	[12,14,203]
korijandar (*Coriandrum sativum* L.)	>45%	[187]
crvena djetelina (*Trifolium pratense* L.)	>45%	[12,204]
klasoliki vrisak (*Satureja subspicata* Vis.)	20%	[204]
primorski vrisak (*Satureja montana* L.)	20%	[204]
vrtni čubar (*Satureja hortensis* L.)	20%	[204]
galaktites (*Galactites tomentosa* Moench.)	5%	[124,205]

* uz karakteristična senzorska svojstva meda za određenu biljnu vrstu

3.2. Primjena preparativnih metoda ekstrakcije

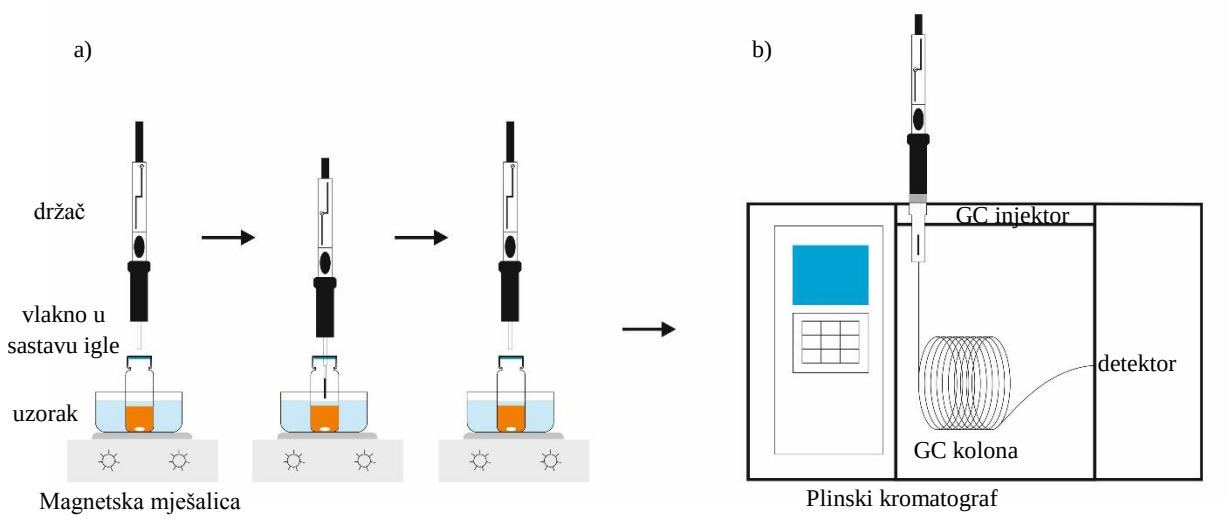
Za izolaciju isparljivih spojeva uzoraka korištene su sljedeće ekstrakcijske metode:

- mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME)
- ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (engl. *ultrasonic solvent extraction*, USE)
- ekstrakcija na krutoj fazi (engl. *solid-phase extraction*, SPE).

3.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

Kod mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi uzorak se nalazi u hermetički zatvorenoj bočici, tzv. vijalici, a isparljivi spojevi se sakupljaju u praznom prostoru iznad uzorka. Za ekstrakciju vršnih para se upotrebljava silikonsko vlakno koje se nalazi u sastavu igle [206,207], a najčešći polimerni materijali koji prekrivaju vlakno su poliakrilat, Carbowax, divinilbenzen i polidimetilsiloksan. Odabirom najpogodnijeg vlakna utječe se na ekstrakciju spojeva različitih veličina, polarnosti i isparljivosti. Potresivanje ili miješanje uzorka, smanjenje volumena vršnih para, dodatak soli te prilagođavanje pH i temperature su drugi načini olakšavanja postizanja ravnoteže i poboljšanja same ekstrakcije [206].

Na osnovu prethodnih istraživanja za ekstrakciju uzoraka odabrana su dva vlakna (prema većem broju izoliranih spojeva): divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS, sivo vlakno debljine filma 50/30 µm, Supelco Co., SAD) i polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB, plavo vlakno debljine filma 65 µm, Supelco Co., SAD). Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 °C i to uvođenjem igle u injektor plinskog kromatografa, dok je sivo vlakno kondicionirano na isti način 60 min na 270 °C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka. Na slici 8 je prikazana shema mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi.



Slika 8. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME): (a) HS-SPME ekstrakcija vršnih para i (b) termička desorpcija spojeva sa SPME vlakna

U staklenu vijalicu volumena 15 mL stavljeno je 5 mL vodene otopine meda (1:1, *v*/*v*) i 2 mL zasićene otopine NaCl (p.a., Fluka Chemie, Švicarska). Vijalica sa uzorkom je hermetički zatvorena čepom sa septom te stavljena u vodenu kupelj zagrijanu na 60 ˚C uz miješanje uzorka (1000 o./min) magentskom mješalicom (Heidolph MR herStandard, Njemačka) sa regulatorom temperature (Heidolph EKT 3001, Njemačka). Vlakno je nakon 15 minuta uvedeno u vršne pare iznad uzorka. Nakon uzorkovanja (40 min), vlakno je uvučeno u iglu i prenešeno do GC-MS/FID injektora gdje su komponente desorbirane pri povišenoj temperaturi (250 ºC, 6 min).

3.2.2. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalima (USE)

Kod USE, ekstrakcija je olakšana upotrebom ultrazvuka, a sam proces se temelji na kavitaciji u tekućem mediju, pri čemu dolazi do boljeg prodiranja otapala u uzorak i stoga većeg ekstrakcijskog iscrpka [49].

U Erlenmeyerovu tikvicu (100 mL) je odvagano 40 g meda i razrijeđeno sa 22 mL destilirane vode te je uz intenzivno miješanje, postupno dodano 1,5 g bezvodnog Na_2SO_4 (p.a., Kemika, Zagreb). U tako pripremljenu otopinu meda je dodano 20 mL organskog otapala i ekstrakcija je provedena 30 minuta u ultrazvučnoj kupelji (Clean 01, MRC Scientific Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo) upotrebom indirektne sonifikacije pri frekvenciji 37 kHz i temperaturi 25±3 °C. Za ultrazvučnu ekstrakciju uzoraka korištena su sljedeća otapala (prethodno pročišćena frakcijskom destilacijom):

- smjesa pentan:dietil-eter (1:2, *v*/*v*)
- diklormetan.

Nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije, organski sloj je izdvojen centrifugiranjem 5 min na 4000 o/min (Centric 322A, Tehtnica, Slovenija) te je filtriran preko pamuka i bezvodnog Na_2SO_4. Ekstrakcija vodenog sloja i odjeljivanje slojeva su ponovljeni još dva puta, na prethodno opisan način. Organski ekstrakti su združeni i koncentrirani frakcijskom destilacijom na manji volumen (do 0,2 mL). Za GC-FID i GC-MS analizu korišten je 1 µL ekstrakta. Za ekstrakciju uzoraka u ovom istraživanju su odabrana otapala koja, s obzirom na rezultate prethodne analize, daju najreprezentativniji profil isparljivih i poluisparljivih spojeva.

3.2.3. Ekstrakcija na krutoj fazi (SPE)

SPE je tehnika predobrade uzorka, koja se koristi za ekstrakciju, koncentriranje i pročišćavanje. Kod ekstrakcije na krutoj fazi uzorak se propušta kroz kolonu za ekstrakciju punjenu čvrstim sorpcijskim materijalom, a spojevi od interesa se ekstrahiraju iz tekuće na krutu fazu. Čvrstu fazu (punilo) najčešće čine sitne porozne čestice silikagela sa vezanom organskom fazom ili organski polimer, kao što je umreženi polistiren. Spojevi koji su se vezali na čvrstu fazu mogu se ukloniti ispiranjem sa odgovarajućim otapalom. Na primjer, većina organskih spojeva se može eluirati sa SPE punila organskim otapalima poput acetona, acetonitrila ili metanola [208].

Ekstrakcija isparljivih i poluisparljivih spojeva na čvrstoj fazi je provedena koristeći SPE kolone sa kopolimernim punilom stiren-divinilbenzen (ENVI-Chrom P, Supelco, Sigma-Aldrich, Njemačka) volumena 6 mL i mase sorbensa 0,5 g). SPE kolone su izravno spojene na procesor (engl. *single tube procesor*, Supelco) s kojim se ostvaruje željeni protok otapala (2 mL min^{-1}). Kondicioniranje čvrste faze je provedeno ispiranjem sa 10 mL diklormetana, zatim s 5 mL metanola i 10 mL smjese etanola i destilirane voda (10 %). Med (10 g) je otopljen u 50 mL destilirane vode. Pripremljena razrijeđena vodena otopina meda je propuštena kroz SPE kolonu, a ugljikohidrati su uklonjeni ispiranjem sa 25 mL destilirane vode. Spojevi zadržani na punilu su uklonjeni ispiranjem sa 30 mL diklormetana. Dobiveni diklormetanski ekstrakti su koncentrirani frakcijskom destilacijom na manji volumen, a 1 μL ekstrakta je korišten za GC-MS/FID analizu.

3.3. Analiza ekstrakata plinskom kromatografijom

Analiza ekstrakata isparljivih i poluisparljivih spojeva istraživanih uzoraka meda provedena je plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) te vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Identifikacija pojedinačnih pikova na kromatogramu je postignuta usporedbom retencijskih indeksa (RI, u odnosu na C_8-C_{25} *n*-alkane za HP-5MS kapilarnu kolonu) sa literaturom [209] i dostupnim standardima, kao i usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima masa iz Wiley Library 275 MS (Wiley, SAD) i NIST 02 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) baza podataka. Postotni sastav isparljivih spojeva uzoraka izračunat je iz površine pikova kromatograma primjenom metode normalizacije (bez korekcijskih faktora), a postoci

identificiranih komponenti izraženi su kao srednja vrijednost rezultata dvije GC-FID i GC-MS analize svakog uzorka.

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

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

3.3.1. Plinska kromatografija sa plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID)

Analiza plinskom kromatografijom provedena je koristeći Agilent Technologies (SAD) plinski kromatograf (model 7890A) s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID). Uređaj je povezan s računalom opremljenim programskim paketom (MSD ChemStation Data Analysis). Karakteristike korištene kapilarne kolone HP-5MS (J&W, SAD) te GC-FID uvjeti rada za navednu kolonu prikazani su u tablici 15. Injektiranje uzoraka provedeno je pomoću SPME držača kod analize vršnih para te pomoću šprice kod analize ekstrakata.

Tablica 15. GC-FID uvjeti za analizu isparljivih i poluisparljvih spojeva meda

GC kolona	HP-5MS nepolarna kapilarna kolona (30 m, duljina; 0,25 mm, unutarnji promjer; 0,25 μm, debljina stacionarne faze) sa (5% fenil)-metilpolisiloksan stacionarnom fazom
plin nositelj	helij sa protokom 1 mL min^{-1}
injektor	temperatura: 250 ˚C, volumen injektiranog ekstrakta: 1 μL, omjer cijepanja je 1:50
temperaturni program kolone	2 min izotermno na 70 ˚C, zatim porast temperature od 70 ˚C do 200 ˚C (3 ˚C min^{-1})
uvjeti rada FID detektora	temperatura detektora: 300 ˚C
solvent delay	3 min (kod analize ekstrakata dobivenih metodama USE i SPE)

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

Osim GC-FID tehnikom, analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je i spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS; Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) koristeći plinski kromatograf model 7890A u kombinaciji s masenim detektorom model 5975C, spojenim na računalo. Kao i kod GC-FID tehnike, odjeljivanje komponenti provedeno je na HP-5MS kapilarnoj koloni (J&W, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD), a uvjeti rada plinskog kromatografa (GC) i spektormetra masa (MS) prikazani su u tablici 15. Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću SPME držača za analizu vršnih para te pomoću šprice za analizu ekstrakata dobivenih USE i SPE ekstrakcijskim metodama.

Tablica 16. GC-MS uvjeti za analizu isparljivih i poluisparljvih spojeva meda

GC kolona	HP-5MS nepolarna kapilarna kolona (30 m, duljina; 0,25 mm, unutarnji promjer; 0,25 μm, debljina stacionarne faze) sa (5% fenil)-metilpolisiloksan stacionarnom fazom
Plin nositelj	helij s protokom 1 mL min^{-1}
Injektor	temperatura: 250 ˚C, volumen injektiranog ekstrakta: 1 μL, omjer cijepanja je 1:50
Temperaturni program kolone	2 min izotermno na 70 ˚C, zatim porast temperature od 70 ˚C do 200 ˚C (3 ˚C min^{-1})
Uvjeti rada MS detektora	energija ionizacije: 70 eV, temperatura ionskog izvora: 280 ˚C, interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica
solvent delay	3 min (kod analize ekstrakata dobivenih metodama USE i SPE)

3.4. Analiza visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativana analiza odabranih uzoraka meda (*Satureja montana* L., *Satureja hortensis* L., *Satureja subspicata* Vis., *Coffea* spp.) provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti sa detektorom sa nizom dioda (engl. *diode array*

detector, DAD), koristeći *Varian ProStar* HPLC-DAD sustav opremljen s visokotlačnom pumpom Varian system ProStar 230, sustavom za injektiranje Varian system ProStar 410, detektorom sa nizom dioda SpectroSystem UV 6000 lp (ThermoSeparation, San Jose, SAD). Uzorci su homogenizirani i otopljeni u ultračistoj vodi (1:10 w/v), a zatim su filtrirani kroz membranski filtar (*Econofilter* RC, Agilent Tehnologies, Milano, Italija; veličina pora 0,45 μm, promjer 25 mm) te injektirani u HPLC. Prije svakog injektiranja pripremljenog uzorka sustav je stabiliziran propuštanjem početnog sastava mobilne faze (% otapala A i otapala B, v/v) u vremenu od 10 min. Uvjeti rada HPLC-DAD sustava prikazani su u tablici 17.

Tablica 17. HPLC-DAD uvjeti za analizu ciljanih spojeva odabranih vrsta meda

HPLC kolona	Phenomenex Gemini C_{18} kolona 110 Å (150 mm, duljina; 4,60 mm, unutarnji promjer; 3 μm, veličina čestica punila; Chemtek Analitica, Italija)
	za uzorak meda *Coffea* spp.: Phenomenex Kinetex C_{18} 100 Å, dimenzija (duljina; unutarnji promjer; veličina čestica punila: 150 mm, 4,60 mm; 5 μm, Chemtek Analitica, Italija)
mobilna faza	fosforna kiselina koncentracije 0,2 mol L^{-1} (otapalo A) i acetonitril (otapalo B), protok 1 mL min^{-1}
injektor	volumen injektiranog uzorka: 10 μL
program linearne gradijentne eluacije	Za uzorke meda *Satureja montana* L. i *Satureja hortensis* L.: t=0, A:B=85:15 (*v*/*v*), u vremenu t=30 min vrijednost A:B doseže 60:40 (*v*/*v*) , nakon 10 min 40:60 (*v*/*v*), zatim nakon 10 min 100% B (ukupno=50 min)
	Za uzorak meda *Satureja subspicata* Vis.: 5 min 100% (*v*/*v*) otapala A, u vremenu t=35 min smanjenje na 20% (*v*/*v*), te povećanje na 100% otapala B u t=60 min (ukupno=60 min)
	Za uzorak meda *Coffea* spp.: t=0, A:B=100:0 (*v*/*v*), t=5 min, A:B=90:10 (*v*/*v*), nakon 15 min, A:B=75:25 (*v*/*v*), nakon 10 min 20:80 (*v*/*v*), te 100% B do t=50 min (ukupno=50 min)
uvjeti rada DAD detektora	snimanje pri 210 nm i 280 nm
ciljani spojevi	siringinska kiselina, metil-siringat, tirozin, fenilalanin, 5-hidroksimetilfurfural, kojična kiselina, 4-hidroksifeniloctena kiselina, benzojeva kiselina, teobromin, teofilin, kofein i lumikrom

Kromatogrami su snimani na valjnim duljinama 280 nm (siringinska kiselina, metil-siringat, 5-hidroksimetilfurfural, kojična kiselina, metilksantini, lumikrom, 4-hidroksifeniloctena kiselina, benzojeva kiselina) i na 210 nm (tirozin i fenilalanin) te su detaljno obrađeni upotrebom ChromQuest V 4.0 softvera (TermoQuest, Rodano, Milano, Italija). Standardne otopine kojične kiseline, benzojeve kiseline, 4-hidroksifenilmliječne kiseline, 5-hidroksimetilfurfurala, metil-siringata, siringinske kiseline su pripremljene u metanolu, a tirozina, fenilalanina i metilksantina u 0,1 M HCl/CH_3OH. Radne otopine standarda su pripremljene u ultračistoj vodi. Baždarne krivulje su izrađene koristeći metodu vanjskog standarda dovodeći u vezu površinu pika sa odgovarajućom koncentracijom.

3.4.1. Enantioselektivna analiza visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom

Ekstrakti meda *Galactites tomentosa* Moench. dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom otapalima su upareni do suha u struji dušika, a ostatak nakon uparavanja je otopljen u mobilnoj fazi i analiziran upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Tablica 18. HPLC-UV, - OR uvjeti za enentioselektivnu analizu 3-fenilmliječne kiseline u medu *Galactites tomentosa* Moench.

HPLC kolona	Chirallica PST-4 kolona (250 mm, duljina; 4,60 mm, unutarnji promjer; 5 μm, veličina čestica punila; Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska) sa amiloza tris-(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiralnim selektorom
Mobilna faza	otopina propan-2-ola (10%) u heksanu, protok 1 mL min^{-1}
Injektor	volumen injektiranog pripravljenog uzorka: 20 μL
Eluacija	izokratna
Uvjeti rada UV detektora	snimanje pri 220 nm
Uvjeti rada polarimetrijskog detektora	optička rotacija (OR) je mjerena pri 426 nm koristeći LED lampu
Ciljani spojevi	(+)-3-fenilmliječna kiselina i (-)-3-fenilmliječna kiselina

HPLC kromatografski sustav je opremljen sa Knauer Smartline pumpom (Berlin, Njemačka), CD/UV detektorom (kiralni detektor JASCO 2095 plus, Jasco, Japan), polarimetrijskim (OR, *eng*. optical rotation) detektorom (Chiralyser IBZ Messtechnik, Hannover, Njemačka). Razdvajanje enatiomera provedeno je na kiralnoj koloni (Chirallica PST-4, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska). HPLC kromatografski uvjeti uz primjenu detektora apsorpcije ultraljubičastog zračenja (engl. *ultraviolet (UV) detector*) i polarimetrijskog detektora optičke rotacije (engl. *optical rotation (OR) detector*) prikazani su u tablici 18.

4. REZULTATI

Rezultati istraživanja pojedinih vrsta meda su prikazani prema primijenjenim metodama ekstrakcije i analize.

4.1. Rezultati GC-MS/FID analiza vršnih para

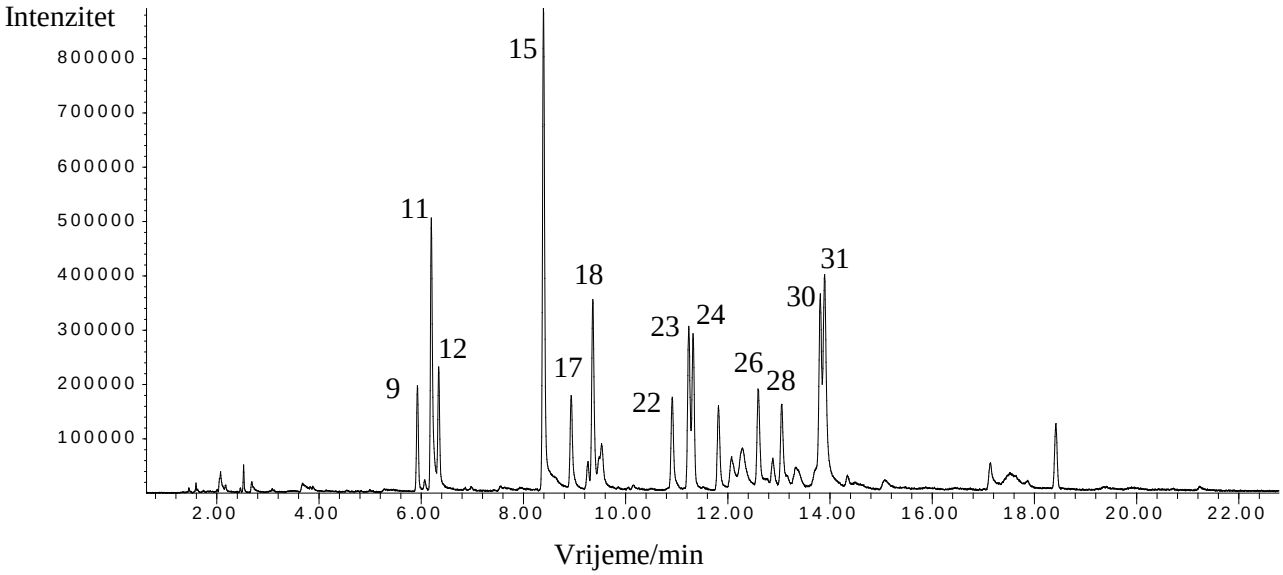
Rezultati GC-FID i GC-MS analiza vršnih para istraživanih uzoraka meda prikazani su tablično kao srednja vrijednost rezultata dvije analize svakog uzorka te u obliku odabranih kromatograma. Identificirani spojevi su poredani u tablicama prema redosljedu eluiranja s HP-5MS kolone.

Tablica 19. Udio isparljivih spojeva meda *Taraxacum officinale* Weber izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno DVB/CAR/PDMS

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)
1.	2-metilpropanonitril	< 900	0,6
2.	2-metilbutanonitril	< 900	2,0
3.	3-metilbutanonitril	< 900	1,5
4.	3-metilpentanonitril	< 900	20,5
5.	3-metilbutanska kiselina (izovalerijanska kiselina)	< 900	1,3
6.	2-metilbutanska kiselina	< 900	1,1
7.	3-metilpentanska kiselina (3-metilvalerijanska kiselina)	941	3,3
8.	benzaldehid	965	8,6
9.	fenilacetaldehid	1048	0,8
10.	*cis*-linalool oksid	1090	1,2
11.	*p*-cimenen	1095	2,2
12.	hotrienol	1106	1,0
13.	fenilacetonitril	1140	19,7
14.	aldehid jorgovana**	1173	0,9
15.	metil-fenilacetat	1179	0,8
16.	oktanska kiselina	1193	2,9
17.	*p*-ment-1-en-9-al (isomer I)**	1217	1,7
18.	*p*-ment-1-en-9-al (isomer II)**	1219	1,5
19.	etil-2-fenilacetat	1253	1,0
20.	feniloctena kiselina	1269	2,2

21.	nonanska kiselina	1273	2,2
22.	4-vinil-2-metoksifenol	1314	1,3
23.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	1354	7,9
24.	*trans*-β-damascenon	1388	7,2
25.	*cis*-jasmon	1399	1,2
26.	izopropilpseudokumen	1667	0,3
27.	benzil-benzoat	1762	1,2

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; -- spoj nije identificiran; **-točan izomer nije identificiran



Slika 9. Reprezentativni kromatogram ukupne ionske struje isparljivih spojeva meda *Coriandrum sativum* L. izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno DVB/CAR/PDMS; broj pika odgovara broju spoja u tablici 20.

