

# Hlapljivi spojevi meda od facelije prije i poslije zagrijavanja

---

Vlaić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

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:167:215015>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD FACELIJE (*Phacelia tanacetifolia*  
Benth.) PRIJE I POSLIJE ZAGRIJAVANJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**IVAN VLAIĆ**

**Matični broj: 1447**

**Split, rujan 2018.**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**STRUČNI STUDIJ KEMIJSKA TEHNOLOGIJA**  
**SMJER PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD FACELIJE (*Phacelia tanacetifolia*  
Benth.) PRIJE I POSLIJE ZAGRIJAVANJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**IVAN VLAIĆ**

**Matični broj:1447**

**Split, rujan 2018.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**PROFESSIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**COURSE OF FOOD TECHNOLOGY**

**VOLATILE COMPOUNDS OF PHACELIA (*Phacelia tanacetifolia*  
Benth.) HONEY BEFORE AND AFTER HEATING**

**BACHELOR THESIS**

**IVAN VLAIĆ**

**Parent number:1447**

**Split, September 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Stručni studij Kemijske tehnologije  
Smjer Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada:** je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

**Pomoć pri izradi:** Dr. sc. Marina Kranjac

### HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA OD FACELIJE PRIJE I POSLIJE ZAGRIJAVANJA

Ivan Vlaić, 1447

#### Sažetak:

Mnogi spojevi biološkog i botaničkog podrijetla u medu nisu stabilni, naročito hlapljive tvari, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom sazrijevanja meda, njegova skladištenja i zagrijavanja. U ovom radu se istraživao utjecaj zagrijavanja na sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u medu od facelije. Uzorak meda se zagrijavao na 150 °C (5 min) bez dodatka vode. Hlapljivi spojevi ekstrahirani su pomoću diklormetanskog otapala postupkom ultrazvučne ekstrakcije (USE) pri sobnoj temperaturi. Ekstrakti su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Siringaldehid, biomarker meda od facelije se pokazao stabilnim tijekom procesa zagrijavanja do temperature 150 °C. Dominantni spojevi identificirani u diklormetanskom ekstraktu dobiveni nakon zagrijavanja meda na 150 °C su 5-hidroksimetilfurfural i piranski derivat 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on.

**Ključne riječi:** med od facelije, zagrijavanje, USE, GC-MS, isparljivi spojevi

**Rad sadrži:** 26 stranica, 13 slika, 2 tablice, 24 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. Doc. dr. sc. Marina Zekić            | predsjednik   |
| 2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić | član          |
| 3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović    | član - mentor |

**Datum obrane:** 26. rujan 2018.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Professional study of Chemical Technology**  
**Food Technology direction**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Thesis subject:** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology,  
session no. 3th

**Mentor:** Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

**Technical assistance:** Marina Kranjac, PhD

### **VOLATILE COMPOUNDS OF PHACELIA (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) HONEY BEFORE AND AFTER HEATING**

Ivan Vlaić, 1447

#### **Abstract:**

Many compounds of biological and botanical origin in honey are not stable, particularly volatile substances, and their structures can be transformed during honey maturation, storage and heating. In this paper was investigated the influence of heating on the composition and content of phacelia honey.. The honey sample was heated to 150 °C (5 min.) without any addition of water. Volatile compounds were extracted with dichloromethane using ultrasound assisted solvent extraction (USE) at room temperature. The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey biomarker syringaldehyde proved to be stable throughout heating procedure up to 150 °C. The dominant compounds identified in dichloromethane extract obtained after heating of honey at 150 °C were thermal artefacts 5-hydroxymethylfurfural and pyran derivative 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one.

**Keywords:** phacelia honey, heating, USE, GC-MS volatile compounds

**Thesis contains:** 26 pages, 13 figures, 2 tables, 24 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Marina Zekić - PhD, assistant prof.            | chair person |
| 2. Ivana Generalić Mekinić – PhD, assistant prof. | member       |
| 3. Zvonimir Marijanović - PhD, assistant prof.    | supervisor   |

**Defence date:** September 26<sup>th</sup>, 2018.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od travnja do rujna 2018 .godine.

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći koju mi je pružio tijekom izrade i pisanja ovog završnog rada.

Također se zahvaljujem dr. sc. Marini Kranjac, na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog rada.



## ZADATAK

Zadatak završnog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz uzorka meda od facelije

U tu svrhu bilo je potrebno :

Odrediti kemijski profil isparljivih spojeva uzorka uniflornog meda od facelije (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) prije i nakon zagrijavanja (150 °C, 5 min.).

Izolaciju hlapljivih spojeva izvršiti pomoću ultrazvučne ekstrakcije (USE) s organskim otapalom diklormetanom.

Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS), te usporediti razliku u analizi prije i poslije zagrijavanja uzorka.

## SAŽETAK

Mnogi spojevi biološkog i botaničkog podrijetla u medu nisu stabilni, naročito hlapljive tvari, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom sazrijevanja meda, skladištenja i zagrijavanja. U radu je istražen utjecaj zagrijavanja na sastav i sadržaj hlapljivih spojeva meda od facelije. Uzorak meda je zagrijan na 150 °C (5 min) bez dodavanja vode. Hlapljivi spojevi ekstrahirani su pomoću diklormetanskog otapala ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS). Siringaldehid biomarker meda od facelije se pokazao stabilnim tijekom procesa zagrijavanja do 150 °C. Dominantni spojevi identificirani u diklormetanskom ekstraktu dobiveni nakon zagrijavanja meda na 150 °C su 5-hidroksimetilfurfural i piranski derivat 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on.

**Ključne riječi:** med od facelije, zagrijavanje, USE, GC-MS, isparljivi spojevi

## SUMMARY

Many compounds of biological and botanical origin in honey are not stable, particularly volatile substances, and their structures can be transformed during honey maturation, storage and heating. In this paper the influence of phacelia honey heating on the composition and content of volatile compounds are investigated. The honey sample were heated at 150 °C (5 min.) without addition of water. Volatile compounds were extracted with dichloromethane using ultrasound assisted solvent extraction (USE) at room temperature. The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey biomarker syringaldehyde proved to be stable throughout heating procedure up to 150 °C. The dominant compounds identified in dichloromethane extract obtained after heating of honey at 150 °C were thermal artefacts 5-hydroxymethylfurfural and pyran derivative 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one.

**Keywords:** phacelia honey, heating, USE, GC-MS volatile compounds

# SADRŽAJ

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OPĆI DIO.....</b>	<b>2</b>
1.1. MED.....	2
1.2. VRSTE MEDA .....	3
1.3. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA .....	4
1.4. KEMIJSKI SASTAV MEDA .....	5
1.5. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA.....	6
1.6. HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA .....	7
1.7. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	8
1.7.1. Mikroekstrakcija na krutoj fazi.....	8
1.7.2. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE) .....	9
1.8. ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA.....	9
1.8.1. Plinska kromatografija.....	10
1.8.2. Spektrometrija masa .....	10
1.8.3. Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS).....	11
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>12</b>
2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE VRSTE <i>PHACELIA TANACETIFOLIA</i> BENTH.....	12
2.2. PRIPREMA UZORKA .....	12
2.3. KEMIKALIJE.....	13
2.4. APARATURE.....	13
2.5. IZOLACIJA ISPARLJIVIH SPOJEVA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM ORGANSKIM OTAPALOM.....	14
2.6. ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC – MS) .....	15

<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>17</b>
3.1. PRIKAZ REZULTATA .....	17
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>21</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>23</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>24</b>

## Uvod

Med je jedan od najsavršenijih proizvoda prirode. To je slatka, gusta tvorevina koju proizvode pčele medarice i ne može se sintetski proizvesti zbog složenog kemijskog sastava.

Med u povijesti zauzima vrlo važno mjesto, oduvijek je bio prisutan u narodnoj medicini, a najčešće su mu se pripisivala ljekovita svojstva biljaka od kojih je nastao (1).

Med nije industrijski proizvod, nego prirodni izvor ugljikohidrata. Prema geografskom porijeklu dijelimo ga na poljski i planinski, prema botaničkom na monoflorni i poliflorni, a prema izvornom materijalu od kojeg je dobiven cvjetni med i medljikovac.

Kemijski sastav meda prvenstveno ovisi o sirovini iz koje su ga pčele proizvele (2).

## 1. Opći dio

### 1.1. Med

Med je gusta tekuća ili kristalizirana namirnica koju su proizvele pčele. Nastaje iz cvjetnog nektara ili drugih izlučevina biljaka ili iz različitih vrsta medne rose.

Med je visokokalorična namirnica. Kilogram meda daje toliko energije koliko 3 kg svježeg mesa, 50 jaja, 5 litara mlijeka, 3 kg slatkovodne ribe, kilogram šunke, 6 kg naranči ili 3 kg banana. Med ne konzumiramo samo kao hranu, već i kao dodatak raznim drugim jelima i pićima (3).

Zbog tipičnog kemijskog sastava, med je kalorično vrijedna hrana za odrasle i djecu. Med se konzumira najčešće u neprerađenom stanju, a zbog svoje slatkoće često se koristi kao zamjena za šećer te se dodaje kao sastojak ili kao prirodni aditiv u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda.

Razne napitke od meda poznavali su mnogi narodi.

Med se u Republici Hrvatskoj često upotrebljava za izradu tradicionalnih slastica kao što su medni kolači (4).



**Slika 1.** Med (5)

## 1.2. Vrste meda

Postoji nekoliko podjela meda:

### a) Prema nastanku, odnosno podrijetlu, med se dijeli na:

- **nektarni**(cvjetni) med koji nastaje sakupljanjem nektara medonosnih biljaka kojih u Hrvatskoj ima više stotina

- **medljikovac** koji nastaje od medljike ili medne rose lisnih i štitastih biljnih uši (spadaju u porodicu kukaca jednokrila tzv. "Homoptera")

Medljikovac ima tamniju boju od nektarnoga meda i sadrži više mineralnih tvari.

Prema podrijetlu, medljikovac može biti crnogorični (bor, jela, smreka, pinija) i bjelogorični (bukva, hrast, lipa).

- **miješani** odnosno nektarni (cvjetni) med i medljikovac

### b) S obzirom na ispašu, odnosno cvjetove s kojih se sakuplja nektar, cvjetni med se dijeli na:

- **monoflorni, tj.** med koji je nastao prikupljanjem nektara većinom s jedne vrste medonosnih biljaka( to se utvrđuje analizom jer u medu bi upravo pelud te biljke trebala sadržavati 20 do 50 posto ukupne količine peludnih zrnaca meda)

- **poliflorni**, odnosno med koji je nastao od više vrsta medonosnih biljaka i nema izraženiji postotak pojedinih peludnih zrnaca

### c) Prema konzistenciji, med može biti:

- **kremasti** med, odnosno 100%- tni prirodni med koji se dobiva kontroliranom kristalizacijom tekućega meda (Kremasta konzistencija dobiva se vrlo jednostavno – miješanjem)

- **kristalizirani** med ili čvrsti med (kristalizacija meda je prirodno svojstvo koje se javlja kada postotak vode pada na manje od 20%, a glukozni šećeri čine preko 75% (6).



### 1.3. Senzorska svojstva meda

#### ➤ Boja i izgled meda

Potrošači znaju da boja meda varira i da se može kretati od svijetlo žute, žute, zelenkaste do crvenkaste. Izrazito svijetle boje je bagremov med, a tamnosmeđe je med kestena. Boja ostalih vrsta meda kreće se u tom rasponu nijansi. Vizualna procjena meda može pomoći kod prepoznavanja botaničkog porijekla, stupnju termičkog tretmana i prisutnosti defekata. Boja je određena i udjelom karotenoida, flavonoida, klorofila, antocijana, tanina i šećera.

#### ➤ Okus i miris meda

Okus i miris meda ovise o sastavu hlapljivih komponenti, prisutnih u samoj namirnici i prostoru iznad nje, koje s vremenom čuvanja hlape. Punoću i prepoznatljivost okusa čini slatkoća koja ovisi o udjelu i omjeru glukoze, fruktoze, aminokiselina, eteričnih ulja i organskih kiselina. Miris meda većinom ovisi o biljci od koje je dobiven. Mirisne tvari su lako hlapljive pa čuvanjem ili zagrijavanjem miris slabi ili nestaje. Neke vrste meda nemaju specifičan miris dok neke poput kestena i lavande imaju. Mirisne tvari mogu se podijeliti u tri skupine: karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni), alkoholi i esteri (7).



**Slika 2.** Razne vrste meda (8)

## 1.4. Kemijski sastav meda

Osnovni sastojci meda su **ugljikohidrati** (oko 75%), **voda** (oko 20%) te ostale tvari kojih ima svega oko 5%, a upravo one medu daju aromu i okus. **Ugljikohidrati** su u medu zastupljeni u 3 vrste. Najvećim je dijelom (oko 40%) zastupljen voćni šećer – fruktoza ili levuloza, potom groždani šećer – glukoza ili dekstroza (oko 33%) te, sa svega 1 do 2%, saharoza ili obični šećer. Omjer tih triju vrsta šećera ovisi o cvjetnoj ispaši te o enzimu invertazi koji je odgovaran za razgradnju običnih šećera na groždane i voćne, a nalazi se manjim dijelom u cvijetu iz kojega pčele sakupljaju nektar, dok je većim dijelom u samome pčelinjem organizmu (6).