Tablica 20. Udio isparljivih spojeva meda *Coriandrum sativum* L. izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno DVB/CAR/PDMS

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)
1.	dimetil-sulfid	<900	0,1
2.	etil-acetat	<900	0,1
3.	2-metilpropan-1-ol	<900	0,1
4.	3-metilbutan-1-ol (izoamil-alkohol)	<900	0,6
5.	dimetil-disulfid	<900	0,1
6.	oktan	<900	0,3
7.	alil-izotiocijanat	<900	0,6
8.	benzaldehid	965	0,2
9.	5-izopropenil-2-metil-2-viniltetrahidrofuran (*trans*-anhidrolinalool oksid)	994	2,5
10.	etil-heksanoat	1000	0,3
11.	oktanal	1004	7,8
12.	5-izopropenil-2-metil-2-viniltetrahidrofuran (*cis*-anhidrolinalool oksid)	1009	3,4
13.	limonen	1030	0,1
14.	fenilacetaldehid	1048	0,1
15.	*trans*-linalool oksid	1076	14,6
16.	oktan-1-ol	1080	1,0
17.	*cis*-linalool oksid	1090	3,3
18.	linalool	1101	6,1
19.	nonanal	1105	0,9
20.	hotrienol	1106	2,1
21.	α-izoforon	1124	0,2
22.	aldehid jorgovana (izomer I)**	1147	3,3
23.	aldehid jorgovana (izomer II)**	1155	5,3
24.	aldehid jorgovana (izomer III)**	1170	3,1
25.	etil-benzoat	1176	2,0
26.	eter kopra	1188	4,1
27.	*p*-ment-1-en-8-ol	1194	1,5
28.	etil-oktanoat	1198	3,3
29.	alkohol jorgovana**	1205	2,1
30.	*p*-ment-1-en-9-al (isomer I)**	1219	8,0
31.	*p*-ment-1-en-9-al (isomer II)**	1221	10,5

32.	etil-2-fenilacetat	1253	0,7
33.	etil-nonanoat	1298	1,4
34.	*p*-ment-1-en-9-ol	1306	2,4
35.	etil-dekanoat	1398	0,1
36.	fenil-izotiocijanat*	1475	0,2
37.	etil-tetradekanoat	1797	0,4
38.	etil-heksadekanoat	1997	0,1

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; -- spoj nije identificiran; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); **-točan izomer nije identificiran

Tablica 21. Udio isparljivih spojeva meda *Trifolium pratense* L. (5 uzoraka) izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno DVB/CAR/PDMS

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			Min.[b]	Max.[c]	Sv.[d]	SD.[e]
1.	oktan	< 900	1,6	10,0	4,40	4,85
2.	2-furankarboksaldehid	< 900	2,2	3,9	2,87	0,91
3.	benzaldehid	965	7,0	15,7	11,07	4,38
4.	fenilacetaldehid	1048	10,1	31,2	18,03	11,4
5.	*trans*-linalool oksid	1076	0,2	2,6	1,03	1,36
6.	nonanal	1105	2,1	9,1	6,77	4,04
7.	aldehid jorgovana (izomer I)**	1151	7,6	10,8	9,53	1,70
8.	aldehid jorgovana (izomer II)**	1159	16,1	21,4	19,27	2,80
9.	aldehid jorgovana (izomer III)**	1174	8,3	11,2	9,77	1,45
10.	oktanska kiselina	1193	0,7	2,9	1,63	1,14
11.	dekanal	1207	1,3	3,6	2,60	1,18
12.	nonanska kiselina	1273	4,1	5,8	5,03	0,86

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija; **-točan izomer nije identificiran

Tablica 22. Udio isparljivih spojeva meda *Satureja subspicata* Vis. (5 uzoraka) izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno DVB/CAR/PDMS

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			Min.[b]	Max.[c]	Sv.[d]	SD.[e]
1.	dimetil-disulfid	<900	2,1	7,1	4,23	2,58
2.	benzaldehid	965	22,7	25,7	23,80	1,65
3.	2-etilheksan-1-ol	1030	5,4	12,8	8,57	3,81
4.	fenilacetaldehid	1048	26,4	35,3	30,23	4,58
5.	*trans*-linalool oksid	1076	2,9	3,5	3,10	0,35
6.	*cis*-linalool oksid	1090	5,6	9,2	7,10	1,87
7.	linalool	1101	1,0	3,7	2,07	1,44
8.	nonanal	1105	0,5	3,2	1,77	1,36
9.	hotrienol	1106	4,2	8,5	5,83	2,33
10.	2-feniletanol	1116	0,2	2,3	1,17	1,06
11.	benzojeva kiselina	1162	0,5	1,7	1,00	0,62
12.	eugenol	1360	2,7	3,1	2,97	0,23

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija

Tablica 23. Udio isparljivih spojeva meda *Satureja montana* L. (8 uzoraka) izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno PDMS/DVB

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			Min.[b]	Max.[c]	Sv.[d]	SD.[e]
1.	pentanal	900	0,5	0,7	0,60	0,10
2.	1-(2-furanil)-etanon	914	0,5	0,7	0,60	0,10
3.	benzaldehid	965	0,5	2,0	1,35	0,64
4.	*trans*-linalool oksid	1076	0,0	4,2	2,50	2,04
5.	*cis*-linalool oksid	1090	3,4	7,7	4,79	2,01
6.	octena kiselina	1091	1,2	1,7	1,43	0,25
7.	linalool	1101	0,6	0,7	0,67	0,06
8.	hotrienol	1106	75,9	81,7	76,40	5,07
9.	2-feniletanol	1116	0,8	3,2	2,00	1,08
10.	α-izoforon	1124	1,3	1,4	1,37	0,05
11.	4-ketoizoforon	1147	0,9	1,0	0,97	0,06
12.	benzojeva kiselina	1162	0,0	0,2	0,10	0,10

13.	oktanska kiselina	1190	0,3	0,6	0,50	0,17
14.	3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol (terpendiol I)	1191	2,4	4,8	3,87	1,29
15.	dekanal	1207	0,0	0,9	0,37	0,47
16.	2-hidroksi-3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1-on	1228	0,8	0,9	0,83	0,06
17.	2-hidroksi-3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1,4-dion	1245	0,0	0,4	0,17	0,21
18.	nonanska kiselina	1273	0,1	0,6	0,43	0,29
19.	*trans*-β-damascenon	1388	0,0	0,4	0,21	0,17
20.	4-metoksibenzaldehid (*p*-anisaldehid)	1443	1,7	8,3	4,43	3,44

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija

Tablica 24. Udio isparljivih spojeva meda *Satureja hortensis* L. izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno DVB/CAR/PDMS

Redni broj	Spoj	RI [a]	Površina pika (%)
1.	dimetil-sulfid	< 900	0,1
2.	etil-acetat	< 900	0,2
3.	furfural	< 900	3,2
4.	benzaldehid	965	6,1
5.	fenilacetaldehid	1048	4,9
6.	*trans*-linalool oksid	1076	6,6
7.	*cis*-linalool oksid	1090	2,3
8.	*p*-cimenen	1095	2,8
9.	linalool	1101	3,6
10.	hotrienol	1106	22,8
11.	4-ketoizoforon	1147	1,9
12.	aldehid jorgovana (izomer I)**	1156	3,1
13.	aldehid jorgovana (izomer II)**	1170	5,5
14.	aldehid jorgovana (izomer III)**	1174	2,0
15.	etil-benzoat	1176	2,1
16.	*p*-ment-1-en-8-ol	1194	7,0
17.	safranal	1206	7,6
18.	alkohol jorgovana **	1220	1,5
19.	*p*-ment-1-en-9-al**	1222	2,8
20.	eugenol	1360	0,5

21.	*trans*-β-damascenon	1388	0,6

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; **-točan izomer nije identificiran

Tablica 25. Udio isparljivih spojeva meda *Coffea* spp. izoliranih HS-SPME metodom koristeći vlakno DVB/CAR/PDMS

Redni broj	Spoj	RI [a]	Površina pika (%)	
			Co1	Co2
1.	dimetil- sulfid	< 900	0,3	-
2.	2-furankarboksaldehid (furfural)	< 900	5,0	-
3.	α-pinen	941	1,7	1,3
4.	izobutil-izovalerat*	947	6,0	-
5.	benzaldehid	965	2,2	0,1
6.	β-pinen	984	2,8	-
7.	benzil-alkohol	1037	0,8	-
8.	fenilacetaldehid	1048	36,6	13,5
9.	*trans*-β-ocimen	1054	-	1,8
10.	*trans*-linalool oksid	1076	8,7	20,5
11.	*cis*-linalool oksid	1091	4,2	12,3
12.	α-terpinolen	1094	1,0	-
13.	nonanal	1102	1,0	0,8
14.	hotrienol	1106	4,0	42,5
15.	2-feniletanol	1116	2,0	0,2
16.	4-ketoizoforon	1147	1,2	-
17.	nerol oksid	1162	1,2	-
18.	epoksilinalool**	1178	2,7	-
19.	dekanal	1207	-	1,6
20.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	1354	6,8	1,0

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); **-točan izomer nije identificiran; -- spoj nije identificiran; Co1 i Co2-dva reprezentativna uzorka meda *Coffea* spp. različitog zemljopisnog podrijetla, Guatemala (Co1) i Kolumbija (Co2)

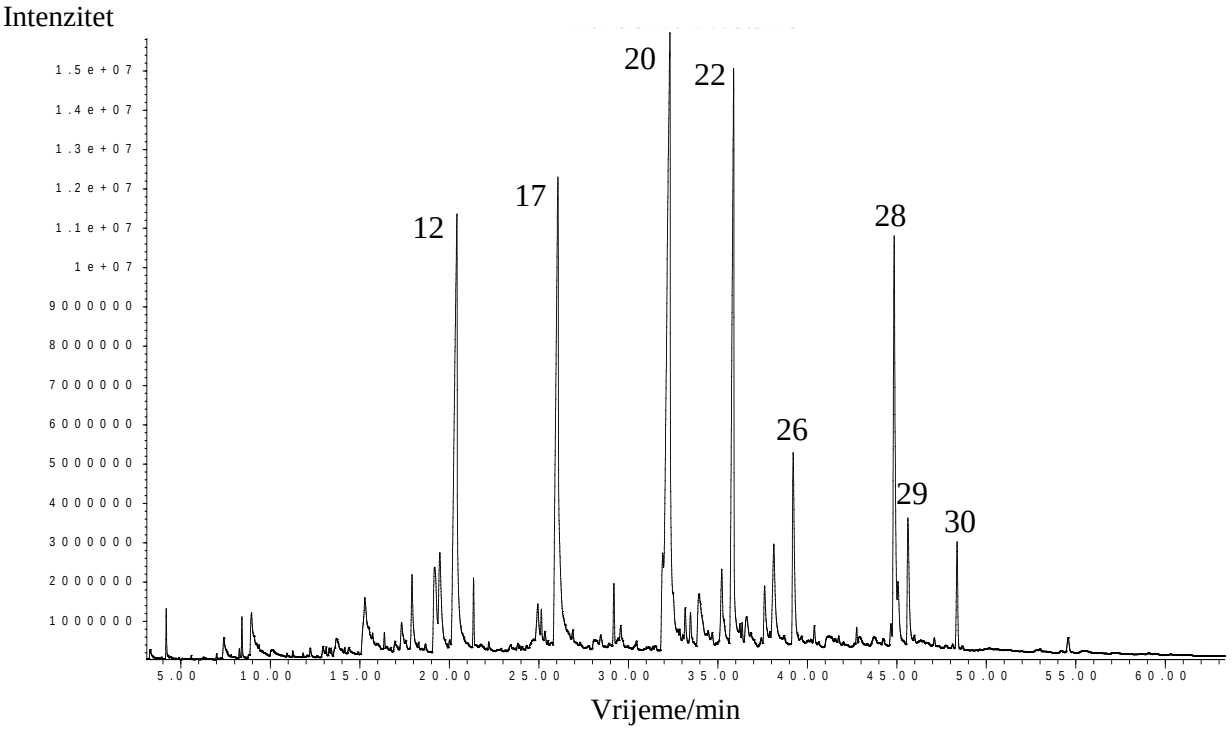
4.2. Rezultati GC-MS/FID analiza USE ekstrakata

Tablica 26. Udio isparljivih spojeva meda *Taraxacum officinale* Weber izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) sa otapalima pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*) i diklormetan

Redni broj	Spoj	RI [a]	Površina pika (%)	
			otapalo A	otapalo B
1.	3-metilpentanonitril	< 900	2,1	0,8
2.	3-metilbutanska kiselina (izovalerijanska kiselina)	< 900	2,0	1,8
3.	2-metilbutanska kiselina	< 900	0,8	1,7
4.	etilbenzen	< 900	1,4	-
5.	1,3-dimetilbenzen[**]	< 900	3,2	-
6.	1,2-dimetilbenzen[**]	< 900	0,5	-
7.	metil-2-okso-3-metilpentanoat[*]	935	4,3	1,2
8.	3-metilpentanska kiselina (3-metilvalerijanska kiselina)	941	7,9	1,7
9.	fenilacetonitril	1140	1,1	0,6
10.	benzojeva kiselina	1162	4,8	3,0
11.	5-hidroksimetilfurfural	1230	1,3	2,0
12.	feniloctena kiselina	1269	24,0	18,5
13.	4-vinil-2-metoksifenol	1314	0,6	0,6
14.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	1354	9,6	7,1
15.	tetradekan	1400	0,5	0,2
16.	pentadekan	1500	0,8	0,6
17.	4-hidroksibenzojeva kiselina (*p*-salicilna kiselina)	1522	1,3	-
18.	5-aminoindanon	1594	0,8	1,1
19.	heksadekan	1600	0,8	0,7
20.	3-okso-α-damaskon[*]	1642	1,0	1,2
21.	metil-siringat	1788	0,6	1,1
22.	4-hidroksicimetna kiselina (*p*-kumarinska kiselina)	1793	3,9	-
23.	4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)cikloheks-2-en-1-on (dehidrovomifoliol)	1795	7,5	19,3
24.	vomifoliol	1820	0,9	4,2
25.	kofein	1856	-	0,9
26.	heksadekan-1-ol	1882	1,2	1,5

27.	heksadekanska kiselina	1963	2,4	4,5
28.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	3,5	5,8
29.	oktadekan-1-ol	2084	0,9	0,6
30.	heneikosan	2100	0,5	2,3
31.	(*Z*)-oktadec-9-enska kiselina	2181	0,6	3,1
32.	dokosan	2200	-	3,6
33.	trikosan	2300	0,6	2,1

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; otapalo A-pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*); otapalo B-diklorometan; -- spoj nije identificiran; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); **-točan izomer nije identificiran



Slika 10. Reprezentativni kromatogram ukupne ionske struje isparljivih spojeva meda *Coriandrum sativum* L. izoliranih USE metodom; broj pika odgovara broju spoja u tablici 27.

Tablica 27. Udio isparljivih spojeva meda *Coriandrum sativum* L. izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) sa otapalima pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*) i diklormetan

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)	
			Otapalo A	Otapalo B
1.	furan-2-metanol	<900	-	0,1
2.	etilbenzen	<900	0,1	-
3.	1,4-dimetilbenzen[**]	<900	0,6	-
4.	*trans*-linalool oksid	1076	0,4	0,3
5.	metil furan-2-karboksilat	1084	-	1,0
6.	3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol (terpendiol I)	1191	-	0,2
7.	dodekan	1200	-	0,1
8.	dekanal	1207	-	0,1
9.	5-hidroksimetilfurfural	1230	-	2,5
10.	4-metoksibenzil-alkohol (anisil-alkohol)	1294	-	0,2
11.	(*E*)-2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-diol	1357	2,1	2,9
12.	(*Z*)-2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-diol	1374	15,7	13,2
13.	tetradekan	1400	0,6	0,7
14.	4-hidroksi-3-metoksibenzil-alkohol	1484	-	0,1
15.	3,4-dimetoksibenzaldehid (metil-vanilin)	1490	-	0,8
16.	pentadekan	1500	0,7	-
17.	3,4-dimetoksibenzil-alkohol (veratril-alkohol)	1521	5,6	13,9
18.	heksadekan	1600	0,7	0,7
19.	4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid	1675	-	1,8
20.	3,4,5-trimetoksibenzil-alkohol	1679	26,3	24,7
21.	heptadekan	1700	-	0,7
22.	metil-siringat	1788	21,6	11,7
23.	etil-tetradekanoat	1797	0,8	0,2
24.	oktadekan	1800	0,3	0,2
25.	vomifoliol	1820	0,9	-
26.	heksadekan-1-ol	1882	2,2	3,6
27.	etil-heksadekanoat	1997	0,5	0,2
28.	(Z)-oktadec-9-en-1-ol	2073	5,0	8,7
29.	oktadekan-1-ol	2084	2,1	2,4
30.	etil-(*Z*)-oktadec-9-enoat	2188	7,6	1,4

31.	trikosan	2300	1,5	0,3

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; otapalo A-pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*); otapalo B-diklorometan; [**]-točan izomer nije identificiran; -- spoj nije identificiran

Tablica 28. Udio isparljivih spojeva izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) meda *Trifolium pratense* L. (5 uzoraka) sa otapalom pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*)

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			Min.[b]	Max.[c]	Sv.[d]	SD.[e]
1.	dekan-1-ol	< 900	0,4	1,0	0,73	0,29
2.	(*E*)-okt-3-en-2-on[*]	< 900	0,1	0,3	0,26	0,10
3.	etilbenzen	< 900	1,0	2,5	1,83	0,80
4.	1,4-dimetilbenzen[**]	< 900	3,3	8,3	5,92	2,48
5.	1,3-dimetilbenzen[**]	< 900	0,7	1,8	1,18	0,54
6.	benzaldehid	965	0,1	0,1	0,12	0,02
7.	fenilacetaldehid	1048	0,1	0,4	0,27	0,15
8.	metil furan-2-karboksilat	1084	0,0	0,1	0,08	0,07
9.	3-hidroksi-2-metil-4*H*-piran-4-on (maltol)	1119	2,6	5,4	3,87	1,40
10.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on	1145	0,1	0,6	0,36	0,21
11.	benzojeva kiselina	1162	0,8	1,0	0,88	0,10
12.	3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol (terpendiol I)	1191	0,0	0,1	0,08	0,07
13.	5-hidroksimetilfurfural	1230	0,4	0,7	0,56	0,13
14.	feniloctena kiselina	1269	1,2	2,2	1,74	0,50
15.	benzen-1,4-diol (hidrokinon)	1278	0,4	1,1	0,77	0,34
16.	dimetil-ftalat	1460	0,7	0,8	0,72	0,04
17.	dodekan-1-ol	1466	0,8	1,5	1,12	0,37
18.	4-metil-2,6-di(1,1-dimetiletil)-fenol	1520	1,5	3,4	2,34	0,97
19.	4-hidroksibenzojeva kiselina (*p*-salicilna kiselina)	1558	1,1	2,6	1,91	0,77
20.	5-aminoindanon	1594	0,3	1,3	0,70	0,55
21.	tetradekan-1-ol	1676	0,4	1,0	0,67	0,29
22.	metil-siringat	1744	2,6	9,1	5,58	3,27
23.	4-hidroksicimetna kiselina (*p*-kumarinska kiselina)	1793	0,0	7,5	3,49	3,76
24.	vomifoliol	1820	2,4	3,0	2,75	0,31
25.	heksadekan-1-ol	1882	6,6	7,5	7,03	0,43

26.	nonadekan	1900	1,1	26,8	12,69	13,02
27.	heksadekanska kiselina	1963	4,6	4,8	4,72	0,11
28.	pinocembrin	2039	0,0	2,5	1,51	1,33
29.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	17,9	25,0	21,97	3,63
30.	oktadekan-1-ol	2084	5,4	7,5	6,32	1,07
31.	oktadekanska kiselina	2181	0,4	0,9	0,63	0,23

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa) [**]-točan izomer nije identificiran

Tablica 29. Udio isparljivih spojeva izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) meda *Trifolium pratense* L. (5 uzoraka) sa otapalom diklormetan

Redni broj	Spoj	RI	Površina pika (%)			
			Min. [b]	Max.[c]	Sv. [d]	SD. [e]
1.	nonan	900	0,0	0,1	0,08	0,07
2.	fenilacetaldehid	1048	0,0	0,2	0,11	0,11
3.	metil-2-furoat	1084	0,5	1,8	1,07	0,65
4.	undekan	1100	0,0	3,7	1,55	1,89
5.	3-hidroksi-2-metil-4*H*-piran-4-on (maltol)	1119	11,3	20,1	15,77	4,45
6.	benzojeva kiselina	1162	0,0	0,5	0,23	0,32
7.	3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol (terpendiol I)	1191	0,0	0,2	0,11	0,16
8.	5-hidroksimetilfurfural	1230	0,9	1,9	1,33	0,51
9.	feniloctena kiselina	1269	0,0	0,5	0,25	0,23
10.	4-vinil-2-metoksifenol	1314	0,5	1,5	1,00	0,51
11.	2,4,5-trimetilfenol[**]	1317	0,0	0,2	0,11	0,11
12.	tetradekan	1400	0,5	1,5	1,04	0,52
13.	dimetil-ftalat	1460	0,0	0,2	0,11	0,11
14.	dodekan-1-ol	1466	0,0	2,8	1,09	1,48
15.	4-metil-2,6-di(1,1-dimetiletil)-fenol	1520	0,0	1,5	0,65	0,74
16.	5-aminoindanon	1594	0,1	1,1	0,58	0,52
17.	heksadekan	1600	0,9	2,0	1,48	0,57
18.	siringaldehid	1662	0,0	0,9	0,43	0,45
19.	tetradekan-1-ol	1676	0,1	1,3	0,67	0,61

20.	heptadekan	1700	0,0	3,7	1,88	1,83
21.	metil-siringat	1744	5,4	15,3	10,31	4,97
22.	heksadekan-1-ol	1882	7,0	8,1	7,64	0,56
23.	nonadekan	1900	1,8	2,5	2,21	0,40
24.	heksadekanska kiselina	1963	0,5	6,3	2,93	3,01
25.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	17,7	35,1	26,96	8,77
26.	oktadekan-1-ol	2084	6,9	19,1	12,16	6,30
27.	dokosan	2200	1,0	2,3	1,76	0,65
28.	trikosan	2300	0,9	2,9	1,90	1,02

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija [**]-točan izomer nije identificiran

Tablica 30. Udio isparljivih spojeva izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) meda *Satureja subspicata* Vis. (5 uzoraka) sa otapalom pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*)

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			Min.[b]	Max.[c]	Sv.[d]	SD.[e]
1.	1,4-dimetilbenzen[**]	< 900	0,0	0,3	0,14	0,11
2.	1,3-dimetilbenzen[**]	< 900	0,0	0,2	0,08	0,08
3.	dekan	1000	0,0	0,1	0,04	0,06
4.	benzojeva kiselina	1162	0,5	4,7	2,22	2,21
5.	3,4,5-trimetilfenol[**]	1331	0,0	0,1	0,06	0,06
6.	eugenol	1360	0,0	0,1	0,06	0,06
7.	tetradekan	1400	0,0	0.1	0,06	0,06
8.	4-metil-2,6-di(1,1-dimetiletil)fenol	1520	0,2	0,5	0,31	0,13
9.	metil-4-metoksibenzoat	1527	0,0	1,1	0,43	0,60
10.	heksadekan	1600	0,0	0,6	0,18	0,27
11.	3,4,5-trimetoksibenzaldehid	1608	0,0	0,4	0,14	0,19
12.	siringaldehid	1662	2,1	11,1	7,30	3,96
13.	metil-3,4,5-trimetoksibenzoat[*]	1675	0,0	4,1	0,94	1,78
14.	metil-siringat	1744	32,3	56,1	46,68	10,82
15.	3,4,5-trimetoksibenzojeva kiselina[**]	1775	0,0	1,2	0,34	0,53
16.	siringinska kiselina	1840	0,0	1,4	0,72	1,02
17.	heksadekan-1-ol	1882	2,8	9,4	5,86	2,70
18.	heksadekanska kiselina	1963	1,0	9,4	3,94	3,35

19.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	6,7	27,7	14,27	9,33
20.	oktadecan-1-ol	2084	2,4	10,4	5,92	2,97
21.	heneikosan	2100	0,0	4,0	0,12	0,18
22.	oktadekanska kiselina	2178	0,0	0,9	0,22	0,36

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); **-točan izomer nije identificiran

Tablica 31. Udio isparljivih spojeva izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) meda *Satureja subspicata* Vis. (5 uzoraka) sa otapalom diklormetan

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			Min.[b]	Max.[c]	Sv.[d]	SD.[e]
1.	1,4-dimetilbenzen**	< 900	0,0	0,1	0,06	0,06
2.	benzojeva kiselina	1162	0,5	4,3	1,76	1,40
3.	2,4-dimetilbenzaldehid**	1178	0,0	0,1	0,04	0,05
4.	3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol	1191	0,0	0,1	0,06	0,06
5.	eugenol	1360	0,0	0,9	0,34	0,34
6.	tetradekan	1400	0,0	0,5	0,13	0,17
7.	β-kariofilen	1425	0,0	0,1	0,04	0,05
8.	4-metil-2,6-di(1,1-dimetiletil)fenol	1520	0,0	0,6	0,16	0,24
9.	heksadekan	1600	0,0	1,3	0,42	0,48
10.	3,4,5-trimetoksibenzaldehid	1608	0,0	0,7	0,20	0,31
11.	siringaldehid	1662	4,0	14,1	8,80	3,27
12.	metil-3,4,5-trimetoksibenzoat*	1675	0,0	0,5	0,22	0,24
13.	3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzil-alkohol*	1721	0,0	1,8	0,73	0,88
14.	metil-siringat	1744	41,7	60,1	52,98	7,66
15.	3,4,5-trimetoksibenzojeva kiselina**	1775	0,0	2,9	0,88	1,18
16.	siringinska kiselina	1840	0,0	4,1	1,15	1,63
17.	heksadekan-1-ol	1882	0,6	5,6	3,28	1,66
18.	heksadekanska kiselina	1963	1,0	12,7	3,69	4,14
19.	eikosan	2000	0,0	1,3	0,32	0,54
20.	oktadekanal	2024	0,0	1,0	0,35	0,43
21.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	5,9	18,6	10,82	4,41
22.	oktadekan-1-ol	2084	2,1	6,9	4,42	1,57

23.	heneikosan	2100	0,0	5,5	1,40	2,11
24.	oktadekanska kiselina	2178	0,0	1,0	0,23	0,41
25.	(*Z*)-oktadec-9-enska kiselina	2181	0,0	0,9	0,22	0,36
26.	dokosan	2200	0,0	0,7	0,23	0,29
27.	trikosan	2300	0,0	0,9	0,27	0,36

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija; -- spoj nije identificiran; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); **-točan izomer nije identificiran

Tablica 32. Udio isparljivih spojeva izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) meda *Satureja montana* L. (8 uzoraka) sa otapalom pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*)

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			Min.[b]	Max.[c]	Sv.[d]	SD.[e]
1.	pentanska kiselina (valerijanska kiselina)	899	0,0	0,1	0,01	0,04
2.	1,3-dimetilbenzen**	900	0,0	0,1	0,01	0,04
3.	nonan	900	0,0	0,3	0,14	0,13
4.	benzaldehid	965	0,0	0,1	0,04	0,05
5.	heksanska kiselina	974	0,0	0,1	0,03	0,05
6.	benzil-alkohol	1037	0,0	0,3	0,07	0,11
7.	dihidro-3-hidroksi-4,4-dimetil2(3*H*)-furanon (pantolakton)	1044	0,0	0,1	0,03	0,05
8.	fenilacetaldehid	1048	0,0	0,3	0,06	0,11
9.	2-feniletanol	1116	0,0	0,7	0,13	0,26
10.	4-ketoizoforon	1147	0,0	0,2	0,03	0,08
11.	benzojeva kiselina	1162	0,0	10,3	5,61	3,60
12.	3,5-dimetilfenol**	1181	0,0	0,1	0,01	0,04
13.	dodekan	1200	0,0	0,1	0,01	0,04
14.	1,2-benzendiol	1219	0,0	1,9	0,46	0,75
15.	feniloctena kiselina	1269	0,0	1,1	0,27	0,45
16.	nonanska kiselina	1273	0,0	0,1	0,03	0,05
17.	1-metoksi-4-propilbenzen (dihidroanetol)	1308	0,0	0,3	0,07	0,13
18.	2-hidroksibenzojeva kiselina (salicilna kiselina)	1311	0,0	0,2	0,03	0,08
19.	3,4,5-trimetoksibenzaldehid	1317	0,0	0,2	0,07	0,10
20.	3,4,5-trimetilfenol**	1336	0,0	0,1	0,01	0,04

21.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	1354	0,0	0,3	0,07	0,11
22.	dekanska kiselina	1370	0,0	0,1	0,01	0,04
23.	4-hidroksibenzaldehid	1393	0,0	0,2	0,03	0,08
24.	tetradekan	1400	0,0	0,3	0,04	0,11
25.	4-metoksibenzojeva kiselina (*p*-anisinska kiselina)	1419	0,0	0,2	0,04	0,08
26.	4-hidroksibenzil-alkohol	1426	0,0	0,6	0,11	0,22
27.	metil-4-hidroksibenzoat	1466	0,0	0,1	0,01	0,04
28.	2,6-di-(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol	1514	0,0	0,2	0,10	0,08
29.	4-hidroksibenzojeva kiselina (*p*-salicilna kiselina)	1522	0,0	2,4	0,83	1,08
30.	metil-4-metoksibenzoat	1546	0,0	1,7	0,40	0,62
31.	4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina (vanilinska kiselina)	1556	0,0	0,9	0,21	0,38
32.	4-hidroksifeniloctena kiselina	1563	0,0	1,4	0,20	0,53
33.	heksadekan	1600	0,0	0,2	0,03	0,08
34.	metil-*p*-metoksimandelat	1601	0,0	4,0	0,76	1,46
35.	siringaldehid	1662	2,2	4,1	18,93	18,86
36.	metil-siringat	1774	36,2	72,8	53,77	14,59
37.	siringinska kiselina	1840	0,0	2,2	0,56	0,77
38.	heksadekan-1-ol	1882	0,2	3,7	1,44	1,28
39.	heksadekanska kiselina	1963	0,0	1,0	0,61	0,37
40.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	0,0	9,6	3,39	3,67
41.	oktadekan-1-ol	2084	0,0	4,0	1,40	1,70
42.	(*Z*)-oktadec-9-enska kiselina	2181	0,0	1,8	0,29	0,67
43.	dokosan	2200	0,0	5,1	1,19	1,93
44.	trikosan	2300	0,2	1,9	0,69	0,59

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; [b] Min.-minimalna vrijednost; [c] Max.-maksimalna vrijednost; [d] Sv.-srednja vrijednost; [e] SD.-standardna devijacija;**-točan izomer nije identificiran

Tablica 33. Udio isparljivih spojeva izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) meda *Satureja hortensis* L. sa otapalom pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*)

Redni broj	Spoj	RI	Površina pika (%)
1.	etilbenzen	< 900	0,1
2.	1,3-dimetilbenzen**	< 900	0,3
3.	dihidro-3-hidroksi-4,4-dimetil2(3*H*)-furanon (pantolakton)	1044	0,3
4.	fenilacetaldehid	1048	0,4
5.	*trans*-linalool oksid	1076	0,1
6.	metil-2-furoat	1084	0,3
7.	1-(2-furil)-2-hidroksietanon	1087	0,4
8.	hotrienol	1106	0,3
9.	2-feniletanol	1116	0,8
10.	4-ketoizoforon	1147	0,1
11.	3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol (terpendiol I)	1191	0,6
12.	benzojeva kiselina	1162	2,4
13.	5-hidroksimetilfurfural	1230	1,7
14.	2,3-dihidrobenzofuran	1245	1,0
15.	4-vinil-2-metoksifenol	1314	0,6
16.	8-acetoksilinalool*	1358	1,7
17.	eugenol	1360	0,3
18.	2-(4-metoksifenil)etanol	1377	1,0
19.	tetradekan	1400	0,3
20.	2-etil-3-metoksi-ciklopent-2-en-1-on	1425	0,3
21.	3,4-dimetil-4-hidroksinaftalen-1(4*H*)-on*	1430	0,6
22.	2,3-dihidro-3,3,5,6-tetrametil-1*H*-inden-1-on*	1449	0,3
23.	metil-vanilat	1527	0,4
24.	4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina (vanilinska kiselina)	1556	1,4
25.	heksadekan	1600	0,3
26.	metil-siringat	1774	54,7
27.	4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-okso-1-butenil) cikloheks-2-en-1-on	1808	1,9
28.	heksadekan-1-ol	1882	2,4
29.	heksadekanska kiselina	1963	1,3
30.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	3,6

31.	oktadekan-1-ol	2084	2,1
32.	heneikosan	2100	5,8
33.	etil-(*Z*)-oktadec-9-enoat	2188	1,0
34.	trikosan	2300	0,8

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); **-točan izomer nije identificiran

Tablica 34. Udio isparljivih spojeva izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) meda *Coffea* spp. sa otapalima pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*) i diklormetan

Redni broj	Spoj	RI[a]	Površina pika (%)			
			otapalo A		otapalo B	
			Co1	Co2	Co1	Co2
1.	1,4-ksilen	< 900	0,2	0,1	-	-
2.	izobutil-izovalerat*	947	0,6	-	0,1	-
3.	hotrienol	1106	-	0,1	-	-
4.	3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol (terpendiol I)	1191	0,4	-	0,1	-
5.	5-hidroksimetilfurfural	1230	-		0,1	
6.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	1354	4,3	-	1,2	-
7.	3,5,5-trimetil-4-(3-okso-but-1-enil)cikloheks-2-en-1-on (3-okso-α-ionon)	1663	2,3	-	-	-
8.	4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-okso-but-1-enil)-cikloheks-2-en-1-on	1808	3,0	1,3	0,8	1,1
9.	kofein	1856	59,9	51,0	89,1	90,5
10.	heksadekan-1-ol	1882	6,3	3,6	-	-
11.	teobromin	1925	1,1	1,2	2,9	2,2
12.	heksadekanska kiselina	1963	0,2	1,1	-	-
13.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2060	12,3	25,1	3,3	3,3
14.	oktadekan-1-ol	2084	4,0	7,7	1,0	1,1

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; otapalo A-pentan:dietil-eter, 1:2 (*v*/*v*); otapalo B-diklorometan; -- spoj nije identificiran; *-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektra masa); Co1 i Co2-dva reprezentativna uzorka meda *Coffea* spp. različitog zemljopisnog podrijetla, Guatemala (Co1) i Kolumbija (Co2)

4.3. Rezultati GC-MS/FID analiza SPE ekstrakta

Tablica 35. Udio isparljivih spojeva izoliranih ekstrakcijom meda *Taraxacum officinale* Weber na krutoj fazi (SPE)

Redni broj	Spoj	RI [a]	Površina pika (%)
1.	3-metilpentanonitril	< 900	1,0
2.	3-metilbutanska kiselina (izovalerijanska kiselina)	< 900	1,4
3.	2-metilbutanska kiselina	< 900	1,4
4.	1,3-dimetilbenzen**	< 900	0,2
5.	nonan	900	0,2
6.	3-metilpentanska kiselina (3-metilvalerijanska kiselina)	941	2,2
7.	dekan	1000	0,4
8.	1,2,3-trimetilbenzen (hemimeliten)	1002	0,5
9.	fenilacetonitril	1140	0,6
10.	benzojeva kiselina	1162	3,2
11.	2,3-dihidrobenzofuran (kumaran)	1245	0,5
12.	feniloctena kiselina	1269	19,1
13.	4-vinil-2-metoksifenol	1314	0,8
14.	3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on	1354	7,9
15.	4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina (vanilinska kiselina)	1556	0,7
16.	5-aminoindanon	1594	1,8
17.	metil-siringat	1774	1,1
18.	4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-cikloheks-2-en-1-on (dehidrovomifoliol)	1795	19,0
19.	vomifoliol	1820	3,6
20.	heksadekan-1-ol	1882	1,9
21.	heksadekanska kiselina	1963	3,0
22.	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2073	5,5
23.	heneikosan	2100	2,0
24.	(*Z*)-oktadec-9-enska kiselina	2181	3,8
25.	dokosan	2200	9,6
26.	trikosan	2300	3,1

[a] RI-retencijski indeksi na HP-5MS koloni; **-točan izomer nije identificiran

4.4. Rezultati HPLC-DAD analiza

Tablica 36. Spojevi određeni u medu *Satureja subspicata* Vis. (5 uzoraka) ciljanom HPLC-DAD analizom

Redni broj	Spoj	Koncentracija (mg kg^{-1})			
		Min.[a]	Max.[b]	Sv.[c]	SD.[d]
1.	kojična kiselina	11,7	15,4	13,7	1,2
2.	tirozin	17,2	59,0	35,6	14,8
3.	fenilalanin	52,6	330,3	167,8	80,8
4.	4-hidroksifeniloctena kiselina	nd	36,1	21,3	8,1
5.	benzojeva kiselina	14,7	48,7	36,4	10,5
6.	metil-siringat	92,1	144,4	114,1	17,8

[a] Min.-minimalna vrijednost; [b] Max.-maksimalna vrijednost; [c] Sv.-srednja vrijednost; [d] SD.-standardna devijacija; nd-spoj nije detektiran

Tablica 37. Siringil-derivati (siringinska kiselina i metil-siringat) određeni u medu *Satureja montana* L. (8 uzoraka) ciljanom HPLC-DAD analizom

Redni broj	Spoj	Koncentracija (mg kg^{-1})			
		Min.[a]	Max.[b]	Sv.[c]	SD.[d]
1.	siringinska kiselina	0,11	1,70	0,92	0,61
2.	metil-siringat	7,10	39,60	27,98	12,95

[a] Min.-minimalna vrijednost; [b] Max.-maksimalna vrijednost; [c] Sv.-srednja vrijednost; [d] SD.-standardna devijacija

Tablica 38. Spojevi određeni u medu *Satureja hortensis* L. ciljanom HPLC-DAD analizom

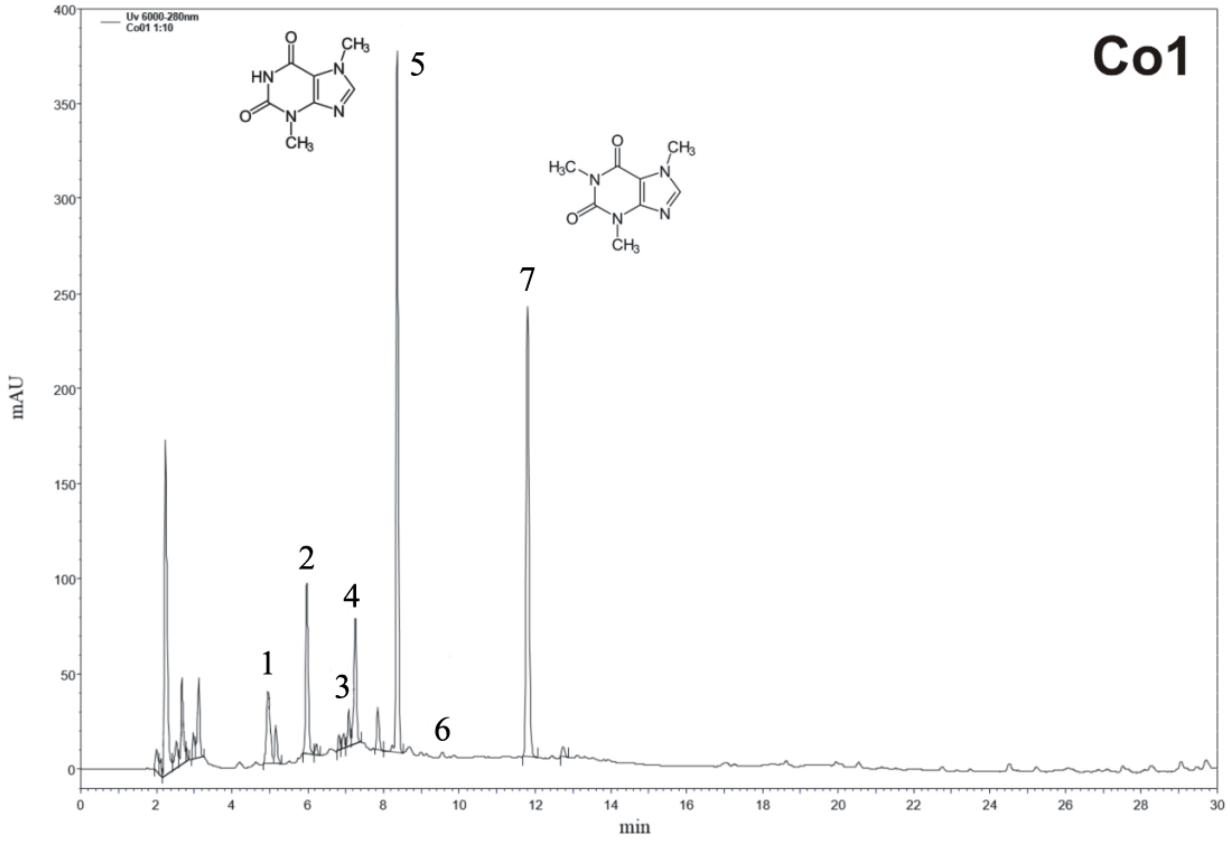
Redni broj	Spoj	Koncentracija (mg kg^{-1})	
		Sv.[a]	SD.[b]
1.	tirozin	140,4	6,2
2.	fenilalanin	282,0	12,5
3.	5-hidroksimetilfurfural	7,2	0,4
4.	metil-siringat	39,32	1,1

[a] Sv.-srednja vrijednost; [b] SD.-standardna devijacija

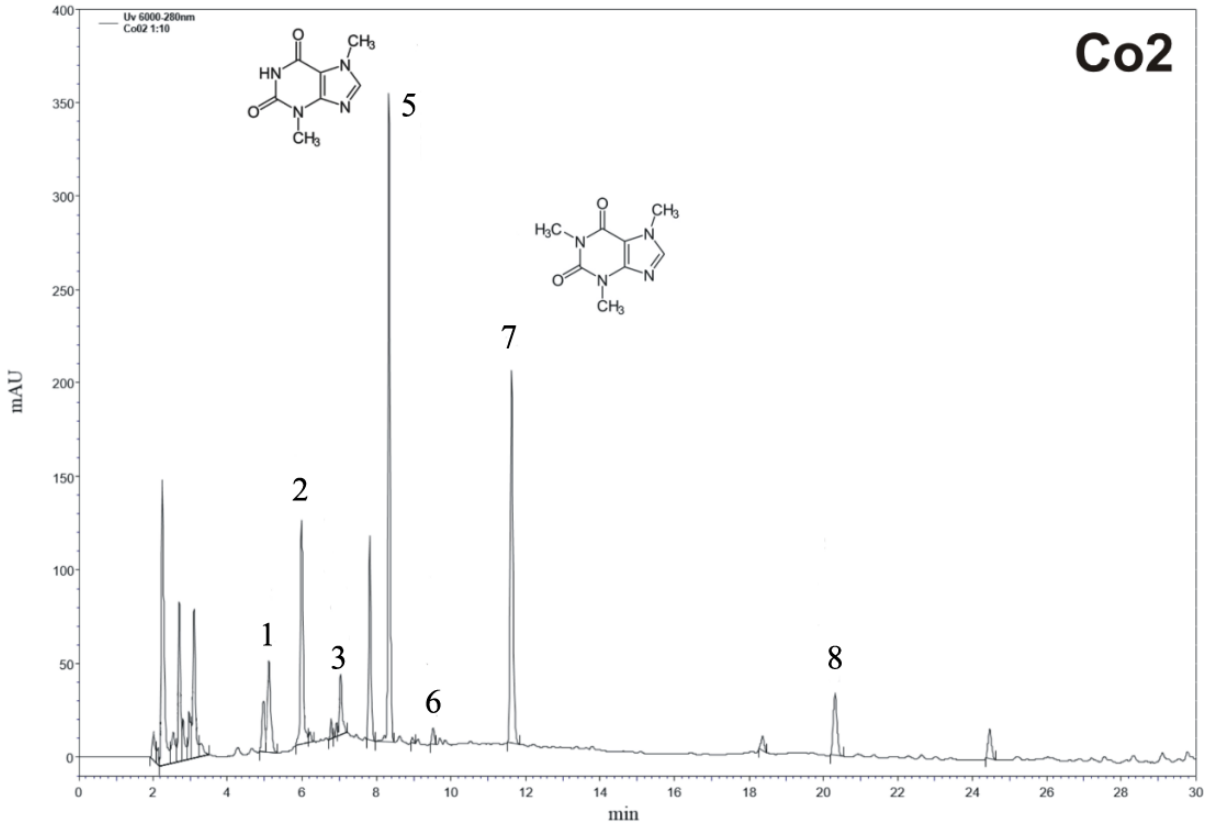
Tablica 39. Spojevi određeni u medu *Coffea* spp. ciljanom HPLC-DAD analizom

Redni broj	Spoj	Koncentracija (mg kg^{-1})			
		Co1		Co2	
		Sv.[a]	SD.[b]	Sv.[a]	SD.[b]
1.	kojična kiselina	8,87	0,53	20,30	1,61
2.	tirozin	359,43	25,16	452,00	28,64
3.	fenilalanin	363,49	22,69	691,91	50,04
4.	5-hidroksimetilfurfural	7,95	0,52	nd	
5.	teobromin	93,11	4,40	85,30	3,88
6.	teofilin	tr		1,43	0,09
7.	kofein	83,59	5,96	67,25	4,71
8.	lumikrom	nd		22,42	1,97

[a] Sv.-srednja vrijednost; [b] SD.-standardna devijacija; nd-spoj nije detektiran; tr-spoj prisutan u tragovima; Co1 i Co2-dva reprezentativna uzorka meda *Coffea* spp. različitog zemljopisnog podrijetla, Guatemala (Co1) i Kolumbija (Co2)



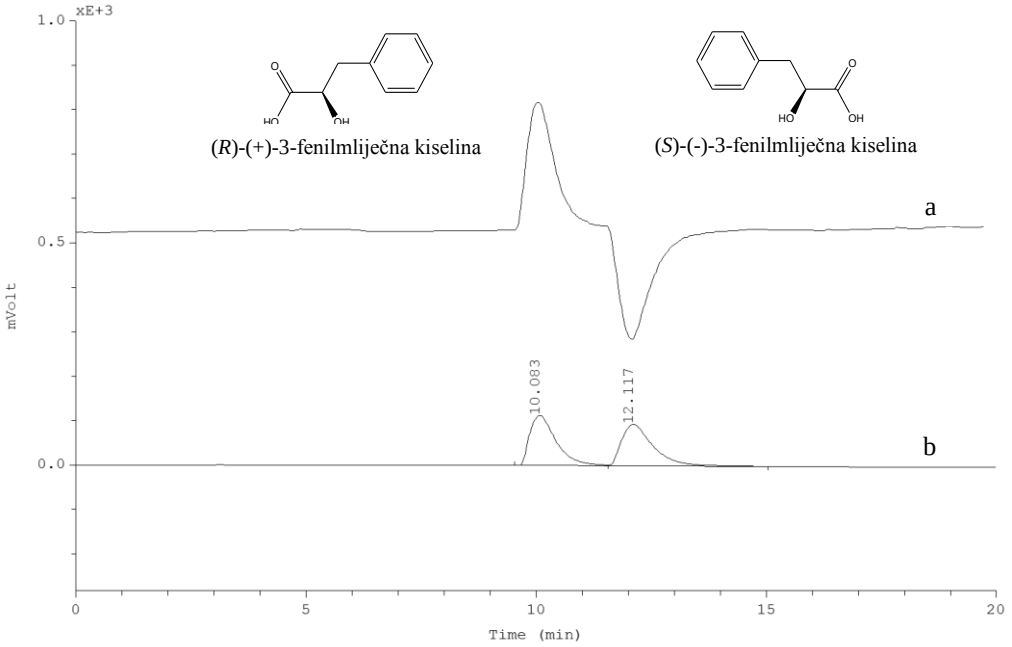
Slika 11. Reprezentativni HPLC-DAD kromatogram uzorka meda *Coffea* spp. (Co1) snimljen pri 280 nm; broj pika odgovara broju spoja u tablici 39.



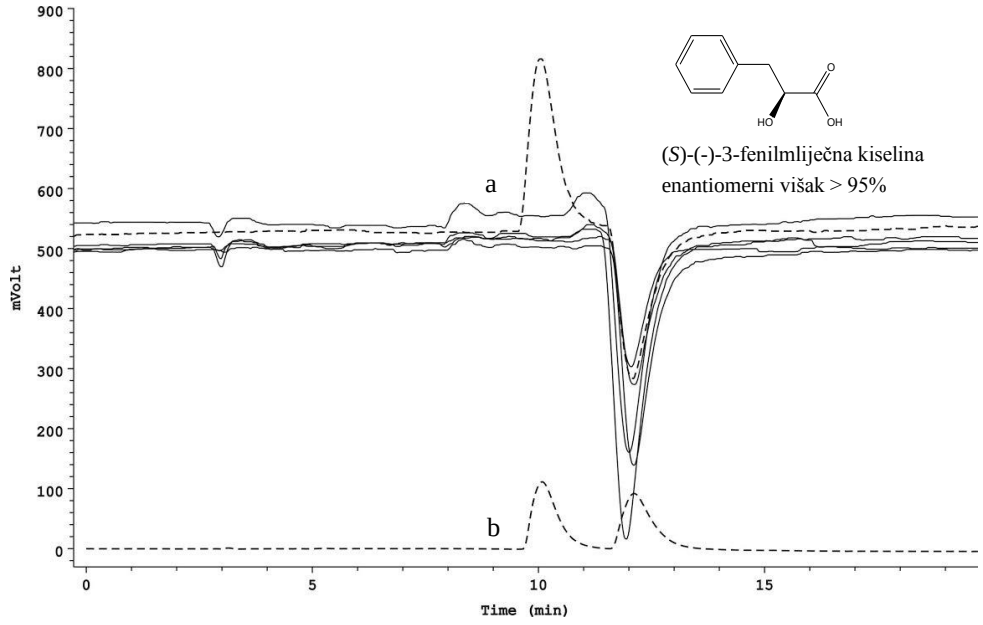
Slika 12. Reprezentativni HPLC-DAD kromatogram uzorka meda *Coffea* spp. (Co2) snimljen pri 280 nm; broj pika odgovara broju spoja u tablici 39.

4.5. Rezultati enantioselektivne analize

Kromatogrami kiralne analize standarda (±)-3-fenilmliječne kiseline dobiveni primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije normalnih faza na kiralnoj koloni Chirallica PST-4 su prikazani na slikama 13 i 14. Na slici 14 su prikazani kromatogrami kiralne analize ekstrakata meda *Galactites tomentosa* Moench. (5 uzoraka) primjenom kolone Chirallica PST-4 i polarimetrijskog detektora.



Slika 13. Kromatogrami kiralne analize (±)-3-fenilmliječne kiseline primjenom OR (a) i UV (b) detektora



Slika 14. Kromatogrami kiralne analize ekstrakata meda (pune linije) primjenom polarimetrijskog detektora (a). Kromatogrami kiralne analize standarda (±)-3-fenilmliječne kiseline (isprekidane linije) primjenom OR (a) i UV (b) detektora.

5. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja je odrediti kemijske profile i ciljane organske spojeve 8 različitih uniflornih vrsta meda (*Taraxacum officinale* Weber, *Coriandrum sativum* L., *Trifolium pratense* L., *Satureja subspicata* Vis., *Satureja montana* L., *Satureja hortensis* L., *Coffea* spp. i *Galactites tomentosa* Moench.) te identificirati potencijalne biomarkere botaničkog podrijetla. Uzorci su obrađeni komplementarnim preparativnim metodama u cilju dobivanja opsežnih kemijskih profila isparljivih i poluisparljivih spojeva i to mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), ultrazvučnom ekstrakcijom otapalima različite polarnosti (USE) te ekstrakcijom na krutoj fazi (SPE). Svi dobiveni ekstrakti isparljivih i poluisparljivih spojeva su analizirani primjenom GC-MS/FID tehnike. SPE metoda je korištena samo za izolaciju isparljivih spojeva meda *Taraxacum officinale* Weber. GC-MS/FID analizom SPE ekstrakta i diklormetanskog ekstrakta meda *Taraxacum officinale* Weber dobiveni su kvalitativno i kvantitativno veoma slični kromatografski profili. Stoga, za ekstrakciju drugih vrsta meda nije primjenjena SPE metoda (budući je primijenjena ekstrakcija diklormetanom). Na odabranim uzorcima je primijenjena HPLC analiza (*Satureja subspicata* Vis., *Satureja montana* L., *Satureja hortensis* L., *Coffea* spp.) te enantioselektivna HPLC analiza (*Galactites tomentosa* Moench.).

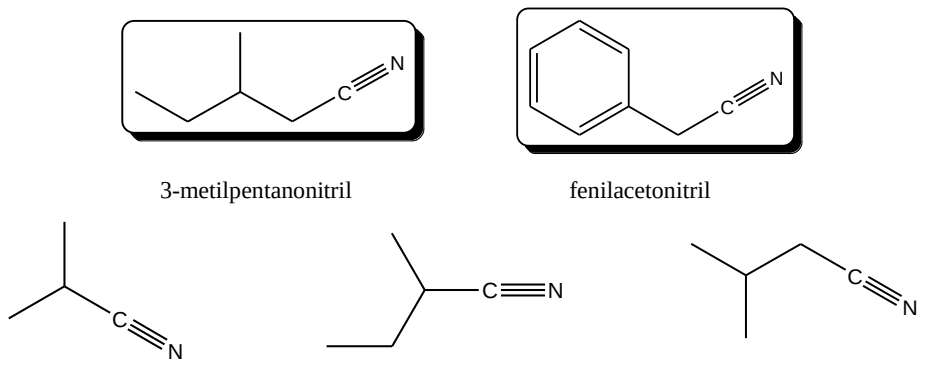
5.1. Isparljivi spojevi vršnih para izolirani HS-SPME metodom

Na osnovu prethodnih istraživanja, za izolaciju vršnih para uzoraka SPME metodom odabrana su dva vlakna sa ovojnicama DVB/CARB/PDMS i PDMS/DVB, a u radu su prikazani samo rezultati analize na vlaknu pomoću kojeg je izoliran veći broj isparljivih spojeva.

5.1.1. Vršne pare meda *Taraxacum officinale* Weber

Glavni spojevi vršnih para meda *Taraxacum officinale* Weber (tablica 19), izolirani upotrebom DVB/CARB/PDMS vlakna su nitrili (slika 15), među kojima su najzastupljeniji 3-metilpentanonitril (20,5%) i fenilacetonitril (19,7%). U manjem postotku identificirani su 2-metilpropanonitril, 2-metilbutanonitril i 3-metilbutanonitril. Piasenzotto i suradnici (2003) navode prisustvo nitrila (u rasponu od 0,29 do 2,16 mg kg^{-1}) karakterističnim obilježjem profila vršnih para meda od maslačka [103]. 2-Metilpropanonitril, 2-metilbutanonitril, 3-metilbutanonitril, 2-butenonitril (točan izomer nije identificiran), 3-butenonitril i 3-metilpentanonitril su prethodno identificirani u *Taraxacum* vrstama meda [210], što je u skladu

sa dobivenim rezultatima (tablica 19). Nitrili su, u niskim koncentracijama identificirani (uvjetno) i u medu uljane repice (2-metilpropanonitril) [47], timijana (fenilacetonitril) [108], ružmarina (3-metilbutanonitril i fenilacetonitril) [97], japanske mušmule (nekoliko kratkolančanih nitrila) [112], te u medu pamuka (neril- i geranil-nitrili) [89,210]. Spojevi sa dušikom, poput nitrila, tiocijanata i izotiocijanata, su poznati produkti hidrolize glukozinolata prisutnih u biljkama porodice *Brassicacea*e [211]. Naime, melisopalinološkom analizom uzorka meda od maslačka, osim peludi *T. officinale* (*Cichoriaceae*) je identificiran i pelud biljaka iz porodice *Brassicaceace,* koji zajedno sa peludom *Salix* vrsta predstavlja glavni prateći pelud. Zanimljivo je spomenuti da je doprinos nektara biljnih vrsta iz porodice *Brassicaceae* predložen kao izvor nitrila u *Taraxacum* vrstama meda [210]. Glukozinolati su prvi put u sastavu meda identificirani u *Diplotaxis tenuifolia* (L.) (*Brassicaceae*) vrsti meda [178].