**Aminokiseline** su građevne jedinice proteina, a zajedničko obilježje svih aminokiselina je prisutnost jedne amino i jedne karboksilne skupine u njihovoj građi. Proteini su građeni od -aminokiselina u kojima je amino-skupina vezana na -ugljikov atom karboksilne skupine. Podrijetlo proteina i aminokiselina u medu može biti životinjsko (od pčela) ili biljno (iz peludi).

Med se ne smatra značajnim izvorom **vitamina**, iako su oni prisutni u medu u malim količinama. Nektar i pelud najznačajniji su izvori vitamina, pa stoga zastupljenost pojedinih vitamina najviše ovisi o botaničkom podrijetlu meda. Med sadrži nešto veću količinu vitamina B skupine, te vitamina C i K(9).

I **kiseline** su sastavni dio meda. Mravlja kiselina npr. prisutna je sa 10% u medu, iako se nekad smatralo da je ima više i da je jedna od glavnih prisutnih kiselina. Med pored mravlje sadrži i oksalnu, jantarnu, limunsku, vinsku, mliječnu, glukonsku, piroglutaminsku, valerijansku, benzojevu kiselinu i dr. Kiseline su odgovorne za kiselost te pridonose okusu meda.

Od **mineralnih tvari** med sadrži silicij, aluminij, željezo, kalcij, magnezij, natrij, kalij i dr. Količine mineralnih tvari ovise o vrsti meda i podrijetlu. Tamnije vrste su bogatije mineralima (10).

## 1.5. Fizikalna svojstva meda

### ➤ Viskoznost

Viskoznost je stupanj likvidnosti, odnosno tekućeg stanja i naročito utječe na postupanje s medom tijekom dorade i skladištenja. Na viskoznost utječe više faktora kao što su sastav meda (ponajviše udio vode), vrsta meda, temperatura te broj i veličina kristala u medu. Što je veći udio vode, manja je viskoznost. Porastom temperature pri konstantnom udjelu vode viskoznost meda se smanjuje. Veći udio di- i trisaharida doprinosi većoj viskoznosti. Uz udio vode najviše utjecaja na viskoznost ima temperatura. Porastom temperature viskoznost meda se smanjuje, a taj utjecaj najizraženiji je pri temperaturama ispod 15 °C.

### ➤ Kristalizacija

Med je prezasićena otopina glukoze i spontano prelazi u stanje ravnoteže kristalizacijom suvišne količine glukoze u otopini. Glukoza gubi vodu (postaje glukoza monohidrat) i prelazi u kristalni oblik. Voda, koja je prije bila vezana na glukozu, postaje slobodna tako da se povećava sadržaj vode u nekristaliziranim dijelovima meda. Zbog toga med postaje skloniji fermentaciji i kvarenju. Fruktosa ostaje u tekućem stanju i čini tanak sloj oko kristala glukoze. Med mijenja boju, postaje svjetliji, više nije proziran, a mijenja i okus.

### ➤ Higroskopnost meda

Higroskopnost je osobina meda da, u ovisnosti o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode, na sebe privlači ili otpušta vodu. Proces je uvjetovan velikom količinom šećera. Zbog velike viskoznosti meda gibanje apsorbirane vode s površinskih slojeva u unutrašnjost meda vrlo je sporo, tako da se promjene koje nastaju zbog higroskopnosti očituju uglavnom na površini. Visok udio fruktoze čini med higroskopnim, obzirom da je ona higroskopnija od glukoze i drugih šećera.

### ➤ **Električna vodljivost**

Električna vodljivost je fizikalno svojstvo koje uvelike ovisi o udjelu mineralnih tvari i kiselina u medu; što je on veći, veća je i električna vodljivost meda. Služi kao dobar kriterij za određivanje botaničkog podrijetla meda, odnosno za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca.

### ➤ **Optička aktivnost meda**

Vodena otopina pčelinjeg meda je optički aktivna, tj. ima sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti. Optička aktivnost je funkcija udjela pojedinih ugljikohidrata u medu. Fruktaza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo, a glukoza, svi disaharidi, trisaharidi i viši oligosaharidi udesno. Nektarni med zbog većeg udjela fruktoze zakreće svjetlost ulijevo, odnosno pokazuje negativnu optičku aktivnost dok medljikovac zbog većeg udjela 13 oligosaharida, ponajviše melecitoze i erloze, zakreće svjetlost udesno, tj. pokazuje pozitivnu optičku aktivnost. Stoga se mjerenje specifičnog kuta rotacije u nekim zemljama (Grčka, Italija i Velika Britanija) koristi za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca (11).

## **1.6. Hlapljivi spojevi meda**

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

- direktnim prijenosom iz biljke,
- pretvorbom biljnih sastojaka od strane pčela,
- proizvodnjom od strane pčela,
- pretvorbama spojeva prisutnih u nezrelom medu,
- dodatnim postupcima obrade (1).

## **1.7. Metode izolacije hlapljivih spojeva**

Hlapljivi spojevi su jedan od važnih čimbenika koji doprinose aromi meda. Aroma je kombinirana impresija okusa i mirisa, jedno od najcjenjenijih svojstava prehrambenih proizvoda, a često i odlučujući čimbenik kod izbora potrošača (12).

Tradicionalna metoda određivanja botaničkog porijekla meda je klasična analiza peludi koja, iako daje zadovoljavajuće rezultate, nije u potpunosti pouzdana.

U novije vrijeme se osim peludne analize sve više koristi analiza isparljivih spojeva meda s ciljem identifikacije karakterističnih spojeva, čija prisutnost ili odsutnost može ukazati na botaničko porijeklo meda (13).