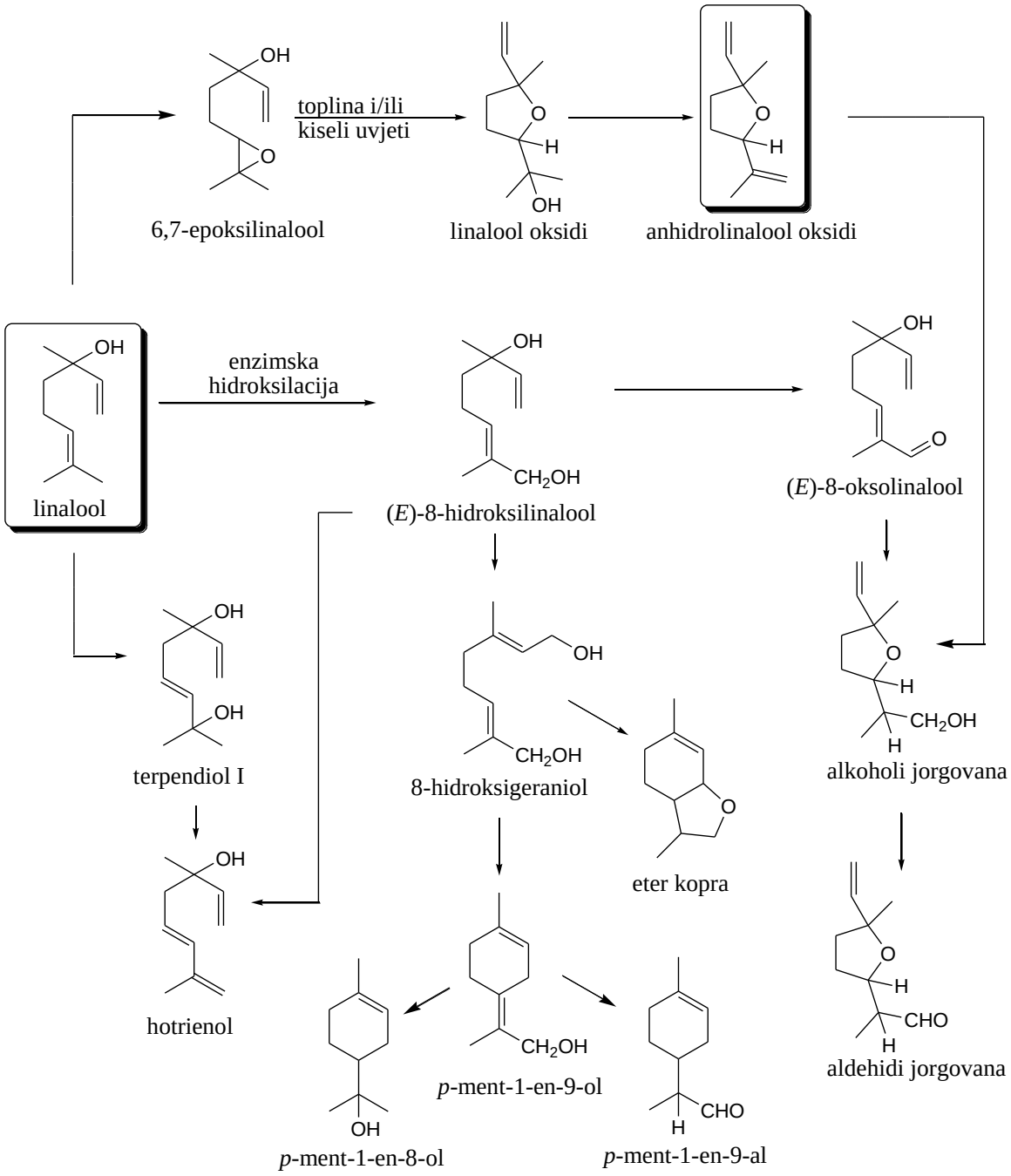
Slika 15. Nitrili prisutni u vršnim parama meda *Taraxacum officinale* Weber

Osim nitrila, u vršnim parama *Taraxacum officinale* Weber meda pronađen je visok postotak 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-ona (7,9%). Iako navedeni hidroksiketon doprinosi aromi meda, a njegovo prisustvo je ograničeno na određene vrste meda [69,80,84,94,114,120], primjerice med od timijana [108], ipak ne može jednoznačno ukazati na određeni botanički izvor. Nadalje, u vršnim parama su pronađene i niže alifatske kiseline: 3-metilbutanska kiselina (1,3%), 2-metilbutanska kiselina (1,1%) i 3-metilpentanska kiselina (3,3%). U ranijem istraživanju Piasenzotto i suradnici (2003) nisu identificirali navedene kiseline GC-MS analizom vršnih para meda od maslačka nakon ekstrakcije na PDMS vlaknu [103]. 3-Metilbutanska kiselina i 3-metilpentanska kiselina su, u manjem postotku (0,7-1,6% i 1,3-4,9%), pronađene u vršnim parama *Salix* spp. meda [102]. 3-Metilbutanska kiselina je glavni spoj identificiran u vršnim parama meda od heljde [172]. Nadalje, identificiran je norizoprenoid

trans-ß-damascenon (7,2%), koji je prethodno pronađen u vršnim parama meda od maslačka [103]. Fenilacetaldehid (0,8%) i benzaldehid (8,6%) su uobičajeni spojevi prisutni u medu, a u vršnim parama *Salix* spp. meda su identificirani kao glavni spojevi [112]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, Z. Marijanović, M. Kranjac i A. Radonić, 2015. [212].

5.1.2. Vršne pare meda *Coriandrum sativum* L.

Prema rezultatima analize (tablica 20), glavni spojevi vršnih para *Coriandrum sativum* L. meda su derivati linaloola među kojima je najzastupljeniji *trans*-linalool oksid (14,6%). U uzorku je identificiran i *cis*-linalool oksid (3,3%) te sam linalool (6,1%). Od drugih derivata linaloola identificirani su izomeri aldehida i alkohola jorgovana (ukupno 13,8%), *trans*- i *cis*-anhidrolinalool oksidi (ukupno 5,9%). Drugi identificirani spojevi, biogenetski srodni linaloolu, su dva dijastereomera *p*-ment-1-en-9-ala (8,0%; 10,5%), eter kopra (3,7%) te spojevi zastupljeni u manjem postotku *p*-ment-1-en-9-ol (2,4%) i *p*-ment-1-en-8-ol (1,5%). Dva izomera anhidrolinalool oksida su identificirana samo u vršnim parama meda citrusa [213]. *p*-Ment-1-en-9-al je pronađen u medu od japanskog ruja [214], medu od agruma [213] te u različitim vrstama meda sa Sicilije [101]. U literaturi je eter kopra istaknut kao važan spoj kemijskih profila meda od lipe [85] i agruma [213]. U vršnim parama su, uz oktanal (7,8%), identificirani i oktan-1-ol (1,0%) te etil-oktanoat (3,3%). Oktanal je prethodno pronađen u medu od agruma [213] te medu dobivenom iz vrsta roda *Prosopis* [215]. Također je identificirano nekoliko estera male molekulske mase: etil-acetat, etil-heksanoat, etil-benzoat, etil-fenilacetat, etil-nonanoat i etil-dekanoat. U istraživanju Cajke i suradnika (2009), niskomolekularni aldehidi i esteri su upotrijebljeni za razlikovanje meda sa Korzike od ostalih europskih vrsta meda [216]. Dva estera, etil-tetradekanoat (0,4%) i etil-heksadekanoat (0,1%) su u vršnim parama prisutni u manjim postotcima, vjerojatno zbog veće molekulske mase i manje isparljivosti. Zanimljivo je spomenuti da su uobičajeni spojevi meda, poput fenilacetaldehida i benzil-alkohola u vršnim parama prisutni u iznimno niskim koncentracijama. Identificirani alil- i fenil-izotiocijanati mogu nastati degradacijom glukozinolata porijeklom iz drugih biljnih vrsta. Glukozinolati su identificirani u sastavu meda *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. [178], a pregledom literature nisu pronađeni među isparljivim spojevima biljke *Coriandrum sativum* L. što ide u prilog navedoj pretpostavci [217,218].



Slika 16. Shematski prikaz biosinteze derivata linaloola (preuzeto i prilagođeno iz Jerković i sur., 2013.) [219]

Na slici 16. shematski su prikazani biogenetski odnosi derivata linaloola. Toplina i kiseli uvjeti unutar košnice pogoduju odvijanju oksidativne degradacije linaloola [213]. Linalool, spoj cvjetnog mirisa, je glavni spoj eteričnog ulja ploda korijandra [217]. Glavni isparljivi spojevi stabljike/lišća korijandra su dekanal, (*E*)-dek-2-enal, (*E*)-undek-2-enal i dodek-2-enal i (*E*)-tetradek-2-enal [217]. Istraživanja biogeneze spojeva jorgovana pokazuju da se aldehidi

jorgovana izvode iz linaloola, preko (*E*)-8-hidroksilinaloola i (*E*)-8-oksolinaloola (slika 16) [213]. Eter kopra, *p*-ment-1-en-9-ol i *p*-ment-1-en-9-al se izvode preko (*E*)-8-hidroksilinaloola i 8-hidroksigeraniola nastalog alilnom pregradnjom [213]. Epoksidacijom linaloola nastaje 6,7-epoksilinalool, koji podliježe daljnim reakcijama pri čemu nastaju izomeri furanoidnih linalool oksida te anhidrolinalool oksida. Hotrienol može nastati iz odgovarajućih (*E*)/(*Z*)-izomera terpenskog diola (2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-diol) [213] pronađenih u ekstraktima.

Analiza „meda“ dobivenog hranjenjem pčela ugljikohidratnim sirupom obogaćenim linaloolom otkriva da je nastanak linalool oksida kao i terpendiola I vjerojatno kataliziran enzimima koje izlučuju pčele. Međutim, aldehidi jorgovana, *cis*- i *trans*-anhidrolinalool oksidi, (*E*)-8-oksolinalool i (*Z*)-8-hidroksilinalool nisu identificirani u tako dobivenom „medu“, što ukazuje da su za njihovu biokonverziju potrebni enzimi iz biljaka [220]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, M. Obradović, P. M. Kuś i M. Šarolić, 2013. [219].

5.1.3. Vršne pare meda *Trifolium pratense* L.

U kemijskom profilu vršnih para meda *Trifolium pratense* L. identificirano je 12 spojeva (tablica 21), od kojih su najzastupljeniji izomeri aldehida jorgovana. Zastupljenost pojedinačnog izomera je u rasponu od 7,6% do 21,4%. Navedeni derivati linaloola mogu nastati preko (*E*)-8-hidroksilinaloola, (*E*)-8-oksolinaloola i alkohola jorgovana ili preko 6,7-epoksilinaloola, linalool oksida, anhidrolinalool oksida i alkohola jorgovana [3]. Aldehidi jorgovana su pronađeni u vršnim parama različitih vrsta meda poput [3,48] *Citrus* spp. i *Paliurus spina-christi* Mill., kao i u *Coriandrum sativum* L. medu (poglavlje 5.1.2). Međutim, ovi spojevi su zastupljeniji u vršnim parama meda *Trifolium pratense* L. Također, može se uočiti da se u kemijskom profilu vršnih para meda od crvene djeteline aldehidi jorgovana ne pojavljuju zajedno sa izomerima alkohola jorgovana i linaloola ili drugih derivata linaloola (osim *trans*-linalool oksida zastupljenog u manjem postotku) kao što je slučaj kod drugih vrsta meda [48]. Drugi kvantitativno značajni spojevi vršnih para meda *Trifolium pratense* L. su derivati benzena, fenilacetaldehid (10,1-31,2%) i benzaldehid (7,0-15,7%). Ovi spojevi su često prisutni u medu, a nastaju iz aminokiseline fenilalanina [73]. Prisustvo 2-furankarboksaldehida u vršnim parama ukazuje na Maillardovu reakciju i Streckerovu degradaciju, a visoka zastupljenost fenilacetaldehida odražava degradaciju fenilalanina. Benzaldehid je glavni isparljivi spoj brazilskog meda *Gochnatia velutina* (Bong.) Cabrera [221] i meda biljnih vrsta roda *Salix* [73]. Identificirane su i dvije niže alifatske kiseline, oktanska (0,7-2,9%) i nonanska

kiselina (4,1-5,8%). Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, A. Radonić, M. Kranjac, M. Zekić, Z. Marijanović, S. Gudić i M. Kliškić, 2016. [222].

5.1.4. Vršne pare meda *Satureja subspicata* Vis.

Glavni spojevi kemijskog profila vršnih para meda *Satureja subspicata* Vis. (tablica 22) su fenilacetaldehid (30,23%) i benzaldehid (23,80%). Navedeni aromatični spojevi, zajedno sa 2-feniletanolom, se mogu pronaći u kemijskim profilima različitih vrsta meda. U manjem postotku su, uz 2-feniletanol (1,17%), prisutni i drugi derivati benzena, eugenol (2,97%) i benzojeva kiselina (1%). Visok postotak fenilacetaldehida je karakteristika kemijskog profila vršnih para meda od timijana (32,9%) i meda od razgranjenog čepljeza (40,57%), dok je benzaldehid u vršnim parama ovih vrsta meda zastupljen u manjem postotku (5,8%, odnosno 1,40%) [108,120]. Također, među identificiranim derivatima benzena u medljikovcu hrasta iz Španjolske fenilacetaldehid je najzastupljeniji spoj [223]. Sadržaj fenilacetaldehida i benzaldehida je znatno veći u vršnim parama meda *S. subspicata* u usporedbi sa ostalim *Satureja* vrstama meda (tablica 23 i 24). Slično, Guyot-Declerck i suradnici (2002), usporedbom meda od različitih vrsta lavande ističu fenilacetaldehid kao kvantitativni marker meda *L. angustifolia x latifolia* [224]. Linalool (2,07%), hotrienol (5,83%) i *cis/trans*-linalool oksidi (ukupno 10,20%) su glavni terpeni identificirani u vršnim parama. Među ostalim spojevima, 2-etilheksan-1-ol (8,57%) i dimetil-disufid (4,23%), predstavljaju kvantitativno značajne sastojke vršnih para meda *S. subspicata*. 2-Etilheksan-1-ol je prethodno identificiran u vršnim parama meda od agruma, ružmarina, vrijeska, lavande te medljikovcu [225], kao i u ekstraktima meda od kažuja (*Anacardium occidentale*), meda biljnih vrsta roda *Croton* [226,227] te meda *Gochnatia velutina* (Bong.) Cabrera [221]. Wardencki i suradnici (2009) ističu 2-etilheksan-1-ol kao koristan spoj za razlikovanje meda od heljde od ostalih istraživanih vrsta meda [228,229]. Dimetil-disulfid (DMDS) je identificiran u mnogim vrstama meda, poput meda od agruma (*Citrus* spp.), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), timijana (*Thymus* spp.), vrijeska (*Ericaceae*) i lavande (*Lavandula* spp.), poliflornom medu te medljikovcu [230]. Visoka koncentracija dimetil-disulfida (DMDS) pronađena je u medu eukaliptusa [123,230].

5.1.5. Vršne pare meda *Satureja montana* L.

Najzastupljeniji spojevi vršnih para meda *Satureja montana* L. pripadaju različitim grupama kemijskih spojeva uključujući terpene, norizoprenoide i derivate benzena. Među 20 identificiranih spojeva, hotrienol (3,7-dimetilokta-1,5,7-trien-3-ol) je prevladavajući spoj (75,9-81,7%) u svim uzorcima meda (tablica 23). Navedeni spoj, sa slatkom, svježom i cvjetnom aromom, nastaje dehidratacijom 2,6-dimetilokta-3,7-dien-2,6-diola i vjerojatno značajno doprinosi aromi meda [48]. S obzirom na toplinu i kisele uvjete u košnici, do dehidratacije polaznog diola može doći i u slučaju kada med nije dodatno zagrijavan. Hotrienol je, u različitim količinama, pronađen i u vršnim parama drugih vrsta meda. Glavni je spoj vršnih para različitih vrsta meda podrijetlom iz porodice *Lamiaceae*, poput *Mentha* spp. [83] i *Lavandula* spp. [2,231]. Nadalje, hotrienol je glavni aromatični spoj idenificiran analizom vršnih para *Eucryphia lucida* (Labill.) Baill meda [68]. U analiziranim uzorcima meda su pisutni i drugi derivati linaloola kao što su *cis*- i *trans*-linalool oksidi (4,79 i 2,50%) ili 3,7-dimetilokta-1,5-dien-3,7-diol (3,87%), ali u manjem postotku. Također, u manjem postotku su identificirani i norizoprenoidi α-izoforon (1,37%), 4-ketoizoforon (0,97%) i *trans*-β-damascenon (0,21%). Najzastupljeniji spoj među derivatima benzena je 4-metoksibenzaldehid (1,7-8,3%). Navedeni spoj, trivijalnog naziva *p*-anisaldehid, je pronađen u vršnim parama hrvatskih vrsta meda od lipe i kadulje [81,88]. Ovaj derivat škiminskog biosintetskog puta može nastati iz cimetne kiseline odlaskom acetatne skupine tijekom nastajanja derivata benzojeve kiseline [232]. Benzaldehid i 2-feniletanol su pronađeni u manjem postotku i uobičajeni su spojevi vršnih para različitih vrsta meda [48]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, M. Kranjac i M. Malenica-Staver, 2015. [233].

5.1.6. Vršne pare meda *Satureja hortensis* L.

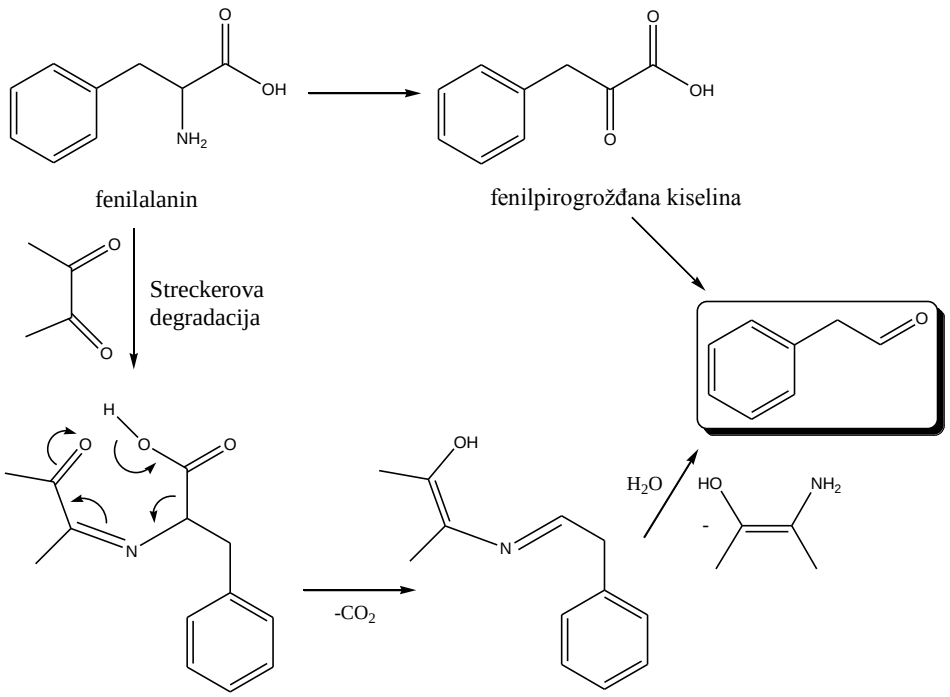
Primjenom HS-SPME-GC-MS/FID metode koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno, u vršnim parama meda *Satureja hortensis* L. je identificiran ukupno 21 spoj (tablica 24). Glavni spojevi su derivati linaloola, prvenstveno hotrienol (22,8%), zatim izomeri aldehida i alkohola jorgovana (1,5−5,5 %), *cis*- i *trans*-linalool oksidi (2,3 %; 6,6%) i drugi. Hotrienol (3,7-dimetilokta-1,5,7-trien-3-ol) je već prethodno pronađen, u različitim količinama, u vršnim parama svježih uzoraka meda dobivenih iz biljnih vrsta *Mentha* spp. [83], *Lavandula* spp. [231] ili *Eucryphia lucida* (Labill.) Baill [68]. Također, hotrienol je glavni spoj vršnih para meda

Satureja montana L. (poglavlje 5.1.5.). Stoga se navedeni spoj može smatrati karakteristikom vršnih para meda istraženih *Satureja* vrsta. Zanimljivo je spomenuti da su drugi derivati linaloola zastupljeniji u vršnim parama meda *Satureja hortensis* L. u usporedbi sa *S. montana* L. i *S. subspicata* Vis. vrstama meda. Također, daljnom usporedbom rezultata je zapaženo da aldehidi jorgovana, identificirani u vršnim parama *S. hortensis* meda, nisu pronađeni u kemijskim profilima vršnih para *S. montana* i *S. subspicata* meda.

Benzaldehid (6,1%), fenilacetaldehid (4,9%) i etil-benzoat (2,1%) su glavni derivati benzena identificirani u vršnim parama, ali budući da su prisutni u relativno malim udjelima i mogu se pronaći u mnogim vrstama meda nisu korisni kemijski markeri. Spojevi identificirani u vršnim parama, iz grupe norizoprenoida, su safranal (7,6%), 4-ketoizoforon (1,9%) i *trans*-β-damascenon (0,6%). Dimetil-sulfid (tablica 23) najvjerojatnije potječe iz nektara biljaka porodice *Brassicaceae*. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, G. Baranović, Z. Marijanović, M. Kranjac, L. Svečnjak i P. M. Kuś, 2015. [234].

5.1.7. Vršne pare meda *Coffea* spp.

Kemijski sastav i udio isparljivih spojeva u vršnim parama uzoraka meda *Coffea* spp. prikazan je u tablici 25. Glavni spoj identificiran u vršnim parama uzorka meda Co1 je derivat benzena fenilacetaldehid (36,6%), a također predstavlja kvantitativno značajan spoj vršnih para uzorka Co2 (13,5%). Nastanak fenilacetaldehida iz fenilalanina prikazan je na slici 17. Međutim, navedeni spoj ne predstavlja specifičan kemijski marker [48]. Ostali derivati benzena su kvalitativno i kvantitativno zastupljeniji u uzorku Co1, no ipak u oba uzorka su prisutni u niskim postotcima. Glavni sastojak vršnih para uzorka meda Co2 je derivat linaloola hotrienol (42,5%), koji je u uzorku Co1 prisutan u znatno nižem postotku (4,0%). U većim postotcima su, u oba uzorka (Co1; Co2), zastupljeni terpeni, posebice derivati linaloola *trans*-linalool oksid (8,7%; 20,5%) i *cis*-linalool oksid (4,2%; 12,3%). Oba izomera linalool oksida su, u većem ukupnom udjelu, pronađena u vršnim parama nekoliko vrsta meda, npr. *Amorpha fruticosa* L. [235], *Quercus frainetto* Ten. [236], kao i u *Coriandrum sativum* L. vrsti meda (poglavlje 5.1.2.). Također, 3-hidroksi-4-fenil-butan-2-on je identificiran u oba uzorka (zastupljeniji u Co1), kao i u drugim vrstama meda [48]. α-Pinen je prethodno identificiran u medu od suncokreta (*Helianthus annuus* L.) i medljikovcu brucijskog bora (*Pinus brutia* Ten.) [3]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, P. M. Kuś, Z. Marijanović i M. Kranjac, 2014. [162].



Slika 17. Shematski prikaz nastanka fenilacetaldehida (preuzeto i prilagođeno iz Jerković i sur., 2013.) [73]

5.2. Isparljivi spojevi izolirani USE metodom

Usporedbom različitih otapala s obzirom na ukupni broj izoliranih spojeva, za ultrazvučnu ekstrakciju uzoraka meda odabrana su otapala diklormetan (otapalo B) i smjesa pentan:dietil-eter (otapalo A).

5.2.1. USE ekstrakti meda *Taraxacum officinale* Weber

Isparljivi spojevi identificirani u USE ekstraktima *Taraxacum officinale* Weber meda su prikazani u tablici 26. Glavni spoj identificiran u oba ekstrakta je feniloctena kiselina (produkt šikiminskog biosintetskog puta), a zastupljenija je u pentan:dietil-eterskom ekstraktu (24%) nego u diklormetanskom ekstraktu (18,5%). Feniloctena kiselina je po prvi put identificirana u medu od maslačka u ovako visokom postotku. Podrijetlo ove kiseline je vjerojatno iz nektara vrsta roda *Salix*. Naime, u *Salix* spp. nektarnom medu [102] identificirana je feniloctena kiselina (3,7-18,7%, otapalo A), a pronađena je i u *Salix* spp. medljikovcu

(14,3%, otapalo A). Prema objavljenim rezultatima iz ovog istraživanja [212], pelud *Salix* spp. je melisopalinološkom analizom utvrđen kao glavni prateći pelud u medu od maslačka. Općenito, med *Taraxacum* spp. je karakteriziran iznimno malim postotokom peludi uz koju je gotovo stalno prisutna pelud vrsta roda *Salix* spp. [14,203].

U ekstraktima su u manjem postotku identificirane i druge kiseline, biosintetski srodne feniloctenoj kiselini, benzojeva (4,8%; 3,0%) i *p*-kumarinska kiselina (3,9%, otapalo A), koje su također identificirane u medu *Salix* spp. [102]. Metil-siringat i siringil-derivati su u ekstraktima identificirani u veoma niskim udjelima i vjerojatno potječu iz biljnih vrsta porodice *Brassicaceace*. Pelud navedene biljne porodice je po zastupljenosti drugi prateći pelud utvrđen u uzorku meda od maslačka. Metil-siringat je u većim postotcima identificiran u medu *Brassica napus* L. [237]. Također, metil-siringat je jedan od glavnih spojeva identificiran u ekstraktima meda *Salix* spp. [109]. Metil-siringat je, u većim koncentracijama pronađen u medu razgranjenog čepljeza (>122,6 mg kg^{-1}) [238], te manuka medu (45 mg kg^{-1}) [125,239]. Kvantitativno značajan sastojak oba ekstrakta, koji je također po prvi put identificiran u medu od maslačka, je dehidrovomifoliol (4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-cikloheks-2-en-1-on). Iz rezultata analize (tablica 26) je vidljivo da je dehidrovomifoliol 2,5 puta zastupljeniji u diklormetanskom ekstraktu (19,3%) nego u pentan:dietil-eterskom ekstraktu (7,5%). Dehidrovomifoliol vjerojatno nastaje razgradnjom abscisinske kiseline (ABA). ABA je pronađena u *Salix* spp. nektarnom medu, u kojem je zastupljeniji izomer (*Z*,*E*)-ABA (98,2 mg kg^{-1}) nego (*E*,*E*)-ABA (31,7 mg kg^{-1}) [166]. Može se smatrati da razgradnja ABA i nastanak dehidrovomifoliola u medu *Salix* spp. nije dominantna reakcija, budući da je u *Salix* spp. medu dehidrovomifoliol prisutan u iznimno malim koncentracijama [102]. Stoga se dehidrovomifoliol može smatrati karakterističnim za med od maslačka. Med od vrijeska sadrži 56-264 mg kg^{-1} dehidrovomifoliola, dok je sadržaj navedenog spoja u 8 drugih vrsta meda samo 0,033-6 mg kg^{-1} [240]. Strukturno sličan spoj, vomifoliol je u niskim postotcima prisutan u oba ekstrakta, a također je zastupljeniji u diklormetanskom ekstraktu (4,2%), nego u pentan:dietil-eterskom ekstraktu (0,9%). 3-Hidroksi-4-fenilbutan-2-on je identificiran u oba ekstrakta (9,6%; 7,1%). Također su identificirani i viši alifatski alkoholi, kiseline i alkani (tj. heksadekan-1-ol, oktadekan-1-ol, (*Z*)-oktadec-9-en-1-ol, heksadekanska kiselina, (*Z*)-oktadec-9-enska kiselina, heneikosan, dokosan ili trikosan), koji vjerojatno potječu iz okruženja košnice [241]. Razgranate niže alifatske kiseline, identificirane u oba ekstrakta, su 3-metilbutanska kiselina (2,0%; 1,8%), 2-metilbutanska kiselina (0,8%; 1,7%) i 3-metilpentanska kiselina (7,9%; 1,7%). U ekstraktima su identificirana samo dva nitrila: 3-metilpentanonitril (2,1%; 0,8%) i

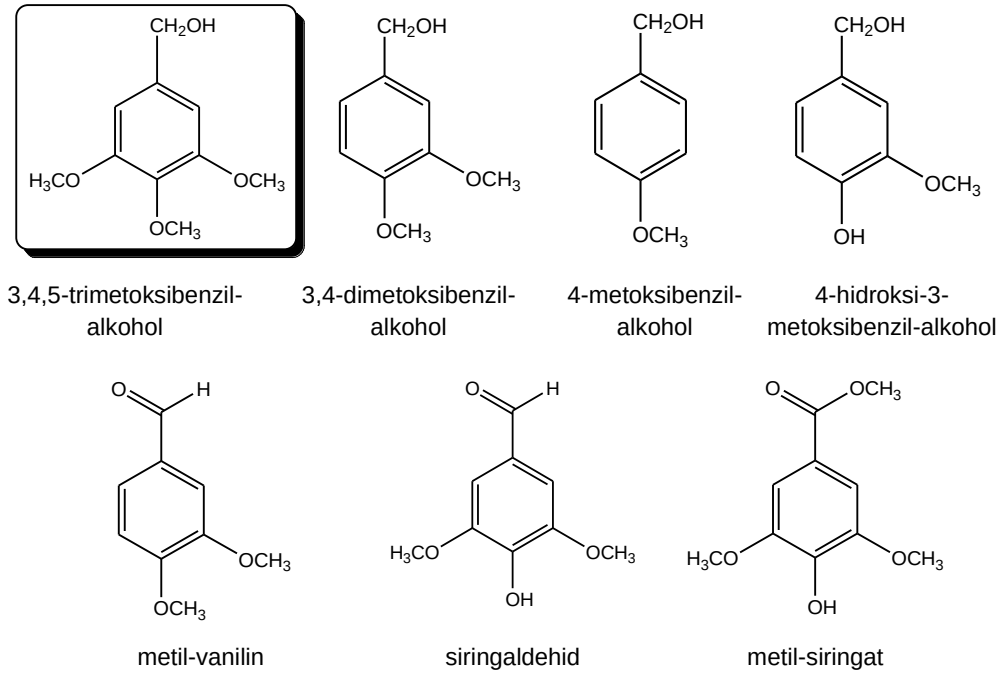
fenilacetonitril (1,1%; 0,6%). U oba ekstrakta je identificiran 5-aminoindanon (0,8%; 1,1%) koji je prethodno pronađen u *Salix* spp. medu [109], gdje je također zastupljniji u diklormetanskom ekstraktu. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, Z. Marijanović, M. Kranjac i A. Radonić, 2015. [212].

5.2.2. USE ekstrakti meda *Coriandrum sativum* L.

U tablici 27 je prikazan kemijski sastav i udio isparljivih spojeva USE ekstrakata meda *Coriandrum sativum* L. Glavni spojevi u oba ekstrakta (otapalo A, otapalo B) su oksidirani derivati metoksibenzena (slika 18) od kojih su najzastupljeniji 3,4,5-trimetoksibenzil-alkohol (26,3%; 24,7%), metil-siringat (21,6%;11,7%) i 3,4-dimetoksibenzil-alkohol (5,6%;13,9%). Drugi strukturno srodni spojevi kao što su 4-metoksibenzil-alkohol (anisil-alkohol), 4-hidroksi-3-metoksibenzil-alkohol, 3,4-dimetoksibenzaldehid (metil-vanilin) i 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid (siringaldehid) su pronađeni, u manjem postotku, samo u diklormetanskom ekstraktu. Hegazi i suradnici (2009) su u korijandrovom medu iz Egipta identificirali sljedeće derivate benzena: 3,4-dimetoksibenzojevu kiselinu, 4-hidroksibenzojevu kiselinu, vanilinsku kiselinu, 3,4-dihidroksibenzojevu kiselinu, 2,3-dimetoksibenzaldehid, 1,4-dihidroksibenzen i vanilin-alkohol. Potrebno je napomenuti da su navedeni spojevi identificirani nakon derivatizacije dietil-eterskog ekstrakta meda [242]. Drugu kvantitativno značajnu grupu spojeva čine derivati linaloola, tj. (*E*)- i (*Z*)-2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-dioli (ukupno 17,8%; 16,1%). Iako su linalool derivati prevladavajući spojevi vršnih para korijandrovog meda, navedeni dioli su, zbog veće topljivosti u vodi i manje isparljivosti, pronađeni samo u ekstraktima. Izomer 2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-diola (točan izomer nije određen) je identificiran u cvjetnom medu od limuna i naranče primjenom tzv. *purge and trap* metode [243], dok je (*E*)-2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-diol dominantan spoj USE ekstrakta meda od agruma [87]. Navedeni (*Z*)- i (*E*)-dioli su identificirani u GC kromatografskom profilu, nakon derivatizacije dietil-eterskog ekstrakta, novozelandskog meda *Carduus nutans* L. [244]. U egipatskom medu od korijandra je identificiran diterpen dehidroabietinska kiselina [242].

U malim postotcima je prisutno nekoliko ugljikovodika sa 12 i više ugljikovih atoma. Od viših alifatskih spojeva, prevladavajući su (*Z*)-oktadec-9-en-1-ol (5%; 8,7%) i etil-(*Z*)-oktadec-9-enoat (7,6%; 1,4%), a manje zastupljeni su heksadekan-1-ol, oktadekan-1-ol i dr. (tablica 27). Ovi spojevi se povezuju sa sastavom voska i ne smatraju se specifičnim za nijednu vrstu meda [241]. Devet estera masnih kiselina su prethodno pronađeni u medu korijandra, i to

monoetil-sukcinat, etil-palmitat, etil-oleat, etil-stearat, metil-12-hidroksi-stearat, decil-palmitat, oktil-oleat, etil-dokosanoat i etil-tetrakosanoat [242].



Slika 18. Strukture oksidiranih derivata metoksibenzena identificiranih u ekstraktima meda od korijandra (preuzeto i prilagođeno iz Jerković i sur., 2013.) [219]

Najzastupljeniji spojevi identificirani u ekstraktima su derivati šikiminskog biosintetskog puta (slika 18), najvjerojatnije nastali preko *p*-kumarinske kiseline. Reakcije hidroksilacije/metilacije benzil-alkohola kao osnovnog strukturnog elementa dovode do nastanka različitih hidroksi/metoksi derivata, npr. 4-hidroksi-3-metoksibenzil-alkohola, 3,4-dimetoksibenzil-alkohola ili 3,4,5-trimetoksibenzil-alkohola. Budući da reakcije redukcije u medu nemaju prednost nad oksidacijskim reakcijama, može se pretpostaviti daljna oksidacija do aldehida (tj. 3,4-dimetoksibenzaldehida, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehida) i odgovarajuće karaboksilne kiseline te daljna esterifikacija do metil-siringata. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, M. Obradović, P. M. Kuś i M. Šarolić, 2013. [219].

5.2.3. USE ekstrakti meda *Trifolium pratense* L.

Prema rezultatima analize meda *Trifolium pratense* L. dominantni spojevi u oba ekstrakta (otapalo A; otapalo B) su viši alifatski ugljikovodici i alkoholi (tablice 28 i 29). Među ekstrahiranim spojevima najzastupljniji je (*Z*)-oktadec-9-en-1-ol (17,9-25,0%; 17,7-35,1%) te nonadekan (1,1-26,8%; 1,8-2,5%), heksadekan-1-ol (6,6-7,5%; 7,0-8,1%), oktadekan-1-ol (5,4-7,5%; 6,9-19,1%) i heksadekanska kiselina (4,6-4,8%; 0,5-6,3%). Svi navedeni spojevi vjerojatno potječu iz okruženja košnice [241] stoga nisu korisni za određivanje botaničkog podrijetla meda. Također, nekoliko drugih alifatskih spojeva je identificirano u manjem postotku kao što je dodekan-1-ol (0,8-1,5%; 0,0-2,8%).

U ekstraktima (otapalo A, otapalo B) su pronađeni i produkti razgradnje ugljikohidrata, maltol (2,6%-5,4%; 11,3-20,1%), 5-hidroksimetilfurfural (0,4-,0,7%; 0,9-1,9%), a 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on je identificiran samo u pentan:dietil-eterskom ekstraktu (0,1-0,6%). Navedeni spojevi ukazuju na Maillardovu reakciju, Streckerovu degradaciju i degradaciju ugljikohidrata i nisu specifični za određeni botanički izvor. Važno je istaknuti da su analizom ekstrakata meda od crvene djeteline identificirani i drugi spojevi koji su u oba ekstrakta prisutni u niskim postotcima, a mogu se pronaći i u kemijskim profilima drugih vrsta meda te nisu korisni kemijski markeri botaničkog podrijetla [48]. Najzastupljeniji među njima su derivati benzena kao što je metil-siringat (2,6-9,1%; 5,4-15,3%) i feniloctena kiselina (1,2%-2,2%; 0,0-0,5%). Od ostalih spojeva, identificiranih u manjem postotku, zanimljiv je 5-aminoindanon (0,3-1,3%; 0,1-1,1%) pronađen u ekstraktima meda *Acer* spp. [245] i *Salix* spp. [109], kao i u ekstraktima *Taraxacum officinale* Weber meda (poglavlje 5.2.1.). Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, A. Radonić, M. Kranjac, M. Zekić, Z. Marijanović, S. Gudić i M. Kliškić, 2016. [222].

5.2.4. USE ekstrakti meda *Satureja subspicata* Vis.

Za ekstrakciju uzoraka meda *Satureja subspicata* Vis. su upotrijebljena otapala različite polarnosti, što može utjecati na sastav dobivenih ekstrakata ovisno o polarnosti, odnosno topljivosti spojeva prisutnih u medu. Međutim, oba ekstrakta meda *Satureja subspicata* Vis. su kvalitativno veoma slična sa manjim razlikama u sastavu spojeva prisutnih u manjem postotku (tablice 30 i 31). Stoga je daljna ekstrakcija ostalih *Satureja* vrsta meda provedena upotrebom samo jednog otapala, tj. smjese pentana i dietil-etera (1:2, *v*/*v*). Glavni spoj, identificiran u oba

ekstrakta (otapalo A; otapalo B) je metil-siringat (46,68%; 52,98%). Od ostalih derivata benzena, u većem postotku su identificirani siringaldehid (7,30%; 8,80%) i benzojeva kiselina (2,22%; 1,76%). Drugi strukturno srodni spojevi, poput 3,4,5-trimetilfenola, eugenola, metil-4-metoksibenzoata, 3,4,5-trimetoksibenzaldehida, metil-3,4,5-trimetoksibenzoata, 3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzil-alkohola, 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline i siringinske kiseline, su pronađeni u manjem postotku. Uočene su značajne sličnosti sa sastavom ekstrakata meda *S. montana*. Prevladavajući spojevi kemijskog profila ekstrakata meda *S. montana* su također derivati benzena, među kojima je glavni spoj metil-siringat (53,8%), a potom siringaladehid (18,9%) i benzojeva kiseline (5,6%). Metil-siringat je također glavni spoj u ekstraktu meda (54,7%) *S. hortensis*, a identificirana je i benzojeva kiselina (2,4%); poglavlje 5.2.6. Siringinska kiselina je u ekstraktima meda *Satureja subspicata* Vis. prisutna u niskom postotku (0,72%; 1,15%), a prethodno je identificirana i u metanolnim ekstraktima biljke [246].

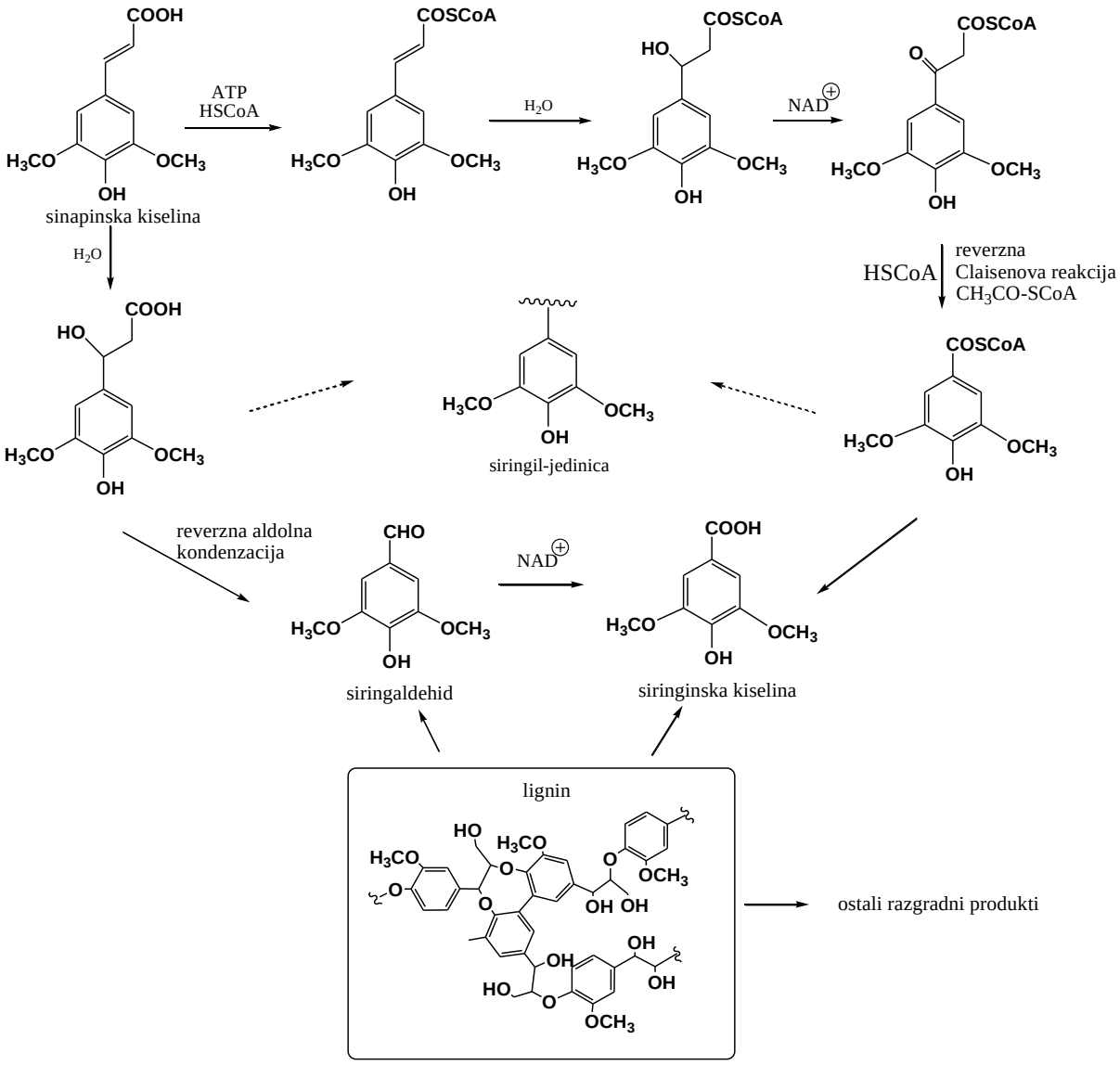
Među višim alifatskim alkoholima najzastupljeniji su (*Z*)-oktadec-9-en-1-ol (14,27%; 10,82%), oktadekan-1-ol (5,92%; 4,42%) i heksadekan-1-ol (5,86%; 3,28%). Također, kvantitativno je značajna i heksadekanska kiselina (3,94%; 3,69%). Podrijetlo ovih spojeva je vjerojatno vezano uz sastav saća i kutikularnih voskova, stoga nisu od značaja u karakterizaciji meda [241]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, M. Kranjac, Z. Marijanović, M. Zekić, A. Radonić i C. I. G.Tuberoso, 2016. [247].

5.2.5. USE ekstrakti meda *Satureja montana* L.

Glavni spojevi meda *Satureja montana* L. identificirani u pentan:dietil-eterskom ekstraktu su derivati šikiminskog biosintetskog puta, odnosno derivati sinapinske kiseline poput metil-siringata (36,2-72,8%) i siringaldehida (2,2-43,1%), tablica 32. Zbog slabe isparljivosti, metil-siringat nije identificiran primjenom HS-SPME metode u istraženim *Satureja* vrstama meda (metil-siringat se obično plinskom kromatografijom određuje nakon metilacije).

Sinapinska kiselina nastaje iz tirozina ili fenilalanina nakon slijeda reakcija hidroksilacije i metilacije *p*-kumarinske kiseline. Postoje različiti putevi biosinteze siringil-derivata, odnosno siringinske jedinice. Tako se sinapinska kiselina može cijepati na dvostrukoj vezi i izgubiti dva atoma ugljika iz bočnog lanca u slijedu reakcija analognih reakcijama β-oksidacije masnih kiselina. Aktivirana sinapinska kiselina (CoA-ester) se hidroksilira, hidroksilna skupina se dalje oksidira do ketona, i konačno dobiveni β-ketoester gubi acetil-koenzim A reverznom Claisenovom reakcijom pri čemu nastaje aktivirana siringinska jedinica

(slika 19) [96]. Moguć je i drugi mehanizam cijepanja bočnog lanca gdje se sinapinska kiselina izravno hidratira i reverznom aldolnom reakcijom daje siringaldehid (siringinsku jedinicu). Siringinska kiselina nastaje u NAD+ (nikotinamid adenin dinukleotid) ovisnom oksidacijskom koraku. Metil-siringat, glavni spoj ekstrakta meda primorskog vriska, je vjerojatno nastao metiliranjem siringinske kiseline. Dodatno je moguće da ovi spojevi nastaju razgradnjom biljnog polimera lignina, koji djeluje kao ojačavajući materijal biljne stanične stijenke [96]. Strukturno obilježje lignina čini mreža razgranatih C_9-fenilpropanskih jedinica. Lignin nastaje oksidacijskom polimerizacijom hidroksicinamil-alkohola, od kojih su najvažniji monomeri *p*-kumaril-alkohol, koniferil-alkohol i sinapil-alkohol [96].



Slika 19. Shematski prikaz biosinteze siringil-derivata (preuzeto i prilagođeno iz Jerković i sur., 2015.) [233]

Pored metil-siringata, siringaldehid je drugi kvantitativno značajan spoj pentan:dietil-eterskog ekstrakta. Ovakav specifičan omjer metil-siringata kao glavnog spoja i siringaldehida također prisutnog u velikom postotku u pentan:dietil-eterskom ekstraktu, nije pronađen u isparljivim profilima drugih vrsta meda. Stoga se, zajedno sa metil-siringatom, može smatrati karakteristikom meda primorskog vriska. Među isparljivim spojevima meda *Acer* spp., navedeni fenolni aldehid predstavlja glavni spoj [245]. Viši alifatski ugljikovodici, alkoholi i kiseline, heksadekan-1-ol, heksadekanska kiselina, (Z)-oktadec-9-en-1-ol, (*Z*)-oktadec-9-enska kiselina, oktadekan-1-ol, dokosan i trikosan su također prisutni u ekstraktu, ali u manjim postotcima (tablica 32). Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, M. Kranjac i M. Malenica-Staver, 2015. [233].

5.2.6. USE ekstrakti meda *Satureja hortensis* L.

GC-MS/FID analizom USE ekstrakata meda *Satureja hortensis* L. identificirana su ukupno 34 spoja (tablica 33). Glavni spoj ekstrakta dobivenog primjenom ultrazvučne ekstrakcije smjesom otapala pentan:dietil-eter je metil-siringat (54,7%). Navedeni spoj se može istaknuti kao nespecifični kemijski marker botaničkog podrijetla meda *Satureja hortensis* L., budući da je prethodno identificiran u vrstama meda različitog botaničkog podrijetla, osobito u USE ekstraktu meda *Asphodelus microcapus* Salzm. et Viv. [120]. Slični rezultati su dobiveni i za med *Satureja montana* (tablica 32). Međutim, u medu *S. hortensis* nisu pronađeni siringaldehid i siringinska kiselina. Od ostalih derivata benzena, najzastupljenija je benzojeva kiselina (2,4 %). Alifatski alkoholi i kiseline, navedene u tablici, najvjerojatnije potječu iz okruženja košnice [241]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, G. Baranović, Z. Marijanović, M. Kranjac, L. Svečnjak i P. M. Kuś, 2015. [234].

5.2.7. USE ekstrakti meda *Coffea* spp.

Glavni spoj u oba ekstrakta uzoraka meda (Co1; Co2) je kofein (1,3,7-trimetilksantin), tablica 34. Postotak kofeina je veći u diklormetanskom ekstraktu (89,1%; 90,5%), nego u pentan:dietil-eterskom ekstraktu (59,9%; 51,0%). Osim kofeina, u manjim postotcima je pronađen i teobromin (3,7-dimetilksantin). Važno je spomeniti da ova dva derivata metilksantina nisu identificirana u vršnim parama *Coffea* spp. meda što se objašnjava njihovom slabom isparljivosti. Usporedbom sa rezultatima HPLC-DAD analiza (tablica 39) također su

uočene značajne razlike, koje se mogu objasniti različitom topljivosti derivata metilksantina. Derivati ksantina imaju različita lipofilna svojstva [248]. Istraživanja pokazuju da metilksantini kod kojih su oba atoma dušika u heterocikličkom prstenu metilirana (kofein i teofilin) pokazuju mnogo veću topljivost u polarnim otapalima od onih sa najmanje jednim nemetiliranim atomom dušika (teobromin). Smatra se da su za spomenute razlike u topljivosti odgovorne intermolekulske vodikove veze između laktamskih jedinica kod nemetiliranih alkaloida [249]. Kofein je lipofilniji od teobromina i stoga je ekstrahiran primjenom USE sa organskim otapalima, dok je teobromin u ekstraktima prisutan samo u niskim postotcima.

(*Z*)-Oktadec-9-en-1-ol i oktadekan-1-ol, kao i ostali viši alifatski spojevi, vjerojatno potječu iz sastava saća [241]. C_{13}-Norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-okso-but-1-enil)-cikloheks-2-en-1-on je, u niskim postotcima, identificiran u oba ekstrakta Co1 i Co2 uzoraka, ali ne i u vršnim parama zbog niske isparljivosti. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, P. M. Kuś, Z. Marijanović i M. Kranjac, 2014. [162].

5.3. Isparljivi spojevi izolirani SPE metodom

SPE ekstrakt meda dobiven je korištenjem SPE punila s reverznom fazom. Mehanizam zadržavanja spojeva iz vodene otopine meda na stacionarnoj fazi se zasniva na nepolarnim ili hidrofobnim interakcijama. Za eluiranje (ispiranje) spojeva od interesa sa stacionarne faze korišten je diklormetan te je očekivana sličnost rezultata GC-MS/FID analize SPE ekstrakata i diklormetanskih ekstrakata.

5.3.1. SPE ekstrakti meda *Taraxacum officinale* Weber

U tablici 35 prikazan je kemijski sastav i udio isparljivih spojeva u SPE ekstraktu *Taraxacum officinale* Weber meda. Glavni identificirani spojevi u ekstraktu dobivenom SPE metodom su feniloctena kiselina (19,1%), dehidrovomifoliol (19,0%) i 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on (7,9%). U manjem postotku su identificirani vomifoliol (3,6%) i benzojeva kiselina (3,2%). Identificirane su iste niže alifatske kiseline kao i primjenom USE-GC-MS/FID metode (3-metilbutanska kiselina, 2-metilbutanska kiselina i 3-metilpentanska kiselina). Također su identificirani isti nitrili (3-metilpentanonitril i fenilacetonitril) te 5-aminoindanon, kao i viši

alifatski spojevi koji mogu potjecati iz sastava pčelinjeg voska. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, Z. Marijanović, M. Kranjac i A. Radonić, 2015. [212].

5.4. Usporedba primijenjenih metoda ekstrakcije isparljivih spojeva

Mikroekstrakcija vršnih para predstavlja jednostavnu metodu obrade uzorka koja za izolaciju isparljivih spojeva ne zahtjeva upotrebu otapala. Primjenom SPME-GC-MS metode identificiran je velik broj isparljivih spojeva, koji mogu poslužiti kao kemijski markeri botaničkog podrijetla meda. Verzera i suradnici (2001) [101] te Piasenzotto i suradnici (2003) [103] su među prvim autorima koji su objavili pimjenu mikroekstrakcije na krutoj fazi (SPME) za ekstrakciju isparljivih spojeva meda [250]. Verzera i suradnici (2001) [101] su u uniflornim vrstama meda sa Sicilije, upotrebom vlakna sa PDMS/DVB ovojnicom identificirali više od 100 spojeva iz sljedećih grupa: alifatski i aromatski spojevi, aciklički i monociklički terpeni i njihovi oksidi, derivati furana te spojevi sa sumporom i dušikom [250]. U cilju optimizacije SPME metode i postizanja što boljih rezultata, u mnogim istraživanjima su korišteni i razmatrani različiti SPME uvjeti ekstrakcije, posebice koji se odnose na veličinu vijalice, dodatak soli, miješanje, vrijeme za postizanje ravnoteže i ekstrakcije, vrstu vlakna, temperaturu, vrijeme desorpcije u GC injektoru [46,103,225,250,251]. Tako su Plutowska i suradnici (2011) kao najpogodnije vlakno za izolaciju aromatičnih spojeva različitih vrsta meda odabrali vlakno sa ovojnicom PDMS/DVB/CAR [46]. Primjena SPME-GC-MS metode na navedenom vlaknu omogućila je određivanje gotovo 200 spojeva iz grupe alifatskih i aromatskih kiselina, aldehida, ketona, alkohola, fenola, terpena te derivata furana i pirana [46]. USE metoda je, za ekstrakciju isparljive frakcije meda, prvi put primijenjena 2003 g. [250]. U posljednje se vrijeme u literaturi mogu pronaći primjeri upotrebe mikroekstrakcije na krutoj fazi (SPME) i ultrazvučne ekstrakcije sa otaplima (USE) kao komplementarnih tehnika ekstrakcije isparljive frakcije meda [250]. Kombinacijom navedenih tehnika dobije se iscrpan profil isparljivih spojeva, budući da primjena HS-SPME metode omogućuje izolaciju organskih spojeva niske molekulske mase, dok USE omogućuje ekstrakciju i poluisparljivih spojeva [250]. Prilikom ekstrakcije uzorka meda primjenom ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcije na krutoj fazi nije potrebno nikakvo zagrijavanje te termolabilni spojevi ne podliježu promjenama zbog zagrijavanja [252].