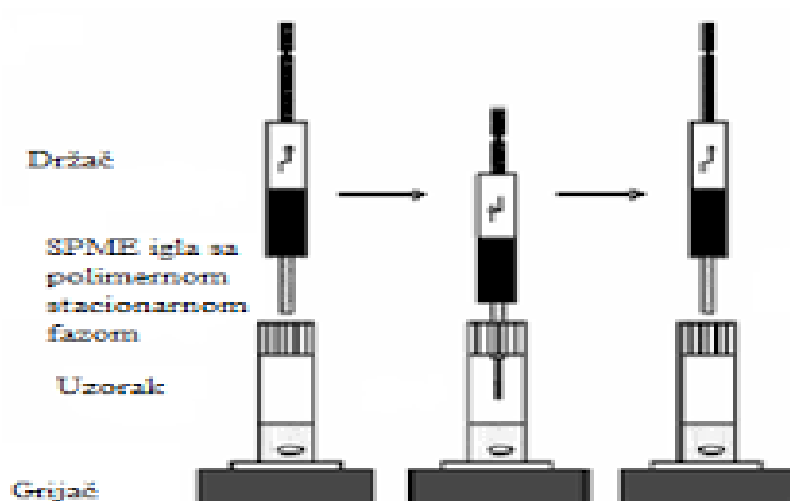
Metode koje se sve više primjenjuju su mikroekstrakcija na krutoj fazi (SPME) te ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE). Velika prednost ovih dviju metoda je što za svoj učinak ne trebaju visoke temperature tako da nema nastanka toplinskih artefakata (12).

### **1.7.1. Mikroekstrakcija na krutoj fazi**

Mikroekstrakcija na krutoj fazi (SPME) je vrlo jednostavna i djelotvorna metoda ekstrakcije koja ne koristi otapalo. Obično se koristi u kombinaciji sa vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

Kod SPME svi koraci uobičajene ekstrakcije kao što su izolacija, koncentriranje te prijenos do plinskog kromatografa, integrirani su u jedan korak, znatno pojednostavljujući postupak izolacije. Aparatura za SPME je vrlo jednostavna. Izgleda kao modificirana šprica koja se sastoji od nosača, igle i SPME vlakna.

SPME vlakno je obavijeno tankim polimernim filmom koji apsorbira i koncentrira organske spojeve. Polarna vlakna koriste se za polarne spojeve, a nepolarna za nepolarne. Prije upotrebe vlakno je potrebno kondicionirati, izlažući ga tijekom 0,5-4h na visokoj temperaturi(14).



**Slika 3.** Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi za HS–SPME (15)

### 1.7.2. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE)

Ultrazvuk pomaže ekstrakciju isparljivih spojeva iz zasićene vodene otopine meda u organski sloj, čime se znatno skraćuje vrijeme ekstrakcije.

USE metoda ne koristi visoke temperature, omogućava ekstrakciju poluisparljivih i vodotopljivih spojeva koji su, također, važni za određivanje botaničkog porijekla meda (14).

### 1.8. Analiza isparljivih spojeva

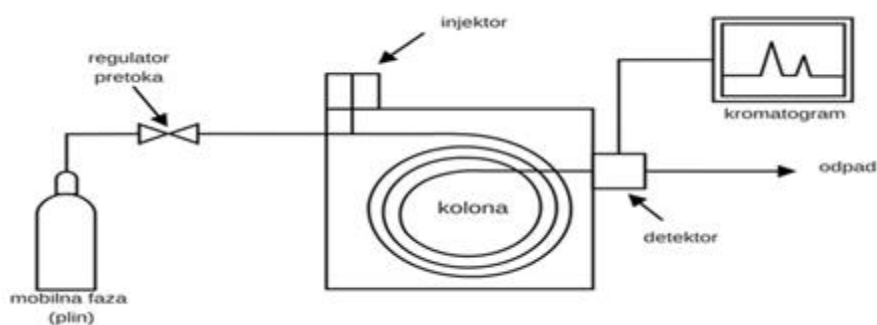
Analiza izoliranih isparljivih spojeva pretežno se provodi vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) (14).

### 1.8.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC) je najčešće korištena tehnika odjeljivanja smjese isparljivih spojeva. Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone (smještena u termostatiranom prostoru), detektora i pisaa.

Uzorak u injektoru brzo i potpuno ispari. Inertni plin prenese uzorak od injekcijskog bloka preko kolone na kojoj se vrši odjeljivanje sastojaka smjese do detektora.

Uzorci za plinsko-kromatografsku analizu moraju biti isparljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Mobilna faza je inertni plin koji ne utječe na proces odjeljivanja sastojaka smjese. Stacionarna faza je najčešće tekućina nanosena na kruti adsorbens (punjenje kolone) ili vezana za stijenke kapilare (kapilarne kolone) (14).

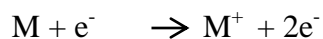


Slika 4. Plinski kromatogram (16)

### 1.8.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je tehnika utemeljena na ionizaciji uzorka nakon čega se razdvajaju i određuju ioni prema njihovoj masi. Spektrometar se sastoji od komore za bombardiranje u koju se unosi mala količina spoja u plinovitom stanju. Unutrašnjost spektrometra je pod vakuumom koji osigurava da ioni stvoreni u ionskom izvoru prijeđu put od izvora do senzora bez sudara s drugim molekulama jer bi u tom slučaju bili neutralizirani.

Kod elektronske ionizacije uzorak se bombardira elektronima visoke energije, pri čemu se molekule ioniziraju, nastaje pozitivni  $M^+$  ion koji se fragmentira:



Na taj način nastaju razni fragmenti. Analizom je moguće utvrditi kemijsku strukturu uzorka kao i molekulsku masu. Dobiveni ioni okarakterizirani su veličinom  $m/z$  i intenzitetom. Ioni se na osjetljivom dijelu analizatora registriraju kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala i tako se dobiva spektar mase koji se obično prikazuje kao linijski dijagram s odnosom relativnog intenziteta, omjera mase i naboja fragmenta ( $m/z$ ) (17).

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

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine uzorka.

Kod ove tehnike spektrometar masa djeluje kao vrlo osjetljiv detektor za plinsku kromatografiju i može djelovati kao opći (kada detektira sve fragmente u zadanom intervalu) ili vrlo selektivni detektor (kada detektira samo određene fragmente koji su karakteristični za pojedinu strukturu).

Komponente smjese se odjeljuju u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa te odijeljene komponente odlaze plinom nositeljem u detektor (spektrometar masa).

Dobiveni spektar masa uspoređuje se s računalnom bazom spektra masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega se može identificirati spoj.

Još jedan važan podatak za identifikaciju spoja je vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni (retencijsko vrijeme). Dakle, za svaki odijeljeni spoj vezani sustav GC-MS daje dva važna podatka za identifikaciju spoja: vrijeme zadržavanja spoja na koloni i spektar masa (14).