Svaka od primijenjenih metoda izolacije doprinosi karakterizaciji istraživanih uzoraka meda. Tako je primjena HS-SPME-GC-MS/FID metode na *Taraxacum officinale* Weber medu

potvrdila prisustvo nitrila koji nisu identificirani analizom USE i SPE ekstrakata ili su pronađeni u značajno manjem postotku. Naime, u ekstraktima su pronađeni samo 3-metilpentanonitril i fenilacetonitril u manjem postotku. Zastupljenost fenilacetonitrila u ekstraktima je oko 20-30 puta manja, a 3-metilpentanonitrila oko 10-40 puta manja nego u vršnim parama. Nekoliko spojeva je pronađeno samo u vršnim parama, poput derivata benzena (benzaldehid ili fenilacetaldehid), terpena (*trans*-linalool oksid, hotrienol ili izomeri *p*-ment-1-en-9-ala) i norizoprenoida (*trans*-ß-damascenon). S druge strane, rezultati GC-MS/FID analize USE i SPE ekstrakata otkrivaju druge spojeve zastupljene u *Taraxacum officinale* Weber medu. Tako, spojevi identificirani u ekstraktima poput feniloctene kiseline i dehidrovomifoliola zbog svoje niske isparljivosti, nisu identificirani u vršnim parama. Sve masne kiseline niske molekulske mase, identificirane u vršnim parama, su pronađene i u ekstraktima. Benzojeva kiselina, metil-siringat, 5-hidroksimetilfurfural, 3-okso-α-damaskon, nekoliko drugih derivata benzena i mnoštvo viših alifatskih spojeva su identificirani samo u USE i/ili SPE ekstraktima. Samo je 3-hidroksi-4-fenilbutan-2-on pronađen u sličnom postotku upotrebom svih navedenih metoda. Rezultati GC-MS/FID analize SPE ekstrakta su slični rezultatima dobivenim analizom diklormetanskog USE ekstrakta *Taraxacum officinale* Weber meda.

GC-MS analizom ekstrakata *Coriandrum sativum* L. meda dobiveni su potpuno različiti kromatografski profili u usporedbi sa profilom dobivenim analizom vršnih para. Od ukupno 38 spojeva identificiranih primjenom HS-SPME metode (tablica 20), 35 spojeva je pronađeno isključivo u vršnim parama i to uglavnom spojevi male molekulske mase. Zapažene su male razlike u sastavu ekstrakata, a također je primjetno da su spojevi sa kisikom u molekulskoj strukturi (oksidirani spojevi) zastupljeniji u diklormetanskom ekstraktu (tablica 27).

Uočene su značajne razlike u kemijskim profilima vršnih para te isparljivih i poluisparljivih spojeva meda *Trifolium pratense* L. Profil vršnih para je prikladniji za karakterizaciju ove vrste meda u usporedbi sa kemijskim profilima dobivenim analizom ekstrakata. Visok postotak aldehida jorgovana zajedno sa fenilacetaldehidom i benzaldehidom u vršnim parama se može smatrati karakterističnim obilježjem kemijskog profila meda *Trifolium pratense* L. Usporedbom rezultata GC-MS/FID analize oba ekstrakta, uočeno je nekoliko razlika u dobivenim kemijskim profilima. Maltol je zastupljeniji u diklormetanskom ekstraktu (11,3-20,1%), kao i metil-2-furoat (0,5-1,8%). Benzojeva i feniloctena kiselina su zastupljenije u pentan:dietil-eterskom ekstraktu (0,8-1,0%, odnosno 1,2-2,2%), dok su 4-hidroksicimetna kiselina (*p*-kumarinska kiselina) i 4-hidroksibenzojeva kiselina identificirane samo u pentan:dietil-eterskom ekstraktu. 4-Vinil-2-metoksifenol i 2,4,5-trimetilfenol su

pronađeni samo u diklormetanskom ekstraktu. Zastupljenost nonadekana je značajno manja u diklormetanskom ekstraktu (1,8%-2,5%).

Zbog značajnih razlika u sastavu vršnih para i ekstrakata meda, pristup koji uključuje više različitih ekstrakcijskih metoda se pokazao pogodnim. Ovakav pristup je osobito koristan kada potencijalni markeri botaničkog podrijetla uključuju isparljive i poluisparljive spojeve [250]. Primjerice GC-FID/MS analiza je omogućila identifikaciju potencijalnih nespecifičnih kemijskih markera meda *Satureja hortensis* L., i to hotrienola u vršnim parama i metil-siringata u ekstraktima. Hotrienol je također glavni spoj vršnih para meda *S. montana*. Metil-siringat je identificiran samo u ekstraktima i predstavlja glavni spoj svih ekstrakata meda *Satureja* vrsta (tablice 30-33).

Primjenom različitih metoda izolacije i analize uzoraka meda *Coffea* spp., uočene su značajne razlike u dobivenim kemijskim proflilima, koje se prvenstveno zasnivaju na različitoj isparljivosti i topljivosti isparljivih spojeva i derivata metilksantina. Naime, glavni sastojak ekstrakata meda *Coffea* spp. je kofein koji nije identificiran u vršnim parama. S druge strane glavni sastojci vršnih para ovih uzoraka meda, fenilacetaldehid i derivati linaloola, *trans*- i *cis*-linalool oksidi te hotrienol, nisu identificirani u USE ekstraktima.

5.5. Ciljani organski spojevi određeni izravnom HPLC analizom uzoraka

Zbog detaljnijeg razlikovanja biljnih vrsta istog roda, ciljana HPLC analiza je provedena na *Satureja* vrstama meda. Na uzorcima meda *Coffea* spp. je također provedena HPLC analiza usmjerena prvenstveno prema određivanju metilksantina, budući da je kofein glavni spoj USE ekstrakata, a osim njega je u ekstraktima pronađen i mali postotak teobromina.

5.5.1. HPLC analiza uzorka meda *Satureja subspicata* L.

Spojevi identificirani u uzorcima meda *Satureja subspicata* Vis. primjenom HPLC analize su prikazani u tablici 36. Najzastupljeniji među derivatima prefenata su fenilalanin i metil-siringat, nakon kojih slijede tirozin i benzojeva kiselina. Koncentracija metil-siringata (MSYR) u uzorcima meda *Satureja subspicata* Vis. je prilično visoka i iznosi 114,1 mg $kg^{-1.}$ Navedeni spoj je istaknut kao nespecifični kemijski marker *Satureja* vrsta meda (27,98 mg

kg^{-1} u uzorcima meda *Satureja montana* L. i 39,32 mg/kg u uzorku meda *Satureja hortensis* L.). Međutim, 3-4 puta veći sadržaj metil-siringata, pronađen u uzorcima meda *Satureja subspicata* Vis., može poslužiti za razlikovanje navedene vrste od drugih *Satureja* vrsta meda. Dvostruko veća količina metil-siringata je pronađena u uniflornom *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. medu (229,2 ± 57,9 mg kg^{-1}) [238]. Isto istraživanje pokazuje da navedeni kemijski marker potječe iz nektara, sa prosječnim doprinosom nektara u med od 80% [238]. Metil-siringat je također, u većoj količini, pronađen i u manuka medu (45 mg kg^{-1}) [125]. Manje količine metil-siringata (0,093 - 5,044 mg kg^{-1}) su pronađene u drugim vrstama nektarnog meda i medljikovca iz različitih biljnih izvora, poput vrbe [109], različka [121], bagrema, uljane repice, kestena, djeteline, lipe, maslačka, suncokreta i jele [253]. Uz leptozin (metil-siringil-4-*O*-*ß*-D-gentibioza), metil-siringat predstavlja aktivni spoj manuka meda kojem se pripisuje inhibicija aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) [10]. Također, MSYR pokazuje sposobnost hvatanja superoksida [239] te djeluje kao inhibitor nastanka aflatoksina [254]. Navedeni niskomolekulski fenolni ester djeluje kao aktivator ionskog kanala TRPA1 (engl. *transient receptor potential channel ankryn 1*) [23,24] te predstavlja učinkovit fenolni medijator u reakcijama lakaza kod bakterija i gljivica [255]. U manjim koncentracijama identificirane su i dvije aromatske kiseline, benzojeva (36,4 mg kg^{-1}) i 4-hidroksifeniloctena kiselina (21,3 mg kg^{-1}) te kojična kiselina (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4*H*-piran-4-on; 3,7 mg kg^{-1}). Na temelju ciljane HPLC-DAD analize primjećena je kvalitativna sličnost *S. subspicata* meda sa manuka medom. Naime, Oelschlaegel i suradnici (2012) [125] su, na temelju dobivenih različitih UPLC-PDA profila, 40 komercijalnih uzoraka manuka meda svrstali u tri skupine karkterizirane sa: (i) visokim sadržajem 4-hidroksibenzojeve kiseline, dehidrovomifoliola i benzojeve kiseline; (ii) visokim koncentracijama kojične kiseline i 2-metoksibenzojeve kiseline i (iii) visokim sadržajem siringinske kiseline, 4-metoksifenilmliječne kiseline i metil-siringata. Hidroksifeniloctena kiselina sudjeluje, *in vitro* i *in vivo*, u reakcijama „hvatanja“ reaktivnih dušikovih spojeva [256,257]. U uzorcima meda su određene i aromatske aminokiseline fenilalanin (167,8 mg kg^{-1}) i tirozin (35,6 mg kg^{-1}). Koncentracija ovih aminokiselina u uzorku meda *Satureja hortensis* L. (tablica 38) je za fenilalanin 282,0 mg kg^{-1}, a za tirozin 140,4 mg kg^{-1}. Sadržaj tirozina je sličan vrijednostima prethodno dobivenim za med od eukaliptusa i cvijeta naranče (34,8 odnosno 31,5 mg kg^{-1}) [154]. Također i sadržaj fenilalanina u navedenim vrstama meda (107 mg kg^{-1} za med od eukaliptusa i 122 mg kg^{-1} za narančin med) je blizu vrijednostima dobivenim za med *Satureja hortensis* L. Glavne aminokiseline pronađene u medu od ružmarina, eukaliptusa, lavande, timijana i cvijeta naranče su prolin, fenilalanin, tirozin i

lizin [154]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, M. Kranjac, Z. Marijanović, M. Zekić, A. Radonić i C. I. G.Tuberoso, 2016. [247].

5.5.2. HPLC analiza uzorka meda *Satureja montana* L.

Izravnom HPLC-DAD analizom uzoraka meda *Satureja montana* L. određeni su derivati sinapinske kiseline metil-siringat (27,98 mg kg^{-1}) i siringinska kiselina (0,92 mg kg^{-1}), tablica 37. U skladu sa rezultatima GC-MS/FID analize USE ekstrakata, visok sadržaj metil-siringata određen HPLC analizom vodene otopine uzoraka meda je očekivan. Visoka koncentracija metil-siringata određena je u medu *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. (>122,6 mg kg^{-1}) [238] i *Leptospermum spp.* (45 mg kg^{-1}) [125]. Zanimljivo je spomenuti da je ovaj fenolni ester također pronađen u vrstama meda od bagrema, uljane repice, pitomog kestena, djeteline, lipe, maslačka, suncokreta i timijana [48]. Metil-siringat pridonosi antibakterijskoj aktivnosti meda, budući da peroksidna aktivnost nije odgovorna za ukupnu antibakterijsku aktivnost [258]. Prosječna vrijednost siringinske kiseline (4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina) određene u uzorcima meda *Satureja montana* L. je niska i iznosi 0,92 mg kg^{-1}. S obzirom na visoku polarnost, primjenom GC-MS/FID metode analize bez postupka derivatizacije, navedena kiselina je identificirana u niskom postotku. Zajedno sa metil-siringatom, može poslužiti za karakterizaciju meda *S. montana*. U niskim koncentracijama (0,2-2,9 mg kg^{-1}) siringinska kiselina je pronađena u *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst (manuka) i *Kunzea ericoides* (A. Rich.) J. Thompson (kanuka) vrstama meda [67]. Također, u istraživanju novozelandskog manuka meda i siringinska kiselina posjeduje antibakterijsku aktivnost [258]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, M. Kranjac i M. Malenica-Staver, 2015. [233].

5.5.3. HPLC analiza uzorka meda *Satureja hortensis* L.

Ciljanom HPLC-DAD analizom uzoraka meda *Satureja hortensis* L. određeni su metil-siringat, 5-hidroksimetilfurfural, tirozin i fenilalanin, tablica 38. Metil-siringat je prisutan u visokoj koncentraciji (39,32 mg kg^{-1}), slično kao u manuka medu [125] te u medu *S. montana*. Ovaj fenolni derivat je pronađen u medu različitih biljnih porodica [48] te se smatra nespecifičnim kemijskim markerom. Zbog visoke koncentracije pronađene u *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv medu (185,6 to 288,4 mg kg^{-1}), predložen je kao kemijski marker

navedene vrste meda [238]. Niska koncentracija 5-hidroksimetilfurfurala potvrđuje da je istraživani uzorak meda svjež te da nije zagrijavan ili produljeno skladišten. U istraživanom uzorku meda, određene su dvije aminokiseline, tirozin i fenilalanin, zastupljene u visokim koncentracijama (140,4 mg kg^{-1} odnosno 282,0 mg kg^{-1}). Obično su navedene aminokiseline pronađene u koncentracijama manjim od 100 mg kg^{-1}, ali u nekim vrstama meda, poput ružmarina, timijana, lavande, pronađene su u većim koncentracijama; primjerice koncentracije tirozina i fenilalanina određene u medu od lavande su 404 mg kg^{-1}, odnosno 642 mg kg^{-1} [123,154]. Također, u medu lavande Cotte i suradnici (2004) su HPLC analizom odredili veći sadržaj fenilalanila (1152,8 mg kg^{-1}) u usporedbi sa medom od bagrema, kestena, repice, jele, lipe i suncokreta [156]. Slično, povišene vrijednosti fenilalanina pronađene su u medu velike zlatnice (do 258,1 mg kg^{-1}), heljde (do 270,4 mg kg^{-1}) i bosiljka (502,6 mg kg^{-1}) [259]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, G. Baranović, Z. Marijanović, M. Kranjac, L. Svečnjak i P. M. Kuś, 2015. [234].

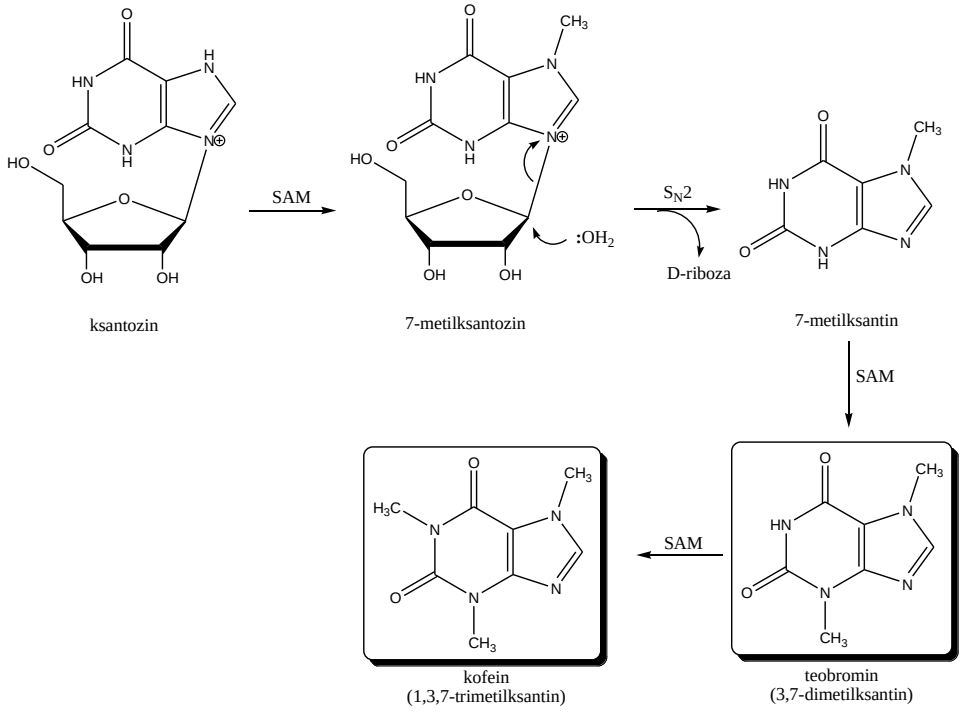
5.5.4. HPLC analiza uzorka meda *Coffea* spp.

HPLC-DAD analiza uzoraka meda *Coffea* spp. (Co1; Co2) je bila usmjerena prema određivanju nekoliko značajnih spojeva, osobito derivata metilksantina (tablica 39). Najzastupljeniji derivat metilksantina je teobromin (93,11 mg kg^{-1}; 85,30 mg kg^{-1}), a potom kofein (83,59 mg kg^{-1}; 67,25 mg kg^{-1}). Reprezentativni HPLC-DAD kromatogrami Co1 i Co2 uzoraka meda *Coffea* spp. prikazani su na slikama 11 i 12. Iako je prisustvo navedenih metilksantina očekivano s obzirom na rezultate GC-MS/FID analize ekstrakata, ipak visoka koncentracija teobromina nije očekivana. Nadalje, HPLC-DAD analizom ekstrakata pronađen je i teofilin, ali u iznimno niskim koncentracijama (Co2) ili u tragovima (Co1).

Kretschmar i Baumann (1999) navode nizak sadržaj teobromina (1–6 nmol g^{-1}) u medu, kao i u odgovarajućem nektaru vrsta roda *Citrus* (0–22 nmol mL^{-1}) [161]. Stoga se teobromin može smatrati kemijskim markerom za med *Coffea* spp. Kofein je pronađen u medu *Citrus* spp. različitog zemljopisnog podrijetla, ali u manjim koncentracijama u usporedbi sa rezultatima analize uzoraka Co1 i Co2. Koncentracija kofeina u medu *Citrus* spp. iznosi oko 1-10 mg kg^{-1} [260]. Vacca i Fenu (1996) te Vacca i suradnici (1997) navode rezultate o prisutnosti kofeina u medu i cvijetu agruma, gdje je prosječna koncentraciju kofeina u medu od agruma 1,79 mg kg^{-1}, a u narančinom medu 4,93 mg kg^{-1} [261,262]. U svom istraživanju Kretschmar i Baumann (1999) za med od agruma navode koncentraciju kofeina od 0,39 do 6,02 mg kg^{-1} [161]. Također,

kofein je pronađen u 80% poliflornih uzoraka meda iz različitih područja Palestine, sa vrijednostima koncentracija u rasponu od 0,094 do 3,583 mg kg^{-1}, odnosno prosječnom vrijednošću od 1,567 mg kg^{-1} [263]. Usporedbom sadržaja kofeina u nektaru i medu *Citrus* vrsta, Kretschmar i Baumann (1999) zaključuju da se oko 95% kofeina iz nektara uklanja ili razgrađuje nepoznatim mehanizmom [161].

Svi ksantini su produkti metabolizma purina. Podrijetlo kofeina, teobromina i teofilina je usko vezano sa biosintezom purinskih baza adenina i gvanina, koji predstavljaju osnovne komponenete nukleozida, nukleotida i nukleinskih kiselina [96]. Kofein se sintetizira iz ksantozina, koji se izvodi iz purinskih nukleotida. Glavni put biosinteze kofeina uključuje ksantozin → 7-metilksantozin → 7-metilksantin → teobromin → kofein (slika 20) [96,264].



Slika 20. Shematski prikaz biosinteze kofeina iz ksantozina; SAM (*S*-adenozil-L-metionin); preuzeto i prilagođeno iz Dewick, 2002. [96]

Od ostalih spojeva određenih HPLC analizom uzoraka (Co1; Co2), kojična kiselina (8,87 mg kg^{-1}; 20,30 mg kg^{-1}) je također važna za karakterizaciju *Coffea* spp. meda. Oelschlaegel i suradnici (2012) su u novozelandskom manuka medu prvi put identificirali kojičnu kiselinu (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4*H*-piran-4-on; 0,13-125 mg kg^{-1}) [125], a navedena kiselina je korisna za razlikovanje manuka meda od ostalih istraživanih vrsta meda

[5,125]. Kojična kiselina je produkt razgradnje ugljikohidrata, prvenstveno glukoze, preko glukonolaktona i laktona 3-ketoglukonske kiseline [125]. Lumikrom je pronađen samo u uzorku Co2 (tablica 39), te može ukazivati na doprinos drugog interferirajućeg nektara.

U uzorcima *Coffea* spp. meda (Co1; Co2) su, primjenom ciljane HPLC-DAD analize, određene aminokiseline tirozin (359,43 mg kg^{-1}; 452,0 mg kg^{-1}) i fenilalanin (363,49 mg kg^{-1}; 691,91 mg kg^{-1}). Budući da aminokiseline predstavljaju prekursore određenih organskih isparljivih spojeva, mnogi autori dovode u vezu sadržaj aminokiselina i aromatičnih spojeva meda [123,172]. S obzirom na visoku koncentraciju fenilacetaldehida u vršnim parama uzoraka Co1 i Co2, povećan sadržaj fenilalanina u navedenim uzorcima je očekivan, budući da je fenilalanin prekursor fenilacetaldehida (poglavlje 5.1.7, slika 17). Sadržaj tirozina je sličan u oba uzorka, dok je sadržaj fenilalanina znatno veći u uzorku Co2. Smanjen sadržaj fenilalanina u uzorku Co1 je popraćen većim postotkom fenilacetaldehida u Co1, što može dodatno ukazati na biosintetsko podrijetlo fenilacetaldehida iz fenilalanina. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, P. M. Kuś, Z. Marijanović i M. Kranjac, 2014. [162].

5.6. Enantioselektivna HPLC analiza

Izravna HPLC-DAD analiza neisparljivih spojeva meda *Galactites tomentosa* Moench. je prethodno objavljena [124], kao i analiza isparljivih i poluisparljivih spojeva primjenom spregnute GC-MS/FID tehnike [265]. U navedenim istraživanjima, analizom neisparljivih spojeva uzoraka meda identificirana je 3-fenilmliječna kiselina u visokim koncentracijama (418,6 mg kg^{-1}), a u pentan:dietil-eterskim ekstraktima predstavlja glavni spoj (77,4-86,4%). Međutim, u dostupnoj literaturi se ne navodi koji je enantiomer 3-fenilmliječne kiseline prisutan u *Galactites tomentosa* Moench. vrsti meda. Stoga je u cilju detaljne karakterizacije određena optička čistoća prisutne 3-fenilmliječne kiseline enantioselektivnom HPLC analizom ekstrakata *Galactites tomentosa* Monech. meda primjenom CD/UV i polarimetrijskog (OR) detektora.

Kromatografsko (HPLC) razdvajanje enantiomera (±)-3-fenilmliječne kiseline je prethodno provedeno primjenom Chiralcel OJ-H kolone (4,6 mm × 250 mm, 5 μm) koja se zasniva na celuloza *tris*-(4-metil-benzoat) kiralnom selektoru [266]. U spomenutom istraživanju je kao mobilna faza korištena smjesa *n*-heksana i propan-2-ola u omjeru 90:10 sa 0,1% trifluoroctene kiseline. U drugom istraživanju je korištena Chiralpak AD kolona (4,6 mm × 250 mm, 10 μm) zasnovana na amiloza tris-(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiralnom selektoru, a

korištena mobilna faza bila je heptan/propan-2-ol/trifluoroctena kiselina (90:10:0.1) [267]. Budući da prisustvo kiseline može uzrokovati nastanak nepoželjnih artefakata u izvornom uzorku, u ovom istraživanju je upotrijebljena mobilna faza bez kiseline. Preliminarno istraživanje razdvajana standardne racemične smjese (±)-3-fenilmliječne kiseline je provedeno na Chiralpak AD-H koloni (4,6 mm × 250 mm, 5 μm) sa kiralnim selektorom amiloza tris-(3,5-dimetilfenilkarbamat) i postignuto je samo djelomično razdvajanje enantiomera (mobilna faza: 10% propan-2-ol u *n*-heksanu). Potpuno razdvajanje enantiomera (±)-3-fenilmliječne kiseline je postignuto korištenjem Chirallica PST-4 (4,6 mm×250 mm) kolone sa amiloza *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamat) kiralnim selektorom, primjenom kromatografije normalnih faza (10% propan-2-ol u *n*-heksanu).

Iz prikazanih kromatograma u rezultatima ovog rada (slika 13) je vidljivo da je intenzitet polarimetrijskog signala (OR) gotovo dvostruko veći u usporedbi sa signalom dobivenim UV detekcijom. Stoga je polarimetrijska detekcija odabrana za određivanje enantiomerne čistoće 3-fenilmliječne kiseline u ekstraktima meda. Nakon određivanja prikladnih uvjeta razdvajanja enenatiomera na Chirallica PST-4 koloni, provedena je analiza ekstrakata meda. Analizom je dobivena visoka enantiomerna čistoća 3-fenilmliječne kiseline (enantiomerni višak, e.v. > 95%) u svim ekstraktima, sa prevladavajućim (-)-enantiomerom (slika 14). S obzirom da je prevladavajući enantiomer pokazao negativni predznak optičke rotacije, usporedbom sa literaturnim podacima pridružena mu je (*S*) apsolutna konfiguracija [268]. Svi kromatogrami dobiveni analizom ekstrakata jasno pokazuju isključivu dominaciju (-)-enantiomera 3-fenilmliječne kiseline, dok drugi (+)-enantiomer nije detektiran ni u jednom uzorku. S obzirom na osjetljivost polarimetrijskog detektora, može se procijeniti da je vrijednost enantiomernog viška veća od 95%. Kako bi se dobila jasnija slika, uz kromatograme dobivene analizom ekstrakata prikazani su i kromatogrami standardnog racemata dobiveni primjenom OR (slika 14a) i UV (slika 14b) detektora. Dodatno se može primijetiti da su u uzorcima detektirane i druge kiralne molekule, ali sa mnogo manjim odzivom detektora i bez interferiranja sa signalima dobivenim za enantiomere 3-fenilmliječne kiseline. Podrijetlo optički čiste (-)-3-fenilmliječne kiseline u uzorcima meda može se povezati sa prirodno prisutnim L-fenilalaninom u medu. Naime, kataboličkim reakcijama L-fenilalanina nastaju organski spojevi sa fenilnom skupinom. Aminotransferaze i dehidrogenaze su ključni enzimi uključeni u pretvorbu L-fenilalanina do 3-fenilpirogrožđane kiseline i 3-fenilmliječne kiseline reakcijama transaminacije i redukcije [269]. Dio rezultata je objavljen u radu I. Jerković, M. Roje, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, A. Kasum i M. Obradović, 2014. [265].