## 2. Eksperimentalni dio

### 2.1. Opće karakteristike vrste *Phacelia tanacetifolia* Benth.

Facelija (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) je jednogodišnja zeljasta biljka porijeklom iz Sjeverne Amerike, točnije Kalifornije. Facelija je prvotno bila zapažena kao korovna vrsta, no zbog svojih pozitivnih obilježja sve više se uzgaja kao usjev pa bi se moglo reći da je ona danas kultivirana biljka.

Facelija je u Europu donesena početkom 19. stoljeća (1832.) kao ukrasna i medonosna biljka, ali i radi poboljšanja plodnosti tla. Tamo gdje se sijala pčelari su je zapazili kao dobru medonosnu biljku, pa je to bio jedan od razloga širenja u Europi.

U Hrvatskoj se facelija počela uzgajati u novije vrijeme zbog nektara, posebno u primorskom dijelu Hrvatske, a u Kontinentalnoj Hrvatskoj može se uspješno uzgajati kao glavna jara kultura i u postrnoj sjetvi (19).

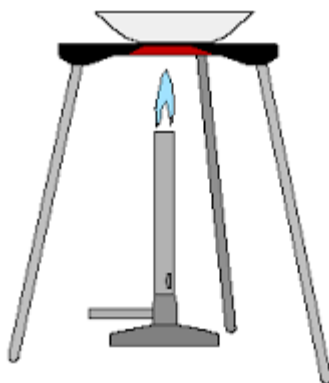


**Slika 5.** Facelija (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) (20)

### 2.2. Priprema uzorka

U ovom radu je korišten jedan uzorak meda od facelije (s područja Virovitice, od proizvođača Dražena Jakupeca iz 2016 godine). Peludna analiza je određena na Zavodu za pčelarstvo, ribarstvo, specijalnu zoologiju i lovstvu na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu gdje je udio peludnih zrnaca u netopivom sedimentu

bio iznad 68%. U Republici Hrvatskoj med od facelije je vrlo rijedak. Za analizu hlapljivih spojeva meda od facelije pomoću ultrazvučne ekstrakcije korišten je ne zagrijavani i zagrijavani med. Uzorak meda je zagrijavan u kontroliranim uvjetima bez dodatka vode. U keramičku posudicu je dodan med te je grijan direktno na temperaturu 150 °C tijekom 5 minuta. Nakon što je med ohlađen na sobnu temperaturu, hlapljivi spojevi su ekstrahirani pomoću USE (vidjeti poglavlje 2.5).



**Slika 7.** Zagrijavanje meda (21)

### 2.3. Kemikalije

Naziv:

Proizvođač:

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diklormetan)

Kemika, Zagreb

MgSO<sub>4</sub> (magnezijev sulfat)

Fluka Chemie, p.a

### 2.4. Aparature

- aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju organskim otapalom:

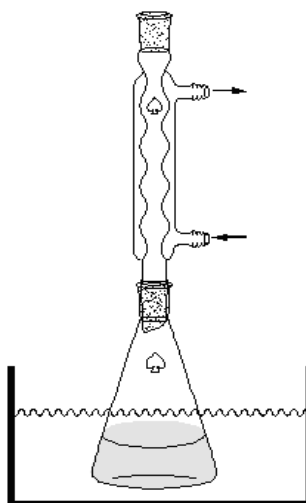
- ultrazvučna kupelj: Transsonic Typ 310/H, Njemačka

- centrifuga:
  - Centric 322A, Tehnica, Slovenija
- vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)
  - GC 7820A, Agilent Technologies
  - MSD 5977E, Agilent Technologies
  - GC kapilarna kolona HP-SMS

Stacionarna faza: 5% difenil-95% dimetilpolisilksan

## **2.5. Izolacija isparljivih spojeva ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom**

U ovom istraživanju izolacija isparljivih spojeva je provedena u ultrazvučnoj kupelji metodom indirektno sonifikacije pri frekvenciji 35 kHz i temperaturi  $25 \pm 3$  °C. Uzorak meda (40 g) odvagano je u tikvicu od 100 mL (s ravnim dnom zbog optimalne sonifikacije) i razrijeđen s 22 mL destilirane vode te je postupno dodano 1,5 g bezvodnog  $\text{MgSO}_4$ , uz intenzivno miješanje. Ultrazvučna ekstrakcija je provedena s diklormetanom kao organskim otapalom koji će izolirati isparljive i poluisparljive spojeve meda te omogućiti analizu istih. U tikvicu s otopljenim uzorkom dodano je 20 mL organskog otapala (diklormetan) i provedena je ultrazvučna ekstrakcija u vremenu od 30 min nakon koje je, centrifugiranjem (5 min na 4000 o/min) izdvojen sloj organskog otapala te filtriran preko bezvodnog  $\text{MgSO}_4$ . Vodeni sloj je vraćen u tikvicu, a ekstrakcija s novom količinom otapala (20 mL) i odjeljivanje slojeva ponovljeno je još dva puta, na prethodno opisan način. Združeni organski ekstrakti se koncentriraju. Ekstrakcija sa diklormetanom je ponovljena tri puta na istom uzorku.



**Slika 8.** Ultrazvučna ekstrakcija (USE) (10)

## **2.6. Analiza isparljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC – MS)**

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa (GC-MS) (Slika 9.).

Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies (5% difenil-95% dimetilpolisilksan; 30 m x 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,20  $\mu\text{m}$ ). Plin nositelj je helij protoka 1ml/min; omjer cijepanja 1:50; temperatura injektora 250°C; temperatura detektora 280°C; energija ionizacije 70eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3 min pri 70°C, zatim zagrijavanje od 70°C do 200°C brzinom od 3°C/min i zadržavanje 2 min pri 200°C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalne biblioteke masenih spektara (*Wiley 9 MS library*) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.



**Slika 9.** Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

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

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja svake komponente (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima (udio površine pika u ukupnoj površini)
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbližnji spektru nepoznate komponente (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postocima).

### 3. Rezultati

#### 3.1. Prikaz rezultata

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

Tablica 1. Hlapljivi spojevi meda u uzorku, nakon ekstrakcije s diklormetanom prije zagrijavanja.

Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	RI, MS	metil-2-furoat	1,92
2.	RI, MS	5-hidroksimetilfurfural	7,46
3.	RI, MS	4-vinil-2-metoksi-fenol	1,84
4.	RI, MS	3,7-dimetilokt-1-en-3,6,7-triol	0,85
5.	RI, MS	cinamična kiselina	0,92
6.	RI, MS	4-hidroksi-2-metoksi benzojeva kiselina	0,99
7.	RI, MS	heksadekan	1,68
8.	RI, MS	siringaldehid	29,66
9.	RI, MS	heptadekan	1,35
10.	RI, MS	metil-siringat	4,44
11.	RI, MS	vomifoliol	3,06
12.	RI, MS	oktadekan	1,06
13.	RI, MS	heksadekan-1-ol	2,49
14.	RI, MS	7,9-di-tert-butil-1-oksospiro[4,5]deka-6,9-diene-2,8-dion	5,55
15.	RI, MS	heksadekanska kiselina	7,72
16.	RI, MS	(Z)-oktadek-9-en-1-ol	3,57

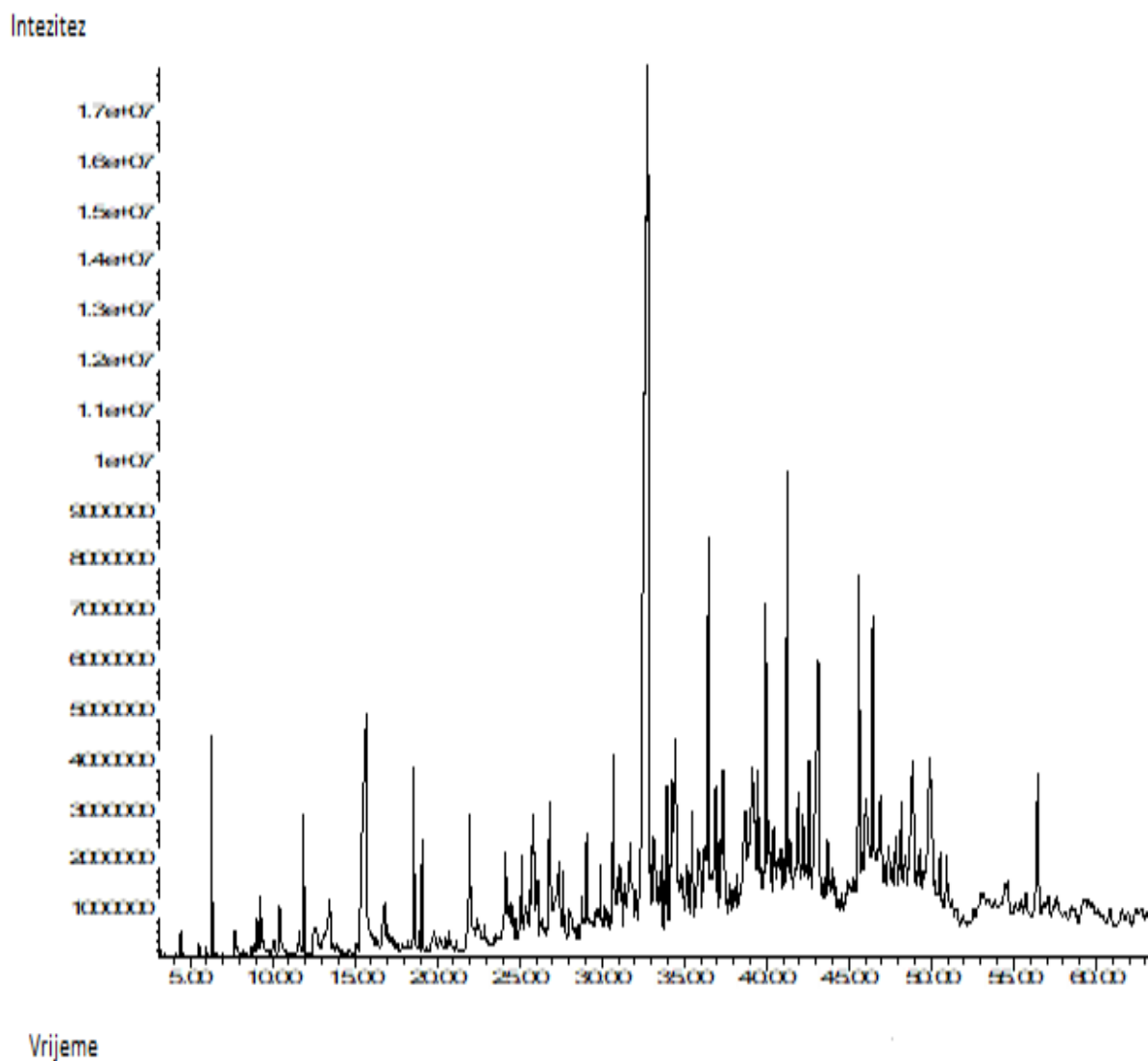
17.	RI, MS	oktadekan-1-ol	2,70
18.	RI, MS	(Z)-oktadek-9-enska kiselina	3,97
19.	RI, MS	dokosan	0,61
20.	RI, MS	trikosan	2,68

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar

Tablica 2. Hlapljivi spojevi meda u uzorku, nakon ekstrakcije s diklormetanom nakon zagrijavanja pri 150 °C bez dodatka vode.