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih u ovom istraživanju mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Primjena različitih metoda ekstrakcije (USE, ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom; SPME, mikroekstrakcija na krutoj fazi; SPE ekstrakcija na krutoj fazi) i analize (GC, plinska kromatografija, HPLC, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) se pokazala pogodnom za bioorganska istraživanja uniflornih vrsta meda. Navedeni pristup omogućuje dobivanje potpunijih kemijskih profila s ciljem karakterizacije različitih vrsta meda i identifikacije potencijalnih kemijskih markera botaničkog podrijetla.

- Primjena HS-SPME-GC-MS/FID metode je potvrdila prisustvo nitrila u vršnim parama *Taraxacum officinale* Weber meda. Pored nitrila, drugi značajni spojevi vršnih para identificirani u manjem postotku su razgranate alifatske kiseline i norizoprenoidi. Feniloctena kiselina i dehidrovomifoliol su glavni spojevi USE i SPE ekstrakata. Za razliku od feniloctene kiseline, dehidrovomifoliol se može smatrati karakterističnim spojem za med od maslačka.

- Istraživanjem isparljivih spojeva meda *Coriandrum sativum* L. dobiveni su neuobičajeni kromatografski profili karakterizirani prisustvom derivata linaloola te oksidiranih metoksibenzena, koji mogu poslužiti za razlikovanje meda korijandra od drugih vrsta meda. Među identificiranim spojevima, može se istaknuti nekoliko korisnih kemijskih markera meda od korijandra, posebno izomeri anhidrolinalool oksida i 3,4,5-trimetoksibenzil-alkohol. Zastupljenost linalool derivata se može smatrati karakteristikom vršnih para meda od korijandra, kemijskog sastava sličnog sastavu vršnih para meda od agruma, ali bez metil-antranilata. Prevladavajući spojevi identificirani u ekstraktima su oksidirani derivati metoksibenzena među kojima se može istaknuti 3,4,5-trimetoksibenzil-alkohol kao specifičan kemijski marker, budući da do sada nije pronađen u drugim vrstama meda.

- U kemijskim profilima isparljivih spojeva meda *Trifolium pratense* L. dobivenih primjenom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi i ultrazvučne ekstrakcije otapalima nisu pronađeni specifični kemijski markeri botaničkog podrijetla. Za razliku od USE kemijskih profila u kojima se većina identificiranih spojeva može povezati sa sastavom saća, najzastupljeniji spojevi u profilu vršnih para, terpeni i derivati benzena,

su korisni za karakterizaciju *T. pratense* meda. Visok postotak aldehida jorgovana zajedno sa fenilacetaldehidom i benzaldehidom u vršnim parama se može smatrati karakterističnim obilježjem kemijskog profila meda *Trifolium pratense* L.

- Glavni spojevi identificirani u vršnim parama meda *Satureja subspicata* Vis. su fenilacetaldehid i benzaldehid, koji ne mogu poslužiti kao specifični kemijski markeri botaničkog podrijetla. Usporedbom sa ostalim vrstama meda roda *Satureja*, postotak ovih derivata benzena je znatno veći u vršnim parama meda *S. subspicata* Vis. HPLC-DAD i USE-GC-MS/FID analizom uzoraka meda *Satureja subspicata* Vis. su, osim metil-siringata, u manjem postotku identificirani i drugi derivati prefenata. Primijećena je značajna sličnost sa kemijskim profilom ekstrakata meda *Satureja montana* L., u kojem je također identificiran metil-siringat, uz prisustvo siringaldehida i benzojeve kiseline.

- Primjenom HS-SPME-GC-MS/FID i USE-GC-MS/FID metoda dobiveni su detaljni kemijski profili isparljivih spojeva meda *Satureja montana* L. Visok udio hotrienola u vršnim parama te metil-siringata i siringaldehida u ekstraktima je karakteristika isparljivog profila meda *S. montana*. Izravnom HPLC analizom uzoraka meda *S. montana* određeni su derivati sinapinske kiseline: metil-siringat i siringinska kiselina.

- Primjena GC-FID/MS i HPLC-DAD metoda omogućila je identifikaciju potencijalnih nespecifičnih kemijskih markera hotrienola u vršnim parama i metil-siringata u ekstraktu i medu *Satureja hortensis* L. Odsustvo siringinske kiseline i siringaldehida može poslužiti za razlikovanje navedene vrste meda od ostalih *Satureja* vrsta meda. Također, za razliku od meda *S. hortensis*, izomeri aldehida jorgovana nisu identificirani u vršnim parama meda *S. montana* i *S. subspicata*.

- HPLC-DAD metoda se pokazala korisna te nadopunjuje i potvrđuje dobivene GC-MS/FID rezultate kemijskog profiliranja uzoraka meda *Satureja* vrsta. Metil-siringat je glavni spoj identificiran GC-MS/FID analizom ekstrakata različitih vrsta meda roda *Satureja* i može se istaknuti kao nespecifičan kemijski marker. Međutim, HPLC-DAD analizom uzoraka meda *Satureja subspicata* Vis. pronađen je 3-4 puta viši sadržaj metil-siringata u usporedbi sa drugim *Satureja* vrstama meda. Stoga se metil-siringat može

istaknuti kao važan spoj za razlikovanje *S. subspicata* meda od *S. montana* i *S. hortensis* vrsta meda.

- Teobromin i kofein, kao i prisustvo kojične kiseline u uzorcima Co1 i Co2 može poslužiti za utvrđivanje botaničkog podrijetla *Coffea* spp. meda. Kofein je lipofilniji od teobromina i stoga je ekstrahiran primjenom USE sa organskim otapalima, dok je teobromin u ekstraktima prisutan samo u niskim postotcima. Međutim, HPLC-DAD analizom uzoraka meda od kave utvrđeno je da je teobromin zastupljeniji od kofeina.

- Prema rezultatima HPLC analize na kiralnoj stacionarnoj fazi, (-)-3-fenilmliječna kiselina je prevladavajući enantiomer ekstrakata *Galactites tomentosa* Moench. meda. Visoka enantiomerna čistoća navedenog kemijskog markera može poslužiti u karakterizaciji i utvrđivanju botaničkog podrijetla *G. tomentosa* meda.

- Usporedbom sastava isparljivih spojeva istraživanih vrsta meda sa sastavom eteričnog ulja odgovarajuće biljke iz dostupne literature, primijećeno je da gotovo nema sličnosti, što je u skladu sa drugim istraživanjima.

- Zbog značajnih razlika u sastavu vršnih para i ekstrakata meda, pristup koji uključuje više različitih ekstrakcijskih metoda se pokazao pogodnim. Svaka od primijenjenih metoda izolacije doprinosi karakterizaciji istraživanih uzoraka meda. Iako profili vršnih para predstavljaju važnu karakteristiku meda, USE ekstrakti otkrivaju druge potencijalne kemijske markere poput dehidrovomifoliola, metil-siringata, kofeina, teobromina, koji zbog slabe isparljivosti nisu identificirani u vršnim parama.

7. LITERATURA

1. L. Boukra (ur.), *Honey in Traditional and Modern Medicine,* CRC Press, Boca Raton, 2013.
2. L. Castro-Vázquez, M. C. Díaz-Maroto, M. A. González-Viñas, i M. S. Pérez-Coello, *Food Chem.*, **112** (2009) 1022–1030.
3. I. Jerković i P. M. Kuś, *RSC Adv.* **4** (2014) 31710–31728.
4. L. Castro-Vázquez, M. C. Díaz-Maroto, i M. S. Pérez-Coello, *Food Chem.* **103** (2007) 601–606.
5. N. Beitlich, I. Koelling-Speer, S. Oelschlaegel, i K. Speer, *J. Agric. Food Chem.* **62** (2014) 6435–6444.
6. *Codex Alimentarius Comission Standards,* u: *Standard for Honey CODEX STAN 12-1981*; (2001), FAO
7. *Pravilnik o medu,* u: *Narodne novine,* NN 53/2015, Ministarstvo poljoprivrede, 2015
8. Direktiva vijeća 2001/110/EZ, u: Službeni list europske unije, **30** (2002) 142–147.
9. E. Anklam, *Food Chem.* **63** (1998) 549–562.
10. J. M. Alvarez-Suarez, M. Gasparrini, T. Y. Forbes-Hernández, L. Mazzoni, i F. Giampieri, *Food Chem.* **3** (2014) 420–432.
11. *Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda*, u: *Narodne novine*, NN 20/2000, Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva, 2000.
12. W. Von Der Ohe, L. Persano Oddo, M. L. Piana, M. Morlot, i P. Martin, *Apidologie* **35** (2004) 18–25.
13. K. Ruoff, *Authentication of the Botanical Origin of Honey*, Doktorski rad (2006), 203 str.
14. L. Perasno Oddo i R. Piro, *Apidologie* **35** (2004) 38–81.
15. L.W. Doner, Honey, u: B. Caballero (ur.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, 2013, str. 1689–1699.
16. T. Cajka i J. Hajslova, *Volatile Compounds in Food Authenticity and Traceability Testing, u:* H. Jelen (ur.), *Food Flavors Chemical, Sensory and Technological Properties*, CRC Press, Boca Raton, 2012, str. 355-411.
17. H-D. Belitz, W. Grosch, i P. Schieberle, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 2009
18. L. Castro-Vázquez, M. C. Díaz-Maroto, M. A. González-Viñas, E. de la Fuente, i M. S. Pérez-Coello, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 1999–2006.
19. J. M. Alvarez-Suarez, F. Giampieri, i M. Battino, *Curr. Med. Chem.* **20** (2013) 621–638.
20. C. Pita-Calvo i M. Vazquezz, *Trends Food Sci. Technol.* **59** (2017**)** 79–87.

21. A. Lazaridou, C. G. Biliaderis, N. Bacandritsos, i A. G. Sabatini, *J. Food Eng.* **64** (2004) 9–21.
22. S. Yanniotis, S. Skaltsi, i S. Karaburnioti, *J. Food Eng.* **72** (2006) 372–377.
23. S. Bogdanov (2011) *Physical Properties of Honey*, Bee-Hexagon, http://www.bee-hexagon.net/honey/physical-properties-honey/ (pristupljeno 22. rujna 2017.)
24. I. S. Arvanitoyannis, C. Chalhoub, P. Gotsiou, N. Lydakis-Simantiris, i P. Kefalas, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45** (2005) 193–203.
25. F. K. G. dos Santos, A. N. D. Filho, R. H. L. Leite, E. M. M. Aroucha, A. G. Santos, i T. A. Oliveira, *An. Acad. Bras. Cienc.* **86** (2014), 981–994.
26. S. Bogdanov, K. Ruoff, i L. P. Oddo, *Apidologie* **35** (2004) 4–17.
27. A. S. Alqarni, A. A. Owayss, A. A. Mahmoud, i M. A. Hannan, *J. Saudi Chem. Soc.* **18** (2014) 618–625.
28. K. Brudzynski, *Melanoidins: Emerging Novel Understanding on the Mechanism of Antioxidant and Antibacterial Action of Honey Antioxidant Activity of Honey*, u: Juraj Majtan (ur.), Honey: Current Research and Clinical Applications, Nova Science Publishers, 2012, str. 18–38.
29. J. McKibben i N. J. Engeseth, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 592–595.
30. J. M. Alvarez-Suarez, S. Tulipani, D. Díaz, Y. Estevez, S. Romandini, F. Giampieri, E. Damiani, P. Astolfi, S. Bompadre, i M. Battino, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 2490–2499.
31. I. C. F. R. Ferreira, E. Aires, J. C. M. Barreira, i L. M. Estevinho, *Food Chem.* **114** (2009) 1438–1443.
32. P. M. Da Silva, C. Gauche, L. V. Gonzaga, A. C. O. Costa, i R. Fett, *Food Chem.* **196** (2016) 309–323.
33. E. Schievano, E. Morelato, C. Facchin, i S. Mammi, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 1747–1755.
34. B. R. D'Arcy (2005) *Antioxidants in Australian Floral Honeys*, AgriFutures Australia, http://www.agrifutures.com.au/publications/antioxidants-in-australian-floral-honeys/ (pristupljeno 19.9.2017.)
35. E. de la Fuente, M. L. Sanz, I. Mart, i J. Sanz, *J. Chromatogr. A* **1135** (2006) 212–218.
36. R. Consonni, L. R. Cagliani, i C. Cogliati, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 4526–4534.
37. J. M. Alvarez-Suarez, S. Tulipani, S. Romandini, E. Bertoli, i M. Battino, *Med. J. Nutrition Metab.* **3** (2010) 15–23.

38. A. I. Ruiz-Matute, M. Brokl, A. C. Soria, M. L. Sanz, i I. Martínez-Castro, *Food Chem.* **120** (2010) 637–642.
39. C. Pita-Calvo, M. E. Guerra-Rodríguez, i M. Vázquez, *J. Agric. Food Chem.* **65** (2017) 690-703
40. A. M. G. Paramás, J. A. G. Bárez, C. C. Marcos, R. J. García-Villanova, i J. S. Sánchez, *Food Chem.* **95** (2006) 148–156.
41. M. T. Iglesias, C. de Lorenzo, M. D. C. Polo, P. J. Martín-Álvarez, i E. Pueyo, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 84–89.
42. I. Mato, J. F. Huidobro, J. Simal-Lozano, i M. T. Sancho, *J. Food Prot.* **66** (2003) 2371–2376.
43. M. Ciulu, N. Spano, M. Pilo, i G. Sanna, *Molecules* **21** (2016) 451.
44. S. Bogdanov, M. Haldimann, W. Luginbühl, i P. Gallmann, *J. Apic. Res.* **46** (2007) 269–275.
45. M. Solayman, M. A. Islam, S. Paul, Y. Ali, M. I. Khalil, N. Alam, i S. H. Gan, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15 (**2016) 219–233.
46. B. Plutowska, T. Chmiel, T. Dymerski, i W. Wardencki, *Food Chem.* **126** (2011) 1288–1298.
47. B. Radovic, M. Careri, A. Mangia, M. Musci, M. Gerboles, i E. Anklam, *Food Chem.* **72** (2001), 511–520.
48. V. Kaškonienė i P. R. Venskutonis, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9** (2010) 620–634.
49. I. Jerković i Z. Marijanović, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **1** (2009) 28–34.
50. S. Bogdanov (2014) *Honey composition*, Bee-Hexagon, http://www.bee-hexagon.net/honey/honey-compostion/ (pristupljeno 24. svibnja 2017.)
51. D. Rowe (ur.), *Chemistry and Technology of Flavours and Fragnances*, Blackwell Publishing, Oxfordshire, 2005.
52. J. Rückriemen, U. Schwarzenbolz, S. Adam, i T. Henle, *J. Agric. Food Chem.* **63** (2015) 8488–8492.
53. J. S. Bonvehi i F. V. Coll, *J. Sci. Food Agric.* **83** (2003) 275–282.
54. A. P. Gonzales, L. Burin, M. D. P. Buera, *Food Res. Int.* **32** (1999) 185–191.
55. B. J. Daniels, G. Prijic, S. Meidinger, K. M. Loomes, J. M. Stephens, R. C. Schlothauer, D. P. Furkert, i M. A. Brimble, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 5079-5084.
56. P. H. S. Kwakman, A. A. te Velde, L. de Boer, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, i S. A. J. Zaat, *PLoS One* **6** (2011) 3–9.

57. C. E. Manyi-Loh, A. M. Clarke, i R. N. Ndip, *African J. Microbiol. Res.* **5** (2011) 844–852.
58. H. Koran, *Honey–Health and Therapeutic Qualities*, The National Honey Board, Longmont, str.1-28.
59. O. O. Erejuwa, S. A. Sulaiman, i M. S. Ab Wahab, *Molecules* **19** (2014) 2497–2522.
60. S. Patel i S. Cichello, *Nat. Products Bioprospect.* **3** (2013) 121–128.
61. I. Escriche, M. Kadar, M. Juan-Borrás, i E. Domenech, *Food Chem.* **142** (2014) 135–143.
62. J. A. Donarski, S. A. Jones, M. Harrison, M. Driffield, i A. J. Charlton, *Food Chem.* **118** (2010) 987–994.
63. F. Bianchi, A. Mangia, M. Mattarozzi, i M. Musci, *Food Chem.* **129** (2011) 1030–1036.
64. J. Louveaux, A. Maurizio, i G. Vorwohl, *Bee World* **51** (1970) 125–138.
65. J. Louveaux, A. Maurizio, i G. Vorwohl, *Bee World* **59** (1978) 139–157.
66. P. Molan, *Bee World* **79** (1998) 59–68.
67. J. M. Stephens, R. C. Schlothauer, B. D. Morris, D. Yang, L. Fearnley, D. R. Greenwood, i K. M. Loomes, *Food Chem.* **120** (2010) 78–86.
68. C. Y. Rowland, A. J. Blackman, B. R. D'Arcy, i G. B. Gavin, *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 753–763.
69. C. Fredes, G. Casaubon, i G. Montenegro, **83** (2014) 17–26.
70. I. Jerković, S. Prđun, Z. Marijanović, M. Zekić, D. Bubalo, L. Svečnjak, i C. I. G. Tuberoso, *Molecules* **21** (2016) 1-13.
71. J. Wang i Q. X. Li, *Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins*, u: Steve Taylor (ur.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 62, Academic Press, Elsevier, Walthman, 2011, str. 89-137.
72. Y. Li, Y. Jin, S. Yang, W. Zhang, J. Zhang, W. Zhao, L. Chen, Y. Wen, Y. Zhang, K. Lu, Y. Zhang, J. Zhou, i S. Yang, *J. Chromatogr. A* **1499** (2017) 78-89.
73. I. Jerković, *Synlett* **24** (2013) 2331–2334.
74. N. Beitlich, T. Lübken, M. Kaiser, L. Ispiryan, i K. Speer, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 8886–8891.
75. C. I. G. Tuberoso, E. Bifulco, P. Caboni, F. Cottiglia, P. Cabras, i I. Floris, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 384–389.
76. P. Cabras, A. Angioni, C. Tuberoso, I. Floris, F. Reniero, C. Guillou, i S. Ghelli, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 4064–7.

77. E. Schievano, M. Stocchero, E. Morelato, C. Facchin, i S. Mammi, *Metabolomics* **8** (2012) 679–690.
78. I. Špánik, A. Pažitná, P. Šiška, i P. Szolcsányi, *Food Chem.* **158** (2014) 497–503.
79. E. Melliou i I. Chinou, *Food Chem.* **129** (2011) 284–290.
80. I. Jerković, Z. Marijanović, C. I. G. Tuberoso, D. Bubalo, i N. Kezić, *Mol. Divers.* **14** (2010) 237–48.
81. I. Jerković, J. Mastelić, i Z. Marijanović, *Chem. Biodivers.* **3** (2006) 1307–1316.
82. J. Velísek, *The Chemistry of Food*, Wiley Blackwell, Chichester, 2014.
83. I. Jerković, G. Hegić, Z. Marijanović, i D. Bubalo, *Molecules* **15** (2010) 2911–24.
84. J. White i V. M. Bryant, J. *Agric. Food Chem.* **44** (1996) 3423–3425.
85. I. Blank, K. Fischer, W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **60** (1989) 426–433.
86. R. Naef, A. Jaquier, A. Velluz, B. Bachofen, *Chem. Biodivers.* **1** (2004) 1870–1879.
87. E. Alissandrakis, *Food Chem.* **82** (2003) 575–582.
88. O. Koprivnjak, A. G. Sabatini, i L. S. Conte, *Food Technol. Biotechnol.* **45** (2007) 156–165.
89. E. Alissandrakis, A. C. Kibaris, P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis, i M. Polissiou, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 1444–1452.
90. S. T. Tan, A. L. Wilkins, P. T. Holland, i T. K. McGhie, *J. Agric. Food Chem.* **37** (1989) 1217–1221.
91. C. Guyot, V. Scheirman, i S. Collin, *Food Chem.* **64** (1999) 3–11.
92. B. R. D´Arcy, G. B. Rintoul, C. Y. Rowland, A. J. Blackman, *J. Agric. Food. Chem.* **45** (1997) 1834–1843.
93. P. Winterhalter i R. Rouseff, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds* u: P. Winterhalter i R. Rouseff (ur.), *Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction*, CS Symposium Series, Vol. 802, American Chemical Society, Washington, 2001. str. 1–17.
94. S. T. Tan, A. L. Wilkins, P. T. Holland, i T. K. Mcghie, *J. Agric. Food Chem.* **38** (1990) 1833–1838.
95. P. M. Kuś, Z. Marijanović, i I. Jerković, *Chem. Nat. Compd.* **49** (2013) 961–964.
96. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2002.
97. E. de la Fuente, I. Martínez-Castro, i J. Sanz, *J. Sep. Sci.* **28** (2005) 1093–1100.
98. E. Alissandrakis, P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis, i M. Polissiou, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 91–97.

99. H. H. Jelen, M. Majcher, i M. Dziadas, *Anal. Chim. Acta* **738** (2012) 13–26.
100. I. Escriche, L. Sobrino-Gregorio, A. Conchado, i M. Juan-Borrás, *Food Chem.* **226** (2017) 61–68.
101. A. Verzera, S. Campisi, M. Zappalà, i I. Bonaccorsi, *Am. Lab*. **18** (2001) 18–21.
102. I. Jerković i Z. Marijanović, *Chem. Biodivers.* **7** (2010) 2309–2325.
103. L. Piasenzotto, L. Gracco, i L. Conte, *J. Sci. Food Agric.* **83** (2003) 1037–1044.
104. I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, M. Jelić, i A. Kasum, *Food Chem.* **112** (2009) 239–245.
105. C. Guyot, A. Bouseta, V. Scheirman, i S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 625-633.
106. D. Mannaş i T. Altuğ, *Int. J. Food Sci. Technol.* **42** (2007) 133–138.
107. I. Odeh, S. Abu-Lafi, H. Dewik, I. Al-Najjar, A. Imam, V. M. Dembitsky, i L. O. Hanuš, *Food Chem.* **101** (2007) 1393–1397.
108. E. Alissandrakis, P. Tarantilis, P. C. Harizanis, i M. Polissiou, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 8152–8157.
109. I. Jerković, P. M. Kuś, C. I. G. Tuberoso, i M. Šarolić, *Food Chem.* **145** (2014) 8–14.
110. S. Seisonen, E. Kivima, i K. Vene, *Food Chem.* **169** (2015) 34–40.
111. F. Bianchi, M. Careri, i M. Musci, *Food Chem.* **89** (2005) 527–532.
112. E. de la Fuente, M. L. Sanz, I. Martínez-Castro, J. Sanz, i A. I. Ruiz-Matute, *Food Chem.* **105** (2007) 84–93.
113. I. Jerković, C. I. G. Tuberso, M. Gugić, i D. Bubalo, *Molecules* **15** (2010) 6375–6385.
114. G. Montenegro, M. Gómez, G. Casaubon, A. Belancic, A. M. Mujica, i R. C. Peña, *Phyton* **78** (2009) 61–65.
115. I. Jerković, Z. Marijanović, i M. M. Staver, *Molecules* **16** (2011) 2507–2518.
116. E. Alissandrakis, P. A. Tarantilis, C. Pappas, P. C. Harizanis, i M. Polissiou, *LWT - Food Sci. Technol.* **44** (2011) 1042–1051.
117. E. Alissandrakis, P. A. Tarantilis, C. Pappas, P. C. Harizanis, M. Polissiou, *Eur. Food Res. Technol.* **229** (2009) 365–373.
118. J. Y. Cho, S. H. Bae, H. K. Kim, M. L. Lee, Y. S. Choi, B. R. Jin, H. J. Lee, H. J. Jeong, Y. G. Lee, i J. H. Moon, *J. Agric. Food Chem.* **63** (2015) 3587–3592.
119. A. D. Graddon, J. D. Morrison, i J. F. Smith, *J. Agric. Food Chem.* **27** (1979) 832–837.
120. I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, A. Kasum, i Z. Marijanović, *Chem. Biodivers.* **8** (2011) 587–598.

121. P. M. Kuś, I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, i F. Congiu, *Food Chem.* **142** (2014) 12–18.
122. I. Escriche, M. Visquert, M. Juan-Borrás, i P. Fito, *Food Chem.* **112** (2009) 329–338.
123. A. Bouseta, V. Scheirman, i S. Collin, *J. Food Sci.* **61** (1996) 683–687.
124. C. I. G. Tuberoso, E. Bifulco, P. Caboni, G. Sarais, F. Cottiglia, i I. Floris, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 364–369.
125. S. Oelschlaegel, M. Gruner, P. N. Wang, A. Boettcher, I. Koelling-Speer, i K. Speer, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 7229–7237.
126. E. de la Fuente, R. M. Valencia-Barrera, I. Martínez-Castro, i J. Sanz, *Food Chem.* **103** (2007) 1176–1180.
127. A. Pažitná, A. Janáčová, i I. Špánik, *J. Food Nutr. Res.* **51** (2012) 236–241.
128. A. Verzera, G. Tripodi, C. Condurso, G. Dima, i A. Marra, *Food Control* **39** (2014) 237–243.
129. A. Rocco, Z. Aturki, i S. Fanali, *Trends Anal. Chem.* **52** (2013) 206–225.
130. K. Petrus, H. Schwartz, G. Sontag, *Anal. Bioanal. Chem.* **400** (2011) 2555–2563.
131. R. J. Weston, L. K. Brocklebank, i Y. Lu, *Food Chem.* **70** (2000) 427–435.
132. I. Martos, F. Ferreres, i F. A. Tomás-Barberán, F. A., *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 1498–1502.
133. A. M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, i A. Fernández-Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 1220–1234.
134. F. A. Tomás-Barberán, I. Martos, F. Ferreres, B. S. Radovic, i E. Anklam, *J. Sci. Food Agric.* **81** (2001) 485–496.
135. L. Yao, N. Datta, F. A. Tomás-Barberán, F. Ferreres, I. Martos, i R. Singanusong, *Food Chem.* **81** (2003) 159–168.
136. F. Ferreres, C. García-Viguera, F. Tomás-Lorente, i F. A. Tomás-Barberán, *J. Sci Food Agric* **61** (1993) 121–123.
137. P. Andrade, F. Ferreres, M. I. Gil, i F. A. Tomás-Barberán, *Food Chem.* **60** (1997) 79–84.
138. P. Andrade, F. Ferreres, i M. T. Amaral, *J. Liq. Chrom & Rel. Technol.* **20** (1997) 2281–2288.
139. I. Jasicka-Misiak, E. Makowicz, i N. Stanek, *Molecules* **22** (2016) 1-14.
140. A. Cavazza, C. Corradini, M. Musci, i P. Salvadeo, *J. Sci. Food Agric.* **93** (2013) 1169–1175.