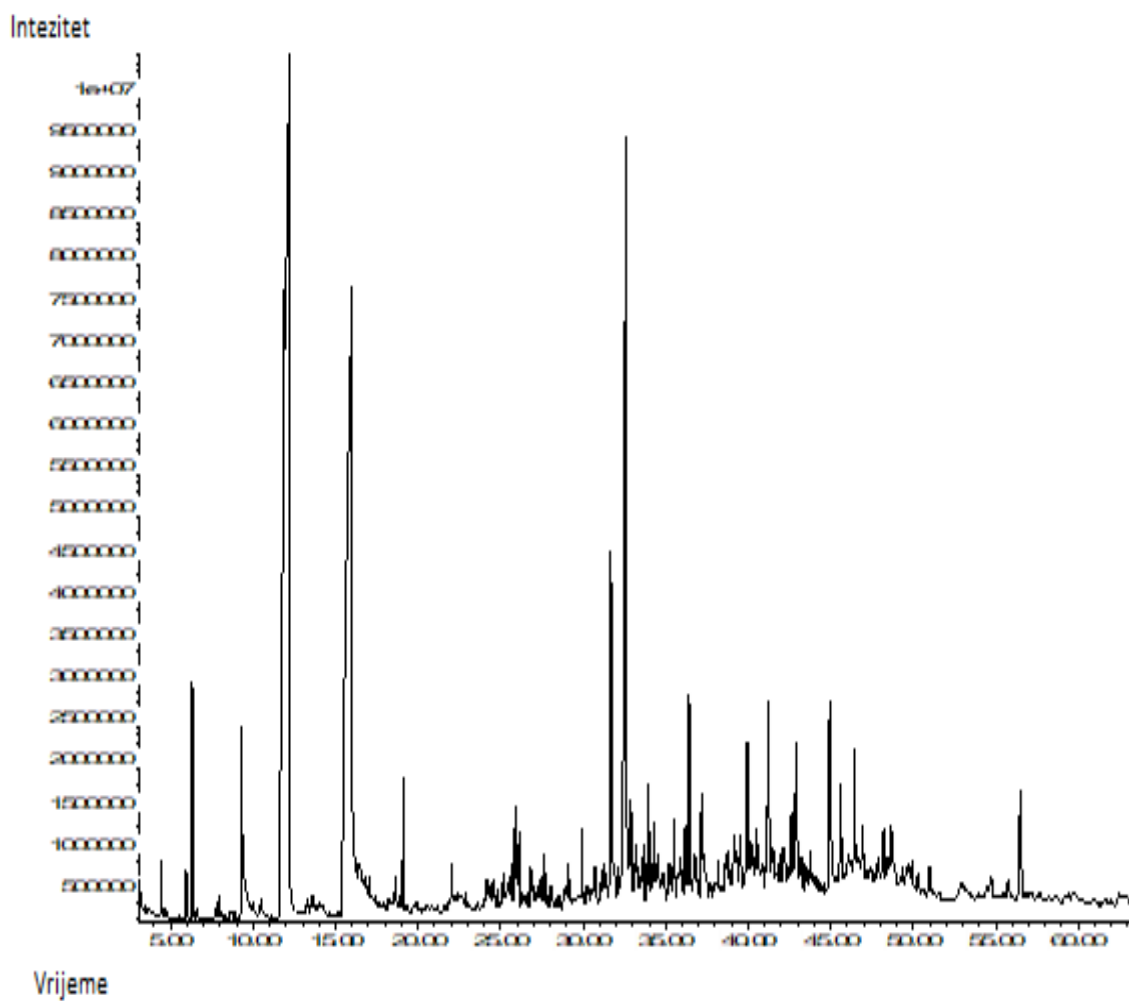
Redni broj	Identifikacija	Spoj	Udio (%)
1.	MS	2,5-difurankarboksaldehid	1,92
2.	RI, MS	2,3-dihidroksi-6-metil-4- <i>H</i> -piran-4-on	33,92
3.	RI, MS	5-hidroksimetilfurfural	24,45
4.	RI, MS	pentadekan	1,06
5.	RI, MS	heksadekan	0,46
6.	RI, MS	siringaldehid	11,70
7.	RI, MS	heptadekan	4,64
8.	RI, MS	metil-siringat	2,32
9.	RI, MS	oktadekan	0,66
10.	RI, MS	heksadekan-1-ol	1,12
11.	RI, MS	7,9-di-tert-butil-1-oksospiro[4,5]deka-6,9-diene-2,8-dion	1,77
12.	RI, MS	heksadekanska kiselina	2,04
13.	RI, MS	(Z)-oktadek-9-en-1-ol	0,93
14.	RI, MS	oktadekan-1-ol	0,84
15.	RI, MS	dokosan	1,11
16.	RI, MS	trikosan	1,68

RI = retencijski indeks, MS = maseni spektar



**Slika 10.** Kromatogram ukupne ionske struje prije zagrijavanja meda od facelije izoliran pomoću USE ekstrakcije sa organskim otapalom diklormetanom.





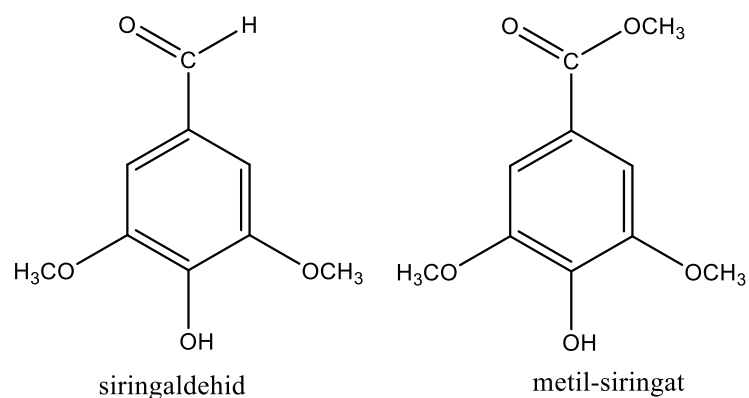
**Slika 11.** Kromatogram ukupne ionske struje prije nakon zagrijavanja (150 °C, 5 min) meda od facelije izoliran pomoću USE ekstrakcije sa organskim otapalom diklormetanom.

## 4. Rasprava

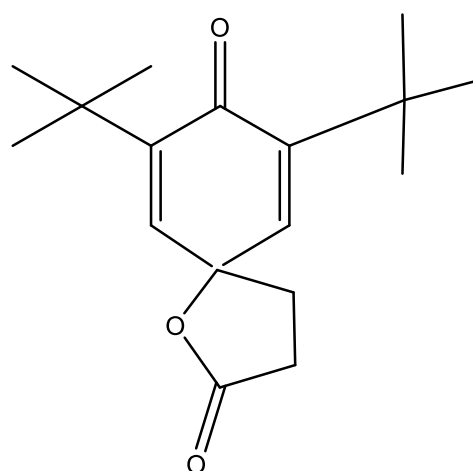
Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj zagrijavanja na profil, odnosno kemijski sastav hlapljivih spojeva meda od facelije. Najprije su izolirani hlapljivi spojevi bez zagrijavanja ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) s organskim otapalom. Kao organsko otapalo je korišten diklormetan.

Da bi se istražio utjecaj zagrijavanja, med od facelije je zagrijavan je pri 150 °C bez dodatka vode u vremenu od 5 minuta, a zatim su izolirani hlapljivi spojevi (vidjeti poglavlje 2.5.) i analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektometrija masa.

Kemijski sastav hlapljivih spojeva meda od facelije prije zagrijavanja prikazan je u tablici 1. U uzorku prije zagrijavanja je identificirano 20 spojeva. Glavni spojevi su bili: fenolni spojevi siringaldehid (29,66 %), heksadekanska kiselina (7,72 %); 5-hidroksimetilfurfural (7,46 %), 7,9-di-tert-butil-1-oksospiro[4,5]deka-6,9-diene-2,8-dion (5,55 %), metil-siringat (4,44 %) i vomifoliol (3,06 %). Siringaldehid i metil-siringat kao i strukturno slični spojevi nastaju iz šikiminskog biogenetskog puta. Ovi spojevi su pronađeni i u drugim vrstama meda kao i u medu od facelije (22), osim 7,9-di-tert-butil-1-oksospiro[4,5]deka-6,9-diene-2,8-dion, za kojeg moguće da je nastao enzimatskom hidrolizom ili tijekom starenja meda (23). Veliku količinu 5-hidroksimetilfurfurala moguće je pripisati starosti meda jer je uzorak ipak iz 2016 godine. Drugi važni spojevi su: metil-2-furoat (1,92 %), 4-vinil-2-metoksi-fenol (1,84 %), heksadekan (1,64 %), heptadekan (1,35 %), oktadekan (1,06 %), oktadekan-1-ol (2,49%), (Z)-oktadek-9-en-1-ol (3,57 %), oktadekan-1-ol (2,70 %), (Z)-oktadek-9-enska kiselina (3,97 %) i trikosan (2,68 %). Udio ostalih detektiranih spojeva je bio ispod 1,00%.



**Slika 12.** Strukture siringaldehida i metil-siringata



**Slika 13.** Struktura 7,9-di-tert-butil-1-oksospiro[4,5]deka-6,9-diene-2,8-dion

U tablici 2 prikazan je profil isparljivih spojeva meda od facelije nakon peto minutnog zagrijavanja na 150 °C. Identificirano je 16 spojeva. Među hlapljivim spojevima dominiraju 2 toplinska artefakta 2,3-dihidroksi-6-metil-4-*H*-piran-4-on, derivat pirana (33,92 %) i 5-hidroksimetilfurfurala (24,45 %). U uzorku nakon zagrijavanja pronađeni su i tipični hlapljivi spojevi meda od facelije (22), prisutni i u drugim medovima, ali u znatno maloj količini, kao što su alifatski alkoholi i dr.

Tipičan spoj koji nastaje zagrijavanjem meda, 5-hidroksimetilfurfural, nađen je kod različitih vrsta meda zagrijavanih iznad 50 °C pri čemu dolazi do stvaranja novih spojeva ili transformiranja postojećih. Novonastali spojevi uzrokuju promjenu boje i arome meda (24), a uglavnom su produkti Maillard-ovih reakcija.

## 5. Zaključak

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

- Cilj ovog istraživanja, određivanja kratkotrajnog utjecaja zagrijavanja na kemijski profil, odnosno sastav hlapljivih spojeva meda od facelije je ostvaren.
- Utvrđene su razlike u kemijskim profilima meda prije i nakon zagrijavanja.
- U uzorku prije zagrijavanja su pronađeni karakteristični hlapljivi spojevi meda od facelije koji su pronađeni i u prethodnim istraživanjima.
- Toplinski artefakti diklormetanskog ekstrakta su piranski i furanski derivati 2,3-dihidroksi-6-metil-4-*H*-piran-4-on (33,92 %) i 5-hidroksimetilfurfurala (24,45 %), koji su nakon petominutnog zagrijavanja kvantitativno porasli.
- Nakon zagrijavanja je došlo do značajnih promjena kemijskog profila meda od facelije.

## 6. Literatura

1. Marević M. Profil hlapljivih spojeva i antioksidacijski potencijal. Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split 2015; 1.
2. Drnasin I. Profil isparljivih spojeva meda krkavine (*Rhamnus spp.*). Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2013; 3.
3. Kapš P. Liječenje pčelinjim proizvodima–Apiterapija. Geromar d.o.o. Rijeka. 2014; 15-18.
4. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Osijek. 2014; 5.
5. <http://www.zenasamja.me/zdravlje/114/med-ublazava-nocni-kasalj> (preuzeto 21. 07. 2018.)
6. Čanak S. Zdravlje iz košnice (med i drugi pčelinji proizvodi). Paradox d.o.o., Rijeka. 2013; 25-32.
7. Šurić P. Učinkovitost panela pri senzorskoj procjeni meda. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Zagrebu, Zagreb 2016; 10-12.
8. <https://dobarzivot.net/zdravlje/alternativa/> (preuzeto 21.07.2018.).
9. Strugar Weiner E., Kemijski sastav meda od drače, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb 2017., 5-7.
10. Šarić M. Profil hlapljivih spojeva monoflornog meda mandarine. Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2008; 12-13.;30.
11. Herceg F. Fizikalno-kemijska analiza meda kestena, lipe i livade. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagreb. Zagreb. 2017; 6-8.
12. [http://www.zzjzpgz.hr/obavijesti/natjecaj2008/Marijanovic\\_i\\_Jerkovic.pdf](http://www.zzjzpgz.hr/obavijesti/natjecaj2008/Marijanovic_i_Jerkovic.pdf) (preuzeto 21.07.2018.).

13. [http://www.ptfos.unios.hr/en/images/stories/alumni/predavanja/SAZETAK\\_PREDAVANJA\\_PROF\\_\\_JERKOVIC.pdf](http://www.ptfos.unios.hr/en/images/stories/alumni/predavanja/SAZETAK_PREDAVANJA_PROF__JERKOVIC.pdf), ( preuzeto 20.06.2018.).
14. Markusović M. Isparljivi spojevi meda (*Galactites tomentosa* Moench.). Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Split. Split. 2011; 14-17.
15. Lovrić AM., Optimizacija i validacija HS-SPME metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu, Diplomski rad, Preharambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, rujan 2016; 7.
16. <https://petraratajc.com/2017/03/18/gcms/>
17. Šola M., Isparljivi spojevi meda amorfe (*Amorphia fruticosa* L.), Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Split, rujan 2009., str. 16-17., 14.9.2018.
18. Pravilnik o kakvoći uniflornog meda, *Narodne novine* br. 46/07, 155/08
19. Palčić M. Uporabna vrijednost facelije (*Phacelia tanacetifolia* bBenth.) u poljoprivrednoj proizvodnji. Diplomski rad. Agronomski fakultet u Zagreb. Zagreb. 2016; 1.
20. <https://www.americanmeadows.com/wildflower-seeds/phacelia>(preuzeo 17.09.2018).
21. <https://www.google.com/search?q=laboratorijsko+posuđe+shema>(preuzeo 17.09.2018).
22. Kuš PM, Jerković I, Marijanović Z, Kranjac M, Tuberoso CIG. Unlocking *Phacelia tanacetifolia* Benth. Honey characterization through melissopalynological analysis, color determination and volatiles chemical profiling. *Food research international*. 2018; 106: 243-53. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.12.065
23. Lalel HJD, Singh Z, Tan SC. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, 29: 205-18. DOI: 10.1016/S0925-5214(02)00250-8

24. Martins SIFS, Jongen WMF, Van Boeckel MAJS. A review of Maillard reactions in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*. 2001; 11: 364-7. <https://ucanr.edu/datastoreFiles/608-648.pdf>