141. I. Martos, F. Ferreres, L. Yao, B. D'Arcy, N. Caffin, i F. A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 4744–4748.
142. D. Kenjerić, M. L. Mandić, L. Primorac, i F. Čačić, *Food Chem.* **110** (2008) 187–192.
143. M. I. Gil, F. Ferreres, A. Ortiz, E. Subra, i F. A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 2833–2838.
144. F. Ferreres, P. Andrade, M. I. Gil, i F. A. Tomás-Barberán, *Z Lebnsm Unters Forsch* **202** (1996) 40–44.
145. M. E. Güneş, S. Şahin, C. Demir, E. Borum, i A. Tosunoğlu, *J. Food Biochem.* (2016) 1-12.
146. I. Jasicka-Misiak, A. Poliwoda, M. Dereń, i P. Kafarski, P., *Food Chem.* **131** (2012) 1149–1156.
147. E. De La Fuente, A. I. Ruiz-Matute, R. M. Valencia-Barrera, i J. Sanz, I. Martínez Castro, *Food Chem.* **129** (2011) 1483–1489.
148. M. Brokl, A. C. Soria, A. I. Ruiz-Matute, M. L. Sanz, i L. Ramos, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 11561–11567.
149. M. L. Sanz, J. Sanz, i I. Martínez-Castro, *J. Chromatogr. A* **1059** (2004) 143–148.
150. J. F. Cotte, H. Casabianca, S. Chardon, J. Lheritier, i M. F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.* **380** (2004) 698–705.
151. R. Mateo i F. Bosch-Reig, *Food Chem.* **60** (1997) 33-41.
152. K. W. Swallow i N. H. Low, *J. Agric. Food Chem.* **38** (1990) 1828–1832.
153. R. J. Weston i L. K. Brocklebank, *Food Chem.* **64** (1999) 33–37.
154. I. Hermosin, R. M. Chicon, i M. D. Cabezudo, *Food Chem.* **83** (2003) 263–268.
155. L. S. Conte, M. Miorini, A. Giomo, G. Bertacco, R. Zironi, *J. Agric. Food Chem.* **8561** (1998) 1844–1849.
156. J. F. Cotte, H. Casabianca, B. Giroud, M. Albert, J. Lheritier, i M. F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.* **378** (2004) 1342–1350.
157. Z. Sun, L. Zhao, N. Cheng, X. Xue, L. Wu, J. Zheng, i W. Cao, *J. Pharm. Anal.* **7** (2017) 317-323.
158. A. Pirini, L. S. Conte, O. Francioso, i G. Lercker, *J. High Resolut. Chromatogr.* **15** (1992) 165–170.
159. P. Truchado, I. Martos, L. Bortolotti, A. G. Sabatini, F. Ferreres, i F. A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 5680–5686.
160. G. Beretta, R. Artali, E. Caneva, S. Orlandini, M. Centini, i R. M. Facino, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 432–439.

161. J. A. Kretschmar i T. W. Baumann, *Phytochemistry* **52** (1999) 19–23.

162. I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, P. M. Kuś, Z. Marijanović, i M. Kranjac, *RSC Adv.* **4** (2014) 60557–60562.

163. P. A. S. Tette, L. R. Guidi, E. M. A. F. Bastos, C. Fernandes, i M. B. A. Gloria, *Food Chem.* **229** (2017) 527–533.

164. E. Schievano, C. Finotello, J. Uddin, S. Mammi, i L. Piana, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 3645–3652.

165. C. I. G. Tuberoso, I. Jerković, E. Bifulco, Z. Marijanović, F. Congiu, i D. Bubalo, *Food Chem.* **135** (2012) 1985–1990.

166. C. I. G. Tuberoso, I. Jerković, E. Bifulco, i Z. Marijanović, *Chem. Biodivers.* **8** (2011) 872–879.

167. B. Lin, K. M. Loomes, G. Prijic, R. Schlothauer, i J. M. Stephens, *Food Chem.* **225** (2017) 175–180.

168. E. Schievano, C. Finotello, S. Mammi, A. Belci, S. Colomban, i L. Navarini, *J. Agric. Food Chem.* **63** (2015) 5858–5863.

169. M. J. del Nozal, J. L. Bernal, P. Marinero, J. C. Diego, J. I. Frechilla, M. Higes, i J. Llorente, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **21** (1998) 3197–3214.

170. A. L.Wilkins, Y. Lu, i S-T. Tan, *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 3021–3025.

171. G. Beretta, E. Caneva, L. Regazzoni, N. G. Bakhtyari, i R. M. Facino, *Anal. Chim. Acta* **620** (2008) 176-182.

172. F. Pasini, S. Gardini, G. L. Marcazzan, i M. F. Caboni, *Food Chem.* **141** (2013) 2802–2811.

173. L. Yaoa, Y. Jiang, R. Singanusong, N. Datta, i K. Raymont, *Food Res. Int.* **38 (**2005) 651–658.

174. F. Ferreres, P. Andrade, i F. A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chemestry* **44** (1996) 2053–2056.

175. U. M. Gašić, M. M. Natić, D. M. Mišić, D. V. Lušić, D. M. Milojković-Opsenica, Ž. Lj. Tešiš, i D. Lušić, *J. Food Compos. Anal.* **44** (2015) 128–138.

176. P. Truchado, F. Ferreres, L. Bortolotti, A. G. Sabatini, i F. A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 8815–8824.

177. P. Truchado, F. Ferreres, i F. A. Tomás-Barberán, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 7241–7248.

178. P. Truchado, E. Tourn, L. M. Gallez, D. A. Moreno, F. Ferreres, F. A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 12678–12685.

179. Y. Kato, N. Umeda, A. Maeda, D. Matsumoto, N. Kitamoto, i H. Kikuzaki, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 3418–3423.
180. E. Frérot, A. Velluz, E. Decorzant, i R. Naef, *Chem. Biodivers*. **3** (2006) 94–100.
181. P. Pohl, A. Bielawska-Pohl, A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, M. Welna, A. Lesniewicz, i A. Szymczycha-Madeja, *Trends Anal. Chem.* **93** (2017) 67-77.
182. M. L. González-Miret, A. Terrab, D. Hernanz, M. Á. Fernández-Recamales, i F. J. Heredia, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 2574–2580.
183. M. Chudzinska i D. Baralkiewicz, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 284–290.
184. P. Pohl, *Trends Anal. Chem.* **28** (2009) 117–128.
185. *FloraCatalana.net*, http://www.floracatalana.net/taraxacum-officinale-weber-in-wiggers (pristupljeno 31.10.2017.)
186. D. Kuštrak, *Farmakognozija-fitofarmacija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005.
187. D. Dinkov i T. Ivanov (2009), Sensorial characteristics and composition of Bulgarian's coriander (*Coriandrum sativum* L.) honey., u: *Proceedings of Apimondia Congress*, 41st Apimondia Congress, 2009, Montpellier, str. 1–11.
188. D. Kuštrak, *Morfološka i mikroskopska analiza začina*, Golden marketing -Tehnička knjiga, Zagreb, 2014.
189. *AgroAtlas,* http://www.agroatlas.ru/en/content/cultural/Trifolium_pratense_K/ (pristupljeno 1. siječnja 2017.)
190. *Priroda i biljke*, http://www.plantea.com.hr/crvena-djetelina/# (pristupljeno 1. siječnja 2017.)
191. S. Bolarić, *Agronomski glasnik* **3** (2009) 225–236.
192. *Gardens Navigator*, http://navigate.botanicgardens.org/weboi/oecgi2.exe/INET_ECM_DispPl?NAMENUM=16077#images (pristupljeno 1. siječnja 2017.)
193. D. Bubalo (2014), *Medonosne paše na području Hrvatske*, u: Panonska pčela, Europska unija, str. 1-74.
194. *Acta plantarum*, http://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=6832&pid=-1&p=3. (pristupljeno 1. siječnja 2017.)
195. *Acta plantarum*, http://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=6831&pid=-1&p=1 (pristupljeno 1. siječnja 2017.)
196. *Oxford Plants* 400, http://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/profiles/CD/Coffeaarabica (pristupljeno 1. siječnja 2017.)

197. C. Perrois, S. R. Strickler, G. Mathieu, M. Lepelley, L. Bedon, S. Michaux, J. Husson, L. Mueller, i I. Privat, *Planta* **241** (2014) 179–191.

198. *Rainforest Alliance*, https://www.rainforest-alliance.org/species/coffee (pristupljeno 2. studenog 2017.)

199. *Acta plantarum*, http://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=3337&pid=-1&p=3 (pristupljeno 1. siječnja 2017.)

200. *Plants For A Future*, http://pfaf.org/User/Plant.aspx?LatinName=Galactites+tomentosa (pristupljeno 2. studenog 2017.)

201. K. von der Ohe i W. von der Ohe, *Celle's Mellisopalynological Collection*, Cellle: Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, 2003.

202. G. Ricciardelli D'Albore, *Mediterranean melissopalynology*, Università degli studi di Perugia, Facoltà di agraria, Istituto di entomologia agraria, 1998.

203. L. Persano Oddo, M. G. Piazza, A. G. Sabatini, i M. Accorti, *Apidologie* **26** (1995) 453–465.

204. *Pravilnik o kakvoći uniflornog meda*, u: Narodne novine, NN 122/2009, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2009.

205. I. Floris, A. Satta, i L. Ruiu, *J. Apic. Res.* **46** (2007) 198–209.

206. R. A. Meyers (ur.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 1999-2014.

207. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 2000.

208. J. S. Fritz, *Analytical Solid-Phase Extraction*, Wiley-VCH, New York, 1999.

209. El-Sayed AM (2017) *The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals,* http://www.pherobase.com (pristupljeno 1. siječnja 2017).

210. A. C. Soria, I. Martínez-Castro, C. de Lorenzo, i J. Sanz, *Food Chem.* **107** (2008) 439–443.

211. M. E. Daxenbichler, G. F. Spencer, D. G. Carlson, G. B. Rose, A. M. Brinker, i R. G. Powell, *Phytochemistry* **30** (1991) 2623–2638.

212. I. Jerković, Z. Marijanović, M. Kranjac, i A. Radonić, *Nat. Prod. Commum.* **10** (2015) 357-360.

213. E. Alissandrakis, P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis, i M. Polissiou, *Food Chem.* **100** (2007) 396–404.

214. M. Shimoda, Y. Wu, i Y. Osajima, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 3913–3918.

215. M. V. Baroni, M. L. Nores, M. D. P. Díaz, G. A. Chiabrando, J. P. Fassano, C. Costa, i D. A. Wunderlin, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 7235–7241.

216. T. Cajka, J. Hajslova, F. Pudil, i K. Riddellova, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 1458–1462.

217. K. Kohara, Y. Sakamoto, H. Hasegawa, H. Kozuka, K. Sakamoto, i Y. Hayata, *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* **75** (2006) 267–269.

218. A. E. Al-Snafi, *IOSR J. Pharm.* **6** (2016) 17-42.

219. I. Jerković, M. Obradović, P. M. Kuś, i M. Šarolić, *Chem. Biodivers.* **10** (2013) 1549-1558.

220. E. Alissandrakis, E. Mantziaras, P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis, i M. Polissiou, *Eur. Food Res. Technol.* **231** (2010) 21–25.

221. R. F. A. Moreira i C. A. B. De Maria, *Flavour Fragr. J.* **20** (2005) 13–17.

222. I. Jerković, A. Radonić, M. Kranjac, M. Zekić, Z. Marijanović, S. Gudić i M. Kliškić, *Chemical Papers* **70** (2016) 726-736.

223. L. Castro-Vázquez, M. C. Díaz-Maroto, i M. S. Pérez-Coello, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 4809–4813.

224. C. Guyot-Declerck, S. Renson, A. Bouseta, i S. Collin, *Food Chem.* **79** (2002) 453–459.

225. A. C. Soria, I. Martínez-Castro, i J. Sanz, *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 793–801.

226. R. F. A. Moreira, L. C. Trugo, M. Pietroluongo, i C. A. B. De Maria, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 7616–7621.

227. R. F. A. Moreira, C. A. B. De Maria, M. Pietroluongo, i L. C. Trugo, *Food Chem.* **121** (2010) 697–704.

228. W. Wardencki, T. Chmiel, T. Dymerski, P. Biernacka, i B. Plutowska, *Ecol. Chem. Eng. S* **16** (2009) 287–300.

229. C. E. Manyi-Loh, R. N. Ndip, i A. M. Clarke, *Int. J. Mol. Sci.* **12** (2011) 9514–9532.

230. A. C. Soria, I. Martínez-Castro, i J. Sanz, *Food Res. Int.* **41** (2008) 838–848.

231. I. Jerković i Z. Marijanović, *Chem. Biodivers*. **6** (2009) 421–430.

232. E. Steeg i A. Montag, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **84** (1988) 103-108.

233. I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, M. Kranjac i M. Malenica-Staver, *Chem. Biodivers.* **12** (2015) 1047-1056.

234. I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, G. Baranović, Z. Marijanović, M. Kranjac, L. Svečnjak i P. M. Kuś, *Croat. Chem. Acta* **88** (2015) 15–22.

235. I. Jerković, Z. Marijanović, J. Kezić, i M. Gugić, *Molecules* **14** (2009) 2717-2728.

236. I. Jerković i Z. Marijanović, *Molecules* **15** (2010) 3744-3756.

237. C. I. G. Tuberoso, I. Jerković, G. Sarais, F. Congiu, Z. Marijanović, i P. M. Kuś, *Food Chem.* **145** (2014) 284–291.

238. C. I. G. Tuberoso, E. Bifulco, I. Jerković, P. Caboni, P. Cabras, i I. Floris, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 3895–3900.

239. K. Inoue, S. Murayama, F. Seshimo, K. Takeba, Y. Yoshimura, i H. Nakazawa, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 872–878.

240. M. Häusler i A. Montag, *Zeitschrift für Leb. und Forsch.* **189** (1989) 113–115.

241. I. Jerković, Z. Marijanović, I. Ljubicić, i M. Gugić, *Chem. Biodivers.* **7** (2010) 1217–1230.

242. A. G. Hegazi i F. K. Abd El-Hady, *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **6** (2009) 113–121.

243. I. Escriche, M. Kadar, M. Juan-Borrás, i E. Domenech, *Food Res. Int.* **44** (2011) 1504–1513.

244. A. L. Wilkins, Y. Lu, i S. T. Tan, *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993) 873–878.

245. I. Jerković, Z. Marijanović, M. Malenica-Staver, i D. Lusić, *Molecules* **15** (2010) 4572–4582.

246. D. Kremer, I. Košir, M. Končić, A. Čerenak, T. Potočnik, S. Srečec, M. Randić, i I. Kosalec, *Curr. Drug Targets* **16** (2015) 1623–1633.

247. I. Jerković, M. Kranjac, Z. Marijanović, M. Zekić, A. Radonić i C. I. G.Tuberoso, *Molecules* **21** (2016) 1-11.

248. G. L. Biagi, M. C. Guerra, A. M. Barbaro, S. Barbieri, M. Recanatini, i P. A. Borea, *J. Liq. Chromatogr.* **13** (1990) 913–927.

249. S. M. Tarka, Jr. i W. Jeffrey Hurst, *Introduction to the Chemistry, Isolation, and Biosynthesis of Methylxanthines*, u: G. A. Spiller (ur.), *Caffeine*, CRC Press LLC, Boca Raton, 1998.

250. A. Verzera i C. Condurso, *Sampling Techniques for the Determination of the Volatile Fraction of Honey*, u: J. Pawliszyn (ur.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Vol. 4, Elsevier, San Diego, 2012, str. 87-117.

251. R. A. Pérez, C. Sánchez-Brunete, R. M. Calvo, i J. L. Tadeo, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 2633–2637.

252. L. F. Cuevas-Glory, J. A. Pino, L. S. Santiago, i E. Sauri-Duch, *Food Chem.* **103** (2007) 1032–1043.

253. E. Joerg i G. Sontag, *J. Chromatogr.* **635** (1993) 137–142.

254. U. Jermnak, T. Yoshinari, Y. Sugiyama, R. Tsuyuki, H. Nagasawa, i S. Sakuda, *Int. J. Food Microbiol.* **153** (2012) 339–344.

255. T. Rosado, P. Bernardo, K. Koci, A. V. Coelho, M. P. Robalo, i L. O. Martins, *Bioresour. Technol.* **124** (2012) 371–378.

256. A. R. Mani, A. S. Pannala, N. N. Orie, R. Ollosson, D. Harry, C. A. Rice-Evans, i K. P. Moore, *Biochem. J.* **374** (2003) 521–527.

257. U. Takahama, T. Oniki, i H. Murata, *FEBS Lett.* **518** (2002) 116–118.

258. K. M. Russell, P. C. Molan, A. L. Wilkins, i P. T. Holland, *J. Agric. Food Chem.* **38** (1990) 10–13.

259. J. Kečkeš, J. Trifković, F. Andrić, M. Jovetić, Ž. Tešić, i D. Milojković-Opsenica, *J. Sci. Food Agric.* **93** (2013) 3368–3376.

260. C. Trova, G. Cossa, i G. Gandolfo, *Ind. Aliment.* **33** (1994) 403–405.

261. V. Vacca i P. Fenu, *Ind. Aliment.* **35** (1996) 368–370.

262. V. Vacca, M. Agabbio, i P. Fenu, *Ind. Aliment.* **36** (1997) 611–613.

263. K. M. Swaileh i A. Abdulkhaliq, *J. Sci. Food Agric.* **93** (2013) 2116–2120.

264. H. Ashihara, *Brazilian J. Plant Physiol* **18** (2006) 1–8.

265. I. Jerković, M. Roje, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, A. Kasum, i M. Obradović, *Chirality* **26** (2014) 405–410.

266. A. Tekewe, S. Singh, M. Singh, U. Mohan, i U. C. Banerjee, *Talanta* **75** (2008) 239–245.

267. B. Larissegger-Schnell, S. M. Glueck, W. Kroutil, i K. Faber, *Tetrahedron* **62** (2006) 2912–2916.

268. P. S. Navare i J. MacDonald, *Cryst. Growth Des.* **11** (2011) 2422–2428.

269. X. Li, B. Jiang, B. Pan, W. Mu, i T. J. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 2392–2399.

ŽIVOTOPIS

Marina Kranjac, rođ. Obradović je rođena 27. srpnja 1984. godine u Metkoviću gdje je završila Jezičnu gimnaziju. Na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu je 2010. g. završila sveučilišni preddiplomski studij Kemija. Na istom Fakultetu je 2012. g. završila sveučilišni diplomski studij Kemija, smjer: Organska kemija i biokemija i stekla naziv magistra kemije. Tijekom studija je sudjelovala u nastavi kao demonstrator na vježbama iz Fizikalne kemije. Dobitnica je Dekanove nagrade u akad. god. 2011./2012. za izvanredne rezultate postignute tijekom studija. Po završetku studija sudjeluje u nastavnom procesu kao voditelj vježbi iz predmeta: Organska kemija I i Prirodni organski spojevi, Kemija aroma, Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, Organska analiza, Organska sinteza i Sinteza biološki aktivnih spojeva (preddiplomski i diplomski studij Kemija); Organska kemija (preddiplomski studij Kemijska tehnologija); Osnove organske kemije (stručni studij Kemijska tehnologija) i Farmakognozija (integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija). U veljači 2013. godine je, na Kemijsko-tehnološkom fakultetu, upisala poslijediplomski doktorski studij „Kemija mediteranskog okoliša“, te se kao doktorand Hrvatske zaklade za znanost zaposlila na projektu “Research of Natural Products and Flavours: Chemical Fingerprinting and Unlocking the Potential (NaPro-Flav)”. U listopadu 2014. godine je održala javnu obranu teme doktorskog rada pod naslovom „Bioorgansko istraživanje kemijskih profila i markera odabranih vrsta meda“ iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstveno polje kemije, grana organska kemija. U 2015. g. je okviru Erasmus+ programa ostvarila mobilnost u Cagliari (Italija) u svrhu znanstvenog usavršavanja i izrade dijela doktorata. Koautorica je 9 znanstvenih radova u časopisima koje indeksira CC. Do sada je sudjelovala, na 3 domaća i 6 međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova, među kojima se može istaknuti *The International Young Scientists Symposium* u Poljskoj, gdje je nagrađena u kategoriji najboljih usmenih izlaganja mladih znanstvenika.

Popis znanstvenih radova u časopisima koje kategorizira *Current Contents* (*CC*) i *Web of Science* (*WoS*):

1. I. Jerković, A. Radonić, M. **Kranjac,** M. Zekić, Z. Marijanović, S. Gudić, i M. Kliškić, Red clover (*Trifolium pratense* L.) honey: volatiles chemical-profiling and unlocking antioxidant and anticorrosion capacity, *Chemical papers* **70** (2016) 726-736.

2. I. Jerković, **M. Kranjac**, Z. Marijanović, M. Zekić, A. Radonić, i C. I. G. Tuberoso, Screening of *Satureja subspicata* Vis. honey by HPLC-DAD, GC-FID/MS and UV/VIS: prephenate derivatives as biomarkers, *Molecules* **21** (2016) 377; 1-11

3. I. Jerković, C. I. G Tuberoso, Z. Marijanović, **M. Kranjac**, i M. Malenica - Staver, Antioxidant capacity and chemical profiles of *Satureja montana* L. Honey: hotrienol and syringyl derivatives as biomarkers, *Chemistry & biodiversity* **12** (2015) 1047-1056.

4. I. Jerković, **M. Kranjac**, M. Šuste, P. M. Kuś, i L. Svečnjak, *Rhamnus frangula* L. honey: screening of volatile organic compounds and their composition after short-term heating, *Chemistry of Natural Compounds* **51** (2015) 1174-1177.

5. I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, G. Baranović, Z. Marijanović, **M. Kranjac,** L. Svečnjak, i P. M. Kuś, Characterization of Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Honey by Physico-Chemical Parameters and Chromatographic / Spectroscopic Techniques (GC-FID/MS, HPLC-DAD, UV/VIS and FTIR-ATR), *Croatica chemica acta.* **88** (2015) 15-22.

6. I. Jerković, Z. Marijanović, **M. Kranjac**, i A. Radonić, Comparison of different methodologies for detailed screening of *Taraxacum officinale* honey volatiles, *Natural product communications* **10** (2015) 357-360.

7. I. Jerković, C. I. G. Tuberoso, P. M. Kuś, Z. Marijanović, i **M. Kranjac**, Screening of *Coffea* spp. honey by different methodologies: theobromine and caffeine as chemical markers, *RSC Advances* **4** (2014) 60557-60562.

8. I. Jerković, M. Roje, C. I. G. Tuberoso, Z. Marijanović, A. Kasum, i **M. Obradović,** Bioorganic research of *Galactites tomentosa* Moench. honey extracts: enantiomeric purity of chiral marker 3- phenyllactic acid, *Chirality* **26** (2014) 405-410.

9. I. Jerković, **M. Obradović**, P. M. Kuś, i M. Šarolić, Bioorganic diversity of rare *Coriandrum sativum* L. Honey: unusual chromatographic profiles containing derivatives of linalool/oxygenated methoxybenzene, *Chemistry & biodiversity* **10** (2013) 1549-1558.

Popis sudjelovanja na domaćim znanstvenim i stručnim skupovima:

1. I. Jerković, Z. Marijanović, **M. Kranjac**, i A. Radonić, Profil vršnih para meda maslačka (*Taraxacum officinale* Weber): prevaga nitrila, *24. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera*, 21.-24. travnja. 2015., Zagreb, Hrvatska (poster)

2. Z. Marijanović, **M. Kranjac**, J. Gugić, I. Jerković, Karakterizacija meda prije i nakon zagrijavanja: istraživanje isparljivih spojeva, Sedma Nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda-Kako dalje?, 7. travnja, 2017. Opatija, Hrvatska (usmeno priopćenje)

3. A. Radonić, **M. Obradović**, M. Zekić, Determination of Free and Bound Monoterpenes Content in Aromatic Plants With Simple Distillation –spectrophotometric Method, Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with International Participaton, listopad 2014., Sarajevo, Bosna i Hercegovina (poster)

Popis sudjelovanja na međunarodnim znanstvenim skupovima:

1. Z. Marijanović, M. Šarolić, T. Bilušić, I. Jerković, A. Radonić, **M. Kranjac**, The volatile profiles of curry powder, 10. međunarodni znanstveno-stručni skup HRANOM DO ZDRAVLJA, 12.-13. listopada 2017., Osijek, Hrvatska (poster)

2. I. Jerković, Z. Marijanović, i **M. Obradović**, Volatile profiles of *Satureja montana* L. honey, *The International Young Scientists Symposium "Plants in Pharmacy and Nutrition 2014"*, 30 May 2014, Wroclaw, Poland (usmeno priopćenje)

3. Z. Marijanović, I. Jerković, J. Filipi, J Gugić, **M. Obradović**, Radical Scavenging Activity of Ultrasonic solvent Extracts from Dalmatian Sage Honey samples, Universidal de Murcia, Sixt European Conference of Apidology, 9-11 September 2014., Murcia, Španjolska (poster)

4. P. M. Kuś, Z. Marijanović, **M. Obradović**, i I. Jerković, Volatile compounds of summer savory (*Satureja hortensis* L.) honey, *XV. Ružičkini dani*, 11.-12. 09. 2014., Vukovar, Hrvatska (poster)

5. I. Jerković, **M. Obradović**, P. M. Kuś, M. Šarolić, Headspace solid-phase microextraction of rare *Coriandrum sativum* L. honey, *19th International Symposium on Separation Sciences, New Achievements in Chromatography*, 25-28 September 2013, Poreč, Croatia (poster)

6. I. Blažević, **M. Obradović**, M. Ivić, J. Mastelić, Qualitative and quantitative determination of glucosinolates from *Lunaria annua* (L.), XIV. Ružičkini dani, 13.-15. rujna 2012., Vukovar, Hrvatska (poster